

# PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

## NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CON HISTAMINA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

**Ospital, Ignacio Agustín – LU1103133**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Prof. Dra. Medina, Vanina A.**  
**BIOMED**



Co-Tutor:

**Dra. Nicoud, Melisa B.**  
**BIOMED**



Co-Tutor:

**Prof. Dra. Girotti, María Romina**  
**UADE**

**06/02/2022**

# UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres a nivel mundial. El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el subtipo más agresivo, con un alto potencial proliferativo y metastásico, y asociado al mal pronóstico. El régimen estándar de tratamiento para el CMTN se basa en la administración de drogas quimioterapéuticas altamente tóxicas (antraciclinas/taxanos). El paclitaxel (PTX) es la terapia de primera línea para el CMTN, sin embargo, su baja hidrosolubilidad, escasa permeabilidad y los múltiples efectos adversos asociados limitan su uso clínico. El objetivo que se propone este trabajo final es el desarrollo de formulaciones farmacéuticas basadas en la nanotecnología para mejorar la eficacia terapéutica y el perfil de toxicidad del PTX para el tratamiento del CMTN. Para ello, se desarrollaron formulaciones poliméricas nanomicelares de Soluplus® (S) y Soluplus® decoradas en su superficie con residuos de glucosa (SG) cargadas con histamina (5 mg/mL) y/o PTX (4 mg/mL). Mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz se determinó el tamaño micelar mediante el diámetro medio (Z-ave) resultando de 80-100 nm con una distribución unimodal. Se realizaron ensayos *in vitro* de citotoxicidad y de apoptosis celular en las líneas celulares de CMTN humana MDA-MB-231 y murina 4T1. Los resultados muestran que la histamina a bajas concentraciones (0,01-0,1  $\mu$ M) es capaz de potenciar la actividad antitumoral del PTX libre y del Genexol® (nanoformulación micelar comercial de PTX) en ambas líneas celulares. De igual manera, la nanoformulación micelar decorada glucosa y cargada con HA-PTX aumenta el efecto citotóxico y proapoptótico respecto de las micelas con glucosa cargadas con PTX.

Se analizó la biodistribución de las micelas S y SG marcadas con  $^{99m}$ Tc mediante imágenes adquiridas en una cámara gamma en un modelo de CMTN desarrollado en ratones BALB/c con células 4T1 y se evidenció acumulación de las mismas en los tumores. Interesantemente, estudios *in vivo* mostraron que la histamina tanto en combinación con PTX libre como en el sistema micelar de SG cargado con HA-PTX produjo una reducción de la cardiotoxicidad asociada a la administración del PTX. Los sistemas micelares demostraron beneficiar el efecto citotóxico del PTX. Asimismo, las micelas que contenían HA, PTX y la combinación administradas por vía intravenosa fueron capaces de reducir el tamaño tumoral mientras que solo aquellas que contenían HA lograron reducir la angiogénesis tumoral.

Concluimos que la histamina mejora la eficacia antitumoral de esta nueva estrategia nanotecnológica basada en la terapia con PTX, representando un enfoque prometedor para el tratamiento del CMTN.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed neoplasia and the first cause of women's death from cancer all over the world. Triple Negative Breast Cancer (TNBC) is the most aggressive subtype, with a high proliferative and metastatic potential, and it is associated with poor prognosis. The TNBC standard therapy regimen is based on the administration of highly toxic chemotherapeutic drugs (anthracyclines/taxanes). Paclitaxel (PTX) is the first line therapy for the TNBC treatment, although its poor water solubility and permeability, and multiple side effects limit its clinical application. The aim of the final work is to develop Soluplus® (S) and Glucose decorated Soluplus® (SG) nanomicellar polymeric formulations loaded with histamine (5 mg/mL) and/without PTX (4 mg/mL). Micellar size was determined through dynamic light scattering and average diameter (Z-ave) giving a 80-100 nm homogeneous distribution range. In vitro experiments were performed regarding cytotoxicity and cellular apoptosis in human MDA-MB-231 and murine 4T1 TNBC cell lines. The results show that low histamine concentrations (0.01-0.1  $\mu$ M) were capable of enhancing free PTX and Genexol® (commercial micellar PTX nanoformulation) antitumor activities in both cell lines. Moreover, glucose decorated micelle nanoformulation carrying PTX-HA combination improves cytotoxic and proapoptotic effects compared with glucose decorated micelle carrying only PTX.

S and SG micellar distribution were analyzed in a TNBC murine model developed with 4T1 cells in BALB/c mice by images taken from a gamma camera with previous  $^{99m}$ Tc labeling of the nanoformulations, and tumor accumulation of micelles was found. Interestingly, *in vivo* studies show that free and SG PTX-HA combination causes a reduction of cardiotoxicity associated with PTX administration. Micellar systems were shown to benefit PTX cytotoxic effect. Likewise, micelles containing HA, PTX and the combination administered intravenously were able to reduce tumor size while only those containing HA were able to reduce tumor angiogenesis.

To conclude, histamine enhances the antitumor efficacy of this newly nanobiotechnological strategy based on PTX therapy, representing a promising approach for the TNBC treatment.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecerles a mis papas Andrea y Walter por darme la posibilidad de estudiar y por alentarme en todo momento a seguir adelante. Gracias a ustedes y Mari por bancarse mis quejas, mis madrugadas, los mates cebados en las tardes de estudio. Todo lo que tengo y lo que soy se los debo a ustedes. Mis más grandes agradecimientos para ellos.

También quiero agradecer a Meli, Moni y Vani, por darme un lugarcito en el Laboratorio de Biología Tumoral e Inflamación del BIOMED, por enseñarme desde el día uno con tanta paciencia y bancarme en mis errores, y en especial por la oportunidad de seguir formándome profesionalmente junto a ustedes en mi doctorado. Especialmente agradecerles a Meli y Vani por la enorme predisposición y la ayuda en este gran trabajo, sin ustedes no hubiese sido posible.

A mis compañeras de la facultad, Agus, Jose, Mili, Solci, Lu y Lara por acompañarme día y noche durante estos cuatro años. Por bancarnos en nuestros estresazos preexámenes, por responder todas mis preguntas de papelitos amarillos y mis audios con largas introducciones. Gran parte del camino recorrido hasta el momento se los debo a ustedes y siempre les voy a estar agradecido.

A mis amigos de la vida, Luli, Fio, Fran, Mai y Mili por estar con cada mensajito de suerte, escuchando colapsos mentales y siempre con palabras de aliento. Por alegrarse con cada acierto y darme una mano en los momentos no tan acertados. Por estar desde hace años a mi lado, gracias.

Juli y Anto por su apoyo incondicional en todo momento de la carrera y de la vida. Gracias por esos llantos en nuestras sesiones de terapia, siestas interminables posfacultad y todas nuestras locuras que me mantuvieron siempre de pie para llegar a donde estoy hoy.

Un especial agradecimiento a Sari y Romi, que estuvieron en uno de los momentos más difíciles para mí y tal vez sin saberlo, con unas simples palabras y meriendas de por medio fueron mi salvavidas. Parte de todo lo que soy y donde estoy hoy en día se los debo a ustedes también. Eternamente agradecido.

Aldryn, gracias a vos por haber aparecido en mi vida. Te toco conocerme en el año más difícil de todos, con clases, trabajo y tesis de por medio, y aun así me bancaste y respetaste mis tiempos, incluso a veces más que yo. Gracias por haberme acompañado en esta última etapa.

Por último, un muy especial agradecimiento a mis abuelos, Sonia y Carlos, por cada mensajito de aliento y cada velita prendida en las noches previas a mis exámenes. Por siempre, gracias. ¿Viste abuelo? Ya casi el 100%!

## Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	10
<b>1.1 Relevancia del Tema</b> .....	10
<b>1.2 Objetivos</b> .....	11
<b>1.3 Organización del Trabajo</b> .....	12
<b>2. Antecedentes</b> .....	13
<b>2.1 Anatomía y funciones de la glándula mamaria</b> .....	13
<b>2.2 Cáncer</b> .....	15
<b>2.2.1 Señalización sostenida de la proliferación</b> .....	15
<b>2.2.2 Evasión de genes supresores de crecimiento</b> .....	16
<b>2.2.3 Resistencia a la Muerte Celular</b> .....	17
<b>2.2.4 Potencial replicativo ilimitado</b> .....	17
<b>2.2.5 Inducción de la angiogénesis</b> .....	18
<b>2.2.6 Invasión tisular y metástasis</b> .....	18
<b>2.2.7 Inestabilidad genómica y mutaciones</b> .....	19
<b>2.2.8 Inflamación</b> .....	19
<b>2.2.9 Reprogramación del metabolismo energético</b> .....	20
<b>2.2.10 Evasión del sistema inmune</b> .....	21
<b>2.3 Cáncer de mama</b> .....	21
<b>2.3.1 Estadísticas del cáncer de mama</b> .....	22
<b>2.3.2 Clasificación del cáncer de mama</b> .....	23
<b>2.3.3 Cáncer de mama triple negativo</b> .....	25
<b>2.4 Tratamientos del Cáncer de mama triple negativo</b> .....	27
<b>2.4.1 Cirugía</b> .....	27
<b>2.4.2 Radioterapia</b> .....	28
<b>2.4.3 Quimioterapia</b> .....	29
<b>2.4.3 I Paclitaxel</b> .....	30
<b>2.4.4 Respuesta antitumoral e Inmunoterapia</b> .....	32
<b>2.4.4 I Inhibidores del Antígeno 4 de Linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)</b> .....	33
<b>2.4.4 II Inhibidores de PD-1/PD-L1</b> .....	35
<b>2.4.4 III Inhibidores de PARP</b> .....	36
<b>2.5 Histamina</b> .....	37

2.5.1	Receptores de histamina .....	38
2.5.2	Histamina e inmunidad tumoral .....	41
2.5.3	Histamina y cáncer .....	45
2.5.4	Histamina y cáncer de mama .....	46
2.5.5	Histamina en combinación con otras terapias para el tratamiento del cáncer de mama .....	50
2.6	Sistemas de vehiculización de drogas .....	51
2.7	Uso de nanoformulaciones en la terapia oncológica .....	53
2.7.1	Nanopartículas poliméricas .....	54
2.7.2	Liposomas .....	57
2.7.3	Micelas .....	59
3.	Hipótesis .....	64
4.	Materiales y métodos .....	65
4.1	Líneas celulares .....	65
4.1.1	4T1 (ATCC® CRL-2539™) .....	65
4.1.2	MDA-MB-231 (CRM-HTB-26™) .....	66
4.1.3	HBL-100 .....	67
4.2	Cultivo celular .....	67
4.3	Drogas utilizadas .....	68
4.3.1	Histamina (HA) .....	68
4.3.2	Paclitaxel (PTX) .....	69
4.3.3	Genexol-PM (GX) .....	69
4.4	Diseño de nanoformulaciones micelares con Soluplus® .....	70
4.4.1	Soluplus® .....	71
4.4.2	Glucosilación del copolímero Soluplus® .....	72
4.4.3	Preparación de micelas cargadas con paclitaxel (4 mg/mL) e histamina (5 mg/mL) ...	74
4.4.4	Determinación del tamaño micelar promedio (Z-ave), distribución de tamaño e índice de polidispersión (PDI) .....	74
4.5	Ensayos de proliferación celular .....	74
4.5.1	Método Clonogénico .....	74
4.5.2	Ensayo de viabilidad celular .....	75
4.6	Determinación de la apoptosis celular .....	75
4.6.1	Ensayo de TUNEL (TdT-mediated UTP-biotin Nick End labeling) .....	75



4.6.2 Marcación con Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V-FITC .....	76
4.7 Animales de experimentación.....	77
4.7.1 Generación de tumores mediante inoculación de células 4T1.....	77
4.8 Estudios de biodistribución de las formulaciones micelares .....	78
4.8.1 Biodistribución <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> .....	78
4.9 Ensayo <i>in vitro</i> de hemólisis.....	79
4.10 Determinaciones enzimáticas en plasma.....	79
4.11 Preparación de suspensiones celulares de ganglios linfáticos drenantes de tumor y bazo para determinar subpoblaciones de células inmunitarias .....	80
4.12 Determinación de TBARS .....	80
4.13 Análisis estadísticos .....	81
5. Resultados .....	82
5.1 Estudio del efecto antitumoral de formulaciones de paclitaxel en combinación con histamina.....	82
5.1.1 Resultados <i>in vitro</i> .....	82
5.1.2 Resultados <i>in vivo</i> .....	84
5.2 Estudio del efecto antitumoral de nanoformulaciones micelares con paclitaxel en combinación con histamina.....	86
5.2.1 Caracterización micelar .....	86
5.2.2 Estudios de biodistribución de las nanoformulaciones .....	88
5.2.3 Estudios <i>in vitro</i> con las nanoformulaciones de paclitaxel en combinación con histamina en las células 4T1 .....	90
5.2.4 Estudios <i>in vitro</i> con las nanoformulaciones de paclitaxel en combinación con histamina en las células MDA-MB-231 .....	93
5.2.5 Estudios <i>in vitro</i> con las nanoformulaciones de paclitaxel en las células HBL-100 .....	96
5.2.6 Estudios <i>in vivo</i> con las nanoformulaciones micelares de paclitaxel en combinación con histamina .....	98
6. Discusión y Conclusiones .....	108
7. Bibliografía.....	118

## 1. Introducción

### 1.1 Relevancia del Tema

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras del mundo. Es una patología que se desarrolla en el tiempo a medida que las células normales adquieren ciertas propiedades que son características de una enfermedad neoplásica. De esta manera, las células tumorales logran sobrevivir, proliferar y metastatizar otros tejidos, extendiéndose la enfermedad a todo el individuo.

A pesar del progreso significativo en la prevención, detección y tratamiento asociada a una mejor comprensión de la biología tumoral, el cáncer continúa siendo una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad en el mundo.

En particular, el cáncer de mama es de las neoplasias más heterogéneas, presentando así, diversos subtipos. Entre los más agresivos y resistentes, se encuentra el cáncer de mama triple negativo (CMTN), el cual presenta elevado potencial proliferativo y metastásico. Este subtipo de carcinoma mamario es el de peor pronóstico y representa entre el 10% y el 15% de los casos de cáncer de mama en el mundo (American Cancer Society, 2021).

Como no presenta una terapia dirigida disponible, la quimioterapia es hasta el momento el principal tratamiento estándar establecido para el CMTN, pero presenta severos efectos adversos asociados, a la vez que en muchos casos estos tratamientos inespecíficos no producen un impacto significativo en la supervivencia.

Nuevas estrategias están siendo desarrolladas en la actualidad para tratar el CMTN de forma efectiva, buscando evitar los efectos adversos severos de los tratamientos estándares hoy en día aprobados y mejorar así su eficiencia.

Es sabido que para que un clon tumoral progrese debe ser capaz de evadir su eliminación mediada por el sistema inmune, para lo cual las células tumorales han desarrollado mecanismos efectivos para lograr sobrepasar este obstáculo. Es de esta forma, que surgen las estrategias basadas en el refuerzo de la respuesta inmune antitumoral, es decir las inmunoterapias. Con estos nuevos acercamientos, que hacen foco en la participación del sistema inmune en el

desarrollo, progresión y metástasis del tumor, se busca que las células inmunitarias del propio individuo identifiquen y eliminen a las células tumorales.

En este sentido, la histamina surge como nuevo agente terapéutico con capacidad de estimular al sistema inmune, al mismo tiempo de que demuestra ejercer efectos antitumorales y potenciar terapias convencionales ya aprobadas para distintos tipos de cáncer.

De esta manera, el estudio de nuevos blancos terapéuticos y la combinación de tratamientos tradicionales con nuevas tecnologías es extremadamente necesario teniendo en cuenta los problemas asociados a las terapias sistémicas existentes altamente tóxicas, los costos elevados y limitada supervivencia libre de enfermedad.

Si bien estas novedosas estrategias parecen ser por demás prometedoras, aún queda mucho por recorrer en la búsqueda de terapias dirigidas para el CMTN.

*Este trabajo propone el desarrollo de formulaciones farmacéuticas de base nanotecnológicas para mejorar la eficacia y el perfil de toxicidad del paclitaxel para el tratamiento del CMTN.*

## 1.2 Objetivos

El *objetivo general* de este trabajo final es mejorar el índice terapéutico de tratamientos oncológicos actuales mediante el diseño de estrategias combinadas. En este contexto, buscamos desarrollar y caracterizar formulaciones poliméricas nano-micelares cargadas con histamina y paclitaxel y evaluar su eficacia antitumoral en cáncer de mama triple negativo (CMTN).

Los *objetivos específicos* se enumeran a continuación:

1. Estudiar *in vitro*, en las líneas celulares de CMTN metastásico murina 4T1 y humana MDA-MB-231, si el tratamiento combinado con histamina es capaz de mejorar los efectos antitumorales del paclitaxel tanto en su forma libre como en la nano-formulación polimérica comercial (Genexol<sup>®</sup>). Para evaluar la selectividad de los efectos observados, se estudiará el efecto de dichos tratamientos en la línea no tumorigénica de mama HBL-100.

2. Evaluar si la histamina mejora el efecto del paclitaxel libre en un modelo *in vivo* de CMTN desarrollado en ratones BALB/c mediante inoculación ortotópica de células 4T1.
3. Desarrollar y caracterizar *in vitro* e *in vivo* formulaciones poliméricas nanomicelares con el copolímero Soluplus<sup>®</sup> cargadas con histamina y/o paclitaxel, decoradas o no en la corona con residuos de glucosa.
4. Estudiar *in vitro*, en las líneas celulares de CMTN metastásico murina 4T1 y humana MDA-MB-231, los efectos antitumorales de las formulaciones poliméricas nanomicelares.
5. Investigar la eficacia terapéutica de las formulaciones nanomicelares decoradas con residuos de glucosa, cargadas con paclitaxel y/o histamina en un modelo *in vivo* de CMTN desarrollado en ratones BALB/c con la línea celular murina 4T1.

### 1.3 Organización del Trabajo

El trabajo desarrollado consta de siete secciones. En primer lugar, se realiza una breve **Introducción** al tema a analizar, donde a su vez se expresan la relevancia y los objetivos planteados para el proyecto. Luego, se enuncian los **Antecedentes** que explican los conocimientos que se poseen sobre la materia y que permiten plantear una **Hipótesis**. Bajo el título de **Materiales y Métodos** se detallan las metodologías y los recursos utilizados para la realización de los experimentos llevados a cabo a lo largo del trabajo. En la sección de **Resultados**, se expresan los hallazgos obtenidos de los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, los resultados son puestos en común y discutidos con perspectivas a futuro en la sección de **Discusión y Conclusiones**. El material informativo consultado puede hallarse en la sección de **Bibliografía**.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Anatomía y funciones de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano altamente evolucionado que se presenta de a pares en la región anterior de la pared del tórax. La mayor parte de la misma se encuentra situada en la región pectoral, mientras que una pequeña parte, la cola axial, se encuentra formando parte de la axila (Khan & Sajjad, 2021). La glándula mamaria consiste en una bicapa de células endoteliales incluida dentro del tejido adiposo, la cual se encuentra sostenida por una estructura laxa compuesta por tejido conectivo fibroso conocido como ligamentos de Cooper (Aranda-Gutierrez & Díaz-Perez, 2021) (*Figura 1*).

Su función principal es la de producir la leche materna cuya secreción se produce en folículos pilosos y luego se dirige a la superficie de la piel (Glándula Apocrina). Asimismo, forma parte del sistema reproductor femenino (Khan & Sajjad, 2021).

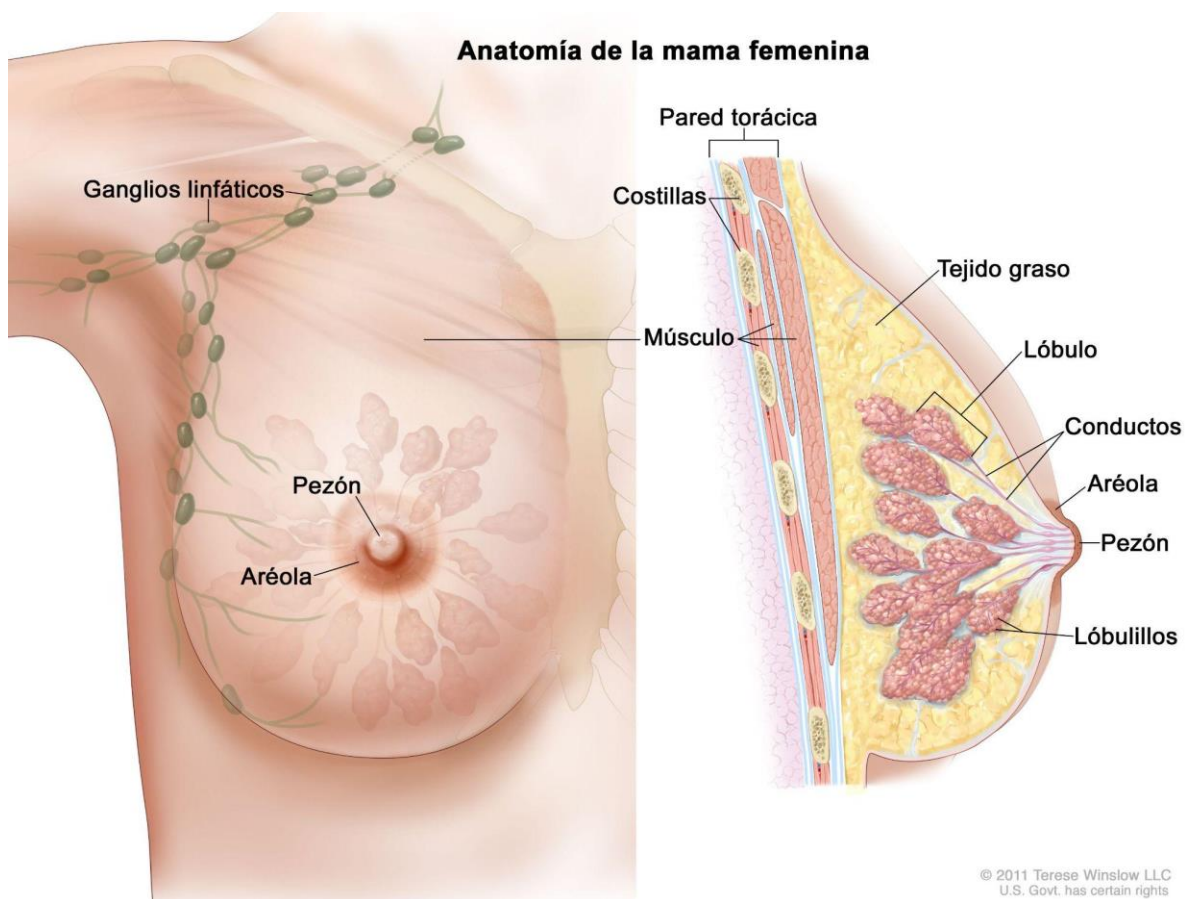
En cuanto a su estructura, se compone de tres partes: piel, parénquima y estroma.

La porción de la piel se compone del pezón y la areola. El pezón es una eminencia de forma cónica en la cual desembocan y perforan entre 15 y 20 conductos lactíferos (Khan & Sajjad, 2021). Los mismos se encuentran formados por células cuboidales luminales que a su vez forman la parte interna de la bicapa antes mencionada. Externamente se compone de células mioepiteliales las cuales poseen propiedades similares a las fibras de músculo liso. Éstas presentan estructura circular y longitudinal, vinculadas a terminales nerviosas que se encuentran involucradas en la expulsión de leche en la lactancia y a la erección del pezón frente a la estimulación (Aranda-Gutierrez & Díaz-Perez, 2021). Por otro lado, la areola es la región de piel oscurecida alrededor del pezón y se compone mayoritariamente de glándulas sebáceas que secretan fluidos oleosos que previenen la resequedad de la piel en la zona (Khan & Sajjad, 2021).

El parénquima se encuentra conformado por los ductos mamarios que irradian desde el pezón hasta la zona debajo de la areola. Una segunda subdivisión de dichos canales los conduce a los lóbulos, segundo componente principal del parénquima mamario. Cada uno de éstos se

conforma de pequeñas glándulas denominadas lobulillos en donde se produce la leche en respuesta a la prolactina (Khan & Sajjad, 2021; Aranda-Gutierrez & Díaz-Perez, 2021).

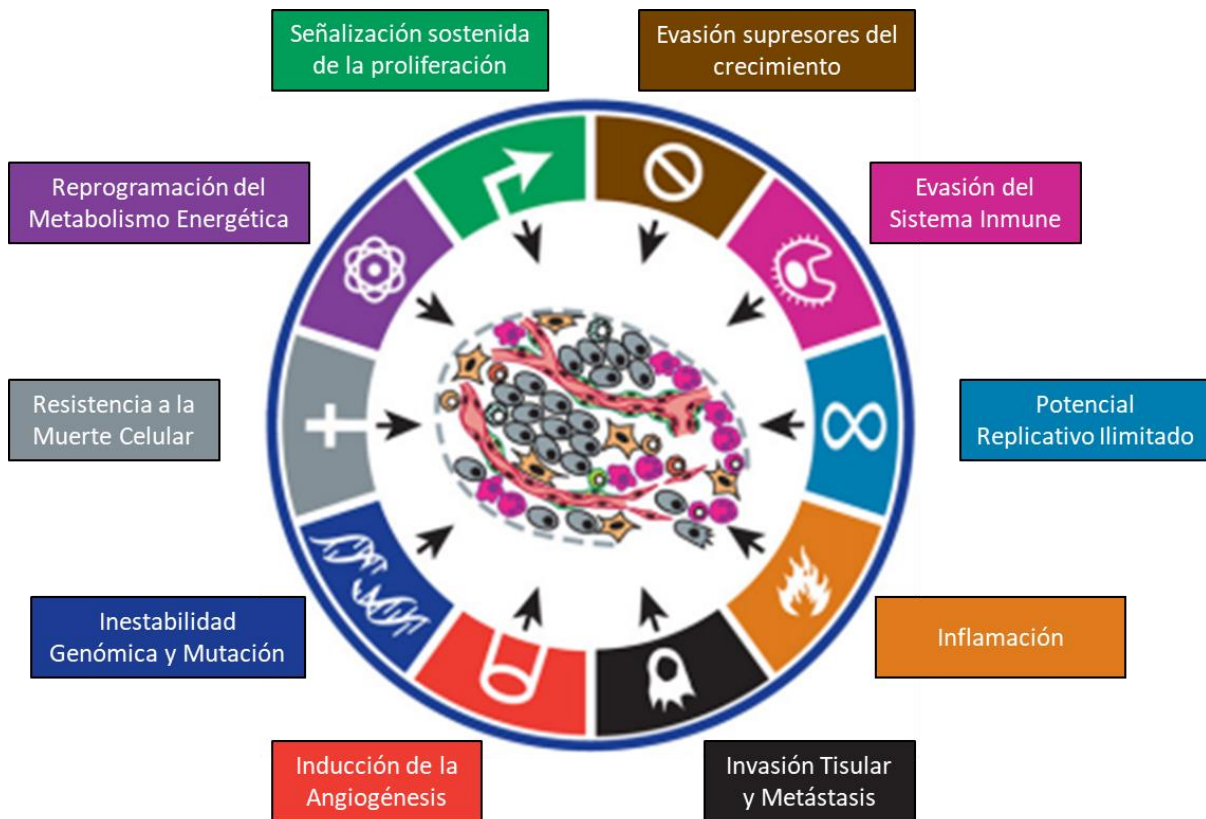
En cuanto al estroma, este cumple la función de sostén de toda la estructura del parénquima constando de dos secciones: el estroma fibroso y el estroma graso. El primero de ellos, consta de los ligamentos suspensorios de Cooper, los cuales mantienen en suspensión a los lóbulos de la glándula mamaria desde la fascia pectoral. Mientras que, por otro lado, el estroma graso rellena los espacios vacíos entre los componentes de la glándula mamaria (Khan & Sajjad, 2021; Aranda-Gutierrez & Díaz-Perez, 2021).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo de la composición del tejido de la glándula mamaria. Extraído y adaptado de <https://www.cancer.gov/espanol>

## 2.2 Cáncer

El cáncer es una patología que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células tanto a nivel espacial como en su tasa de recambio. En esta enfermedad las células suelen adquirir ciertos fenotipos particulares que terminan por convertir células normales en células malignas. Hannan y Weinberg denominaron a los mismos como los “hallmarks del cáncer” (*Figura 2*). A continuación, se las nombrará y se hará una breve descripción de cada una de ellas para comprender la biología de la patología y su progresión.



*Figura 2. “Hallmarks of cancer” Figura extraída y adaptada de (Hanahan & Weinberg, 2011).*

### 2.2.1 Señalización sostenida de la proliferación

En tejidos normales el ciclo celular es altamente regulado de forma tiempo-espacial en cada una de sus etapas para evitar alteraciones en la estructura y una proliferación desmesurada de las células y los tejidos que componen. En células cancerígenas, este proceso se ve

perjudicado viéndose alterado este minucioso control de la proliferación. Diversos mecanismos explican este fenómeno, entre ellos, la liberación permanente de factores mitogénicos de forma autócrina y también por parte de células normales adyacentes, por estimulación de las células tumorales (Cheng y col., 2008; Bhowmick y col., 2004). A su vez, tanto la sobreexpresión de receptores de membrana que se activan con factores de crecimiento y proliferación, como la mutación de sus dominios intracelulares tirosinquinasa pueden desembocar en una señalización constitutiva hacia la proliferación, instaurando una independencia de los factores a los que normalmente se asocian a dichos receptores (Hanahan & Weinberg, 2011). Por último, disrupciones en los sistemas homeostáticos que evitan, a través de *feedback* negativos una continua señalización de proliferación, pueden concluir en la formación de células tumorigénicas (Wertz & Dixit, 2010; Cabrita & Christofori, 2008; Amit y col., 2007; Mosesson y col., 2008).

### **2.2.2 Evasión de genes supresores de crecimiento.**

Dentro de la basta cantidad de genes presentes en una célula, algunos de ellos pueden ser clasificados según la potencialidad de llevarla a un régimen de autoreplicabilidad descontrolada, en caso de producirse una desregulación del mismo. En este sentido, se encuentran los genes supresores de tumores que, en tejidos normales, previenen la desregulación de la homeostasis del ciclo celular. Entre ellos podemos mencionar a la proteína retinoblastoma y a la p53 (Hanahan & Weinberg, 2011).

La proteína retinoblastoma, proveniente del gen *RBI*, es capaz de decidir sobre el destino del ciclo celular, censando si se encuentran presentes las condiciones propicias para el desarrollo del mismo (Burkhart & Sage, 2008; Deshpande y col., 2005; Sherr & McCormick, 2002). Por otro lado, la proteína tumoral p53, codificada por el gen *TP53*, produce la muerte celular controlada de aquellas células en las que el daño celular, y por sobre todo el daño al ADN, es tan grave que seguir con el proceso de división celular es inviable. En este sentido, la mayoría de los tumores poseen mutados ambas proteínas a nivel genómico que impiden su normal funcionamiento, denotando su rol imprescindible en el control de la transformación maligna y proliferación de las células cancerígenas (Hanahan & Weinberg, 2011).



### 2.2.3 Resistencia a la Muerte Celular

Antes de que una célula logre adquirir un fenotipo tumoral debe sobrepasar ciertas barreras diseñadas específicamente para evitar alcanzar dicho comportamiento. La muerte celular programada o apoptosis es uno de los mecanismos que la célula posee para evadir un destino neoplásico cuando ya no se puede salvaguardar las mutaciones o daños que en ella suceden (Adams & Cory, 2007; Lowe y col., 2004; Evan & Littlewood, 1998). Durante la apoptosis, varios factores participan en su desarrollo. Tanto factores antiapoptóticos (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, etc.) y proapoptóticos (por ejemplo, Bax y Bak) relacionados a la familia de proteínas de Bcl-2 en las vías intrínsecas y extrínsecas, como demás señales de supervivencia, deben ser regulados minuciosamente para que la muerte celular programada suceda o se evite (Adams & Cory, 2007). Estos mismos elementos, en camino a la transformación maligna celular, son típicamente desregulados, aumentando aquellos factores antiapoptóticos y/o disminuyendo los proapoptóticos. Estas alteraciones pueden darse también a través de distintas señales de supervivencia celular aumentada (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 2.2.4 Potencial replicativo ilimitado

Las células normales presentan un número limitado de crecimiento y división celular llamado *Límite de Hayflick*. Se cree que este límite de ciclos celulares que una célula puede realizar está dado por el largo de sus telómeros (Blasco, 2005; Shay & Wright, 2000). Los telómeros son repeticiones de hexanucleótidos no codificantes presentes al final de cada cromosoma que evita que en la pérdida de nucleótidos en cada duplicación celular se pierda información genética. La enzima encargada de su renovación – Telomerasa – se encuentra inactiva o casi ausente en todas células no inmortales. De esta manera, en los últimos ciclos celulares, cuando las regiones teloméricas se encuentran demasiado acortadas, existen dos destinos posibles: la senescencia – un estado celular viable, pero sin crecimiento ni división – o la muerte celular por apoptosis. Ambas situaciones previenen a una célula de continuar realizando ciclos celulares dando lugar a aberraciones cromosómicas y alteración en la información genética. Aquellas células que se encuentran en un proceso de transformación maligna suelen tener elevada actividad telomerasa lo que evita cualquiera de los dos destinos

antes mencionados y posibilitando la autoreplicabilidad ilimitada (Hanahan & Weinberg, 2011).

## **2.2.5 Inducción de la angiogénesis**

Al igual que los tejidos normales, las células tumorales, y en particular cuando se encuentran formando parte de macrotumores, precisan de nutrientes, oxígeno y agua, a la vez que, deben deshacerse de desechos metabólicos y del dióxido de carbono. Crear nuevos vasos y ramificaciones que irrigen al nuevo tejido, es la forma que poseen los tumores de proveerse de dichos nutrientes y descartar los desechos (Hanahan & Folkman, 1996). Esta formación de vasos sanguíneos se genera debido a un balance que se produce entre inhibidores e inductores de la angiogénesis (Baeriswyl & Christofori, 2009; Bergers & Benjamin, 2003). Dentro de estos últimos el más relevante es el VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial, que codifica para ligandos involucrados en el crecimiento de vasos sanguíneos. Dicho inductor se encuentra regulado positivamente en situaciones de hipoxia, lo que permite aumentar la llegada de oxígeno al tejido y, como se mencionó anteriormente, en los tumores mediante la señalización de distintos oncogenes (Ferrara, 2009; Mac Gabhann & Popel, 2008; Carmeliet, 2005). Por otro lado, la trombospondina-1 también posee receptores de membrana presentes en células endoteliales, pero a diferencia del VEGF su rol es inhibir la angiogénesis (Kazerounian y col., 2008). En los tumores, la nueva vasculatura se caracteriza por ser ramificada, distorsionada y agrandada, con un flujo de sangre errático y microhemorragias debido al crecimiento descontrolado y la apoptosis de células endoteliales (Nagy y col., 2010; Baluk y col., 2005).

## **2.2.6 Invasión tisular y metástasis**

Llegado un punto de la transformación de la célula a un estado neoplásico maligno, esta puede adquirir alteraciones no solo metabólicas y energéticas sino también estructurales y en relación a la comunicación con otras células. Una de las modificaciones más frecuentes es la pérdida de uniones con otras células y con la matriz extracelular (MEC). Generalmente, las primeras uniones en perderse son las que están dadas por las E-cadherinas que forman las uniones adherentes entre células epiteliales adyacentes y mantienen la estructura de la lámina de células epiteliales (Bex & van Roy, 2009; Cavallaro & Christofori, 2004). Debido a la

pérdida de uniones, no solo con otras células sino con el tejido que la rodea, la célula puede comenzar un proceso multifacético que concluye con la invasión y la metástasis de otros tejidos. En primer lugar, se produce una invasión del tejido circundante (invasión local). Más tarde, la célula puede alcanzar tanto vasos linfáticos como sanguíneos, adentrándose en sus circuitos complejos a través de todo el individuo. Luego de un tiempo, estas células pueden extravasarse desde el lumen de dichos sistemas de circulación hacia el parénquima de otros tejidos. Por último, dichas células malignas pueden micrometastatizar, es decir, formar pequeños nódulos de células y luego crecer colonizando el nuevo tejido (Talmadge & Fidler, 2010; Fidler, 2003).

### **2.2.7 Inestabilidad genómica y mutaciones**

Como se mencionó anteriormente, en las células neoplásicas ocurren alteraciones que implican la pérdida de ciertos elementos de control importantes que garantizan una duplicación fidedigna y sin errores del genoma al momento de la división celular, como por ejemplo la proteína p53. También puede suceder que las células se vuelvan más sensibles a ciertos elementos mutagénicos por la pérdida de moléculas que las inactivan o secuestran. A su vez, los mecanismos de reparación del ADN se vuelven ineficientes, tanto por deficiencias en el reconocimiento de material genético dañado como mutaciones inactivantes de estos mismos, lo que genera que cada vez haya más alteraciones genómicas (Negrini y col, 2010; Ciccía & Elledge, 2010; Jackson & Bartek, 2009; Kastan, 2008; Harper & Elledge, 2007; Friedberg y col, 2006; Sigal & Rotter, 2000). Esta inestabilidad genética, característica de células tumorales, promueve la existencia de varios clones dentro de un mismo tumor con diferentes genotipos. De esta manera, se produce una competencia en la que, aquellos clones que posean alguna alteración genómica que les permite sobrevivir, crecer y replicarse de forma más rápida a comparación de los demás clones, predominará en el tiempo (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **2.2.8 Inflamación**

Se ha observado que células del sistema inmune se encuentran infiltradas en el tumor, tanto aquellas del sistema innato, como del adaptativo. Inicialmente, se relaciona dicha respuesta inmune a una defensa concreta contra el tumor, para poder eliminar aquellas células malignas que lo originan (Dvorak, 1986). Sin embargo, existe evidencia que asocia dicha

respuesta inflamatoria con la progresión tumoral. Distintos estudios demostraron que las células infiltrantes del tumor, y sobre todo las células del sistema inmune innato como los macrófagos y mastocitos, contribuyen al estado neoplásico de las células en varios sentidos. En primer lugar, producen un microambiente tumoral cargado de moléculas como factores de crecimiento que mantienen una señalización sostenida de proliferación y supervivencia. Por otro lado, producen factores que promueven la formación de vasos sanguíneos alrededor del tumor. Mientras que, a su vez, modifican la estructura de la MEC facilitando la invasión del tejido local y luego la metástasis de las células tumorales (DeNardo y col., 2010; Grivennikov y col., 2010; Qian & Pollard, 2010; Karnoub & Weinberg, 2006–2007). Por último, ciertas células del sistema inmune involucradas en esta respuesta son capaces de liberar químicos que generan un ambiente genotóxico para las células que las rodean. De esta manera, se aumentan las probabilidades de que se produzcan mutaciones que deriven en la transformación maligna de las células circundantes (Grivennikov y col., 2010).

### 2.2.9 Reprogramación del metabolismo energético

Al contrario de lo que se podría pensar, debido a los rendimientos energéticos de los distintos procesos de obtención de energía, las células tumorales realizan una reprogramación pasando de una respiración aeróbica completa, con producción de 38 ATP por glucosa, a una basada únicamente en la glucólisis, lo que da un rendimiento de 2 ATP por glucosa (Warburg, 1930, 1956a, 1956b). Este cambio, también conocido como *efecto Warburg*, se produce debido a distintos factores característicos de un ambiente tumoral, como son la hipoxia, la activación de oncogenes específicos y la mutación de supresores tumorales, que incrementan la captación de glucosa del medio circundante a partir de la sobreexpresión de los transportadores GLUT1 (Jones & Thompson, 2009; DeBerardinis y col., 2008; Hsu & Sabatini, 2008). Esta sobreexpresión, que aumenta la concentración de glucosa citoplasmática, permite que la célula haga frente al déficit energético generado por este *switch* metabólico (DeBerardinis y col., 2008; Jones & Thompson, 2009; Semenza, 2010). Por otro lado, al estar sobreexpresada la vía glucolítica, se encuentran disponibles sus intermediarios metabólicos que son necesarios para la biosíntesis de moléculas como nucleósidos y aminoácidos, importantes para el crecimiento, duplicación genómica y división celular (Vander Heiden y col., 2009).

### 2.2.10 Evasión del sistema inmune

Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo componen una intrincada red de defensa contra la aparición de células tumorales. Constantemente los tejidos son inmunovigilados en la búsqueda del reconocimiento de lo ajeno al individuo, entre ellos patógenos que pueden inducir a la transformación maligna de la célula (Ej. oncovirus) como de antígenos tumorales. Para estos últimos, cuando son identificados, se produce una respuesta adaptativa, y ese clon tumoral es eliminado en un proceso denominado inmunoección. Por otro lado, aquellos tumores poco antigénicos sobreviven. De esta manera, dichas células que escapan a la destrucción mediada por el sistema inmune prevalecen en el tiempo y logran progresar a tumores, micrometastatizar y colonizar otros tejidos del individuo (Hanahan & Weinberg, 2011). Se ha demostrado que en la inmunidad antitumoral las células T citotóxicas (CD8+), T helper (TH o CD4+) y *Natural killer* (NK) tienen un rol muy importante. Asimismo, el tumor es capaz de suprimir esta respuesta mediante la liberación de factores inmunosupresores y el reclutamiento de células inmunosupresoras al microambiente tumoral como son las células T regulatorias (Treg) y las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) (Mougiakakos y col., 2010; Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009; Teng y col., 2008; Kim y col., 2007).

### 2.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células que componen la glándula mamaria. Éste se puede dar en individuos masculinos, pero en la mayoría de los casos se presenta en mujeres. El tipo de cáncer mamario más comúnmente encontrado es el cáncer de mama ductal *in situ*, el cual se produce en los conductos mamarios. Por otro lado, se encuentra el cáncer de mama lobulillar, el cual se produce en el compartimento en donde se genera la leche materna, los lobulillos. Por último, existen otros tipos de cáncer de mama poco frecuentes como tumor filodes y el angiosarcoma.

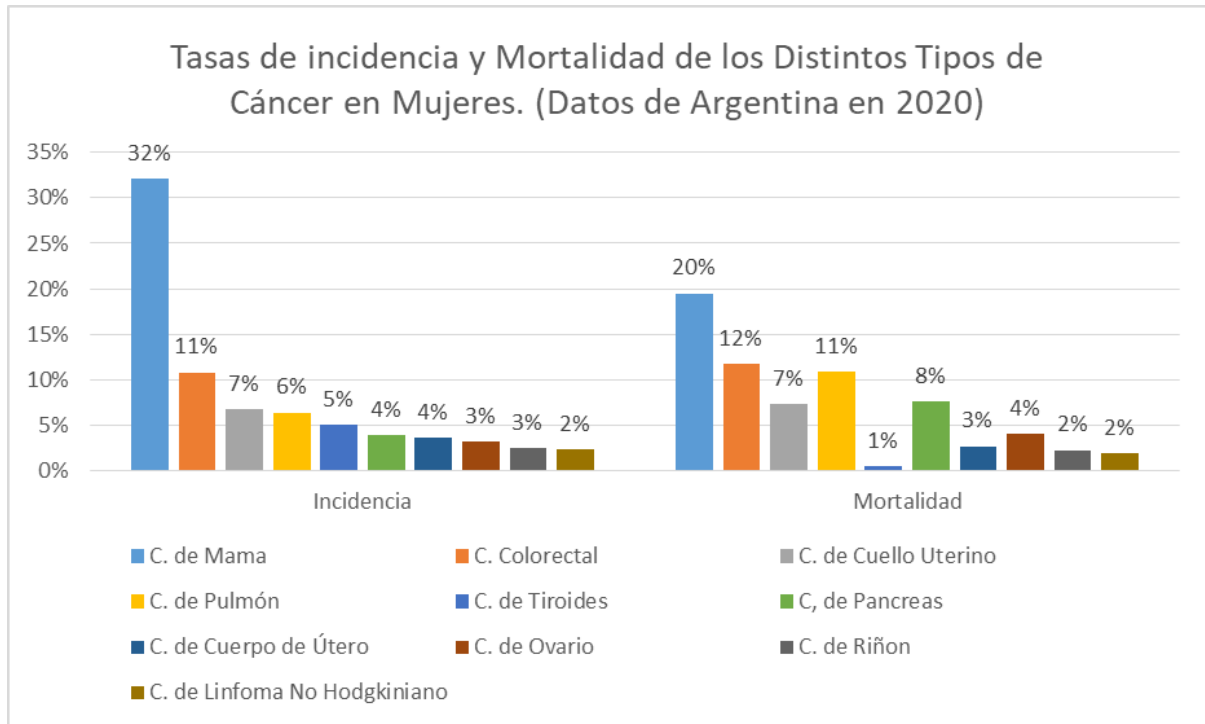
Como se ha discutido, el cáncer de mama es muy heterogéneo tanto a nivel intratumoral como también entre diferentes tumores. Es por ello que su clasificación es compleja, pudiendo ser analizado desde su histología, tamaño tumoral y estado de los nódulos, hasta la sobreexpresión de receptores hormonales y expresión de ciertos *clusters* de genes. Al mismo

tiempo, la existencia de tantos subtipos de carcinomas mamarios da lugar a un gran número de tratamientos con respuestas variadas según sus características.

### **2.3.1 Estadísticas del cáncer de mama**

A pesar del progreso significativo en la prevención, detección y tratamiento asociada a una mejor comprensión de la biología tumoral, el cáncer de mama, de entre todos los cánceres, posee, en mujeres, una incidencia mundial del 24,5% cuyo valor continúa en aumento. En el año 2020, se diagnosticaron 2,3 millones de nuevos casos en mujeres a nivel mundial, presentando una tasa de mortalidad de 15,5 % (Global Cancer Observatory, 2021; Sung y col., 2021).

En particular, en Argentina el cáncer de mama es el tipo de neoplasia de mayor incidencia entre las mujeres. En el año 2021, se han diagnosticado alrededor de 22.024 nuevos casos por lo que presenta, entre todos los cánceres que afectan a la población argentina, una tasa de incidencia del 16,8%, siendo en mujeres del 32,1%. A su vez, es la primera causa de muerte relacionada al cáncer en mujeres argentinas con un índice de mortalidad del 19,51%. (Global Cancer Observatory, 2021; Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Instituto Nacional del Cáncer) (*Figura 3*).



**Figura 3.** Estadísticas sobre el cáncer en mujeres de Argentina. El gráfico muestra la distribución del porcentaje de nuevos casos (Incidencia) y de muerte (Mortalidad) para los 10 tipos de cáncer más comunes en el 2020 para mujeres en Argentina. Información obtenida del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Instituto Nacional del Cáncer.

### 2.3.2 Clasificación del cáncer de mama

En primera instancia, el cáncer de mama se divide histológicamente en cáncer de mama ductal *in situ*, lobulillar *in situ* y carcinoma invasivo. Como se mencionó anteriormente, el más frecuente de ellos es el carcinoma ductal invasivo con una incidencia de entre el 40% y el 70%. Todos los carcinomas invasivos son graduados histológicamente teniendo en cuenta la formación tubular, el grado de pleomorfismo nuclear y el recuento mitótico según el sistema de graduación de Bloom y Richardson modificado por Elston y Ellis. Cada uno de estos tres parámetros posee su propia escala y una visualización conjunta permite obtener una graduación de la enfermedad que toma valores de entre 1 y 3 según el estado de diferenciación del tumor, siendo el valor 1 el que indica una mayor diferenciación. Los individuos que padecen cánceres de mayor grado suelen ser reincidentes y sufrir metástasis mientras que aquellos cánceres de menor grado poseen un mejor pronóstico (Vuong y col., 2014).

Por otro lado, los cánceres son clasificados en etapas basándose en información clínica y patológica en cuanto al tamaño tumoral, el estado de los nodos linfáticos regionales y si existen metástasis en otros tejidos distales (TMN). De esta manera, toma valores de 1 a 4, siendo los tumores en etapa uno los más pequeños, que no comprometen a los nodos linfáticos y presentando un mejor pronóstico libre de enfermedad a 5 años (Waks & Winer, 2019).

A su vez, existe una subdivisión basada en la presencia de ciertos marcadores de pronóstico, como lo son los receptores hormonales, que permite diferenciar 4 clases de cánceres de mama a través de ensayos inmunohistoquímicos. Aquellos cánceres que sobreexpresan únicamente el receptor de estrógenos se los denomina RE+, mientras que los que presentan una sobreexpresión del receptor de progesterona se los nombra RP+. Ambos receptores, en condiciones normales y patológicas controlan el crecimiento del epitelio mamario. Si bien el 75% de los cánceres de mama poseen los dos marcadores, siendo que por lo general aquellos que son RE+ suelen ser RP+, usualmente son los menos agresivos y grandes candidatos a responder a una terapia hormonal. Por el contrario, aquellos que solo presentan uno de estos, suelen ser más agresivos y su respuesta a este tipo de terapia no es tan efectiva. Por otro lado, un tercer tipo de cáncer se basa en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano o HER2. Los cánceres HER2+ representan aproximadamente el 15% de los cánceres de mama y se los relaciona con una alta agresividad y mal pronóstico. Para este tipo de cáncer mamario existe una terapia dirigida anti-HER2 cuyo nivel de respuesta suele ser elevado. Por último, puede observarse que, en ciertos tipos de tumores mamaros, las células no expresan ninguno de los 3 receptores antes mencionados. A estos se los denomina cánceres de mama triple negativo o CMTN y poseen una incidencia de entre el 10% y el 15% (Wu & Hicks, 2021). El CMTN es el tipo más agresivo y de peor pronóstico, para el cual el tratamiento asignado es la utilización de terapias estándar, puesto que aún no se ha encontrado un tratamiento dirigido.

La utilización de nuevas tecnologías de alto rendimiento para el diagnóstico permitió caracterizar aún más los diferentes tipos de carcinomas mamaros existentes basándose en características moleculares. En este sentido, analizando la expresión de ciertos *clusters* de genes se definieron 5 nuevos subtipos. En primer lugar, aquellos tumores RE+ pueden ser



subdivididos en **Luminal A** y **Luminal B** según la expresión de genes relacionados al receptor de estrógenos. El tipo de cáncer mamario Luminal A representa entre 40% y el 50% de los cánceres RE+ y generalmente son de menor grado y de mejor pronóstico. En cuanto al tipo Luminal B, presenta menor sobreexpresión de los genes relacionados al receptor de estrógenos, pero mayor expresión de aquellos relacionados a la proliferación. Por lo general, a este subtipo se lo asocia a un grado mayor y un peor pronóstico comparado con los del subtipo Luminal A y a diferencia de este último, suele precisar de quimioterapia adicional a la terapia hormonal.

Por otro lado, la **sobreexpresión del receptor HER2** determina otro subtipo que se caracteriza por ser de alto grado y más agresivos, y no siempre son clínicamente HER2+. Este tipo de carcinoma mamario tiene una incidencia del 15% y a su vez pueden ser ER+ y por ello, en esos casos, se los clasifica como Luminal B.

Los tumores mamaros del **tipo basal** poseen una expresión normal de los genes comúnmente expresados en el epitelio mamario, pero carecen de la expresión de los receptores hormonales y del HER2. Es por ello, que se los clasifica dentro del subtipo CMTN y usualmente se corresponden a un cáncer de alto grado, con una elevada proliferación y mal pronóstico.

Por último, existen carcinomas mamaros que expresan genes de tejido adiposo y otros tejidos estromales, al mismo tiempo que son ER y PR positivos. A este subtipo, se lo denomina cáncer de mama de **tipo normal** y posee bajo índice de proliferación.

Muchos otros subtipos han sido identificados basándose en la presencia de diferentes moléculas y metabolitos como cánceres de mama bajo en Claudina, apócrino molecular y rico en interferón. A diferencia de los demás, estos son raros y se encuentran representados dentro de los mencionados anteriormente. A su vez, carecen de una firma molecular determinada por lo que aún no son identificados como tipos independientes (Tsang & Tse , 2019; Yeo & Guan, 2017).

### 2.3.3 Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo o CMTN es uno de los subtipos de carcinoma mamario más heterogéneo, de comportamiento clínico agresivo y con uno de los peores

pronósticos. Asimismo, posee un alto índice de recidiva, baja supervivencia y amplias probabilidades de metastatizar otros tejidos, lo que termina por clasificarlo generalmente como un carcinoma de alto grado. Una gran mayoría, alrededor de un 80% (dependiendo de la bibliografía), de los CMTN pertenecen al subtipo basal. De la misma manera, no todos los cánceres basales van a ser triple negativos, estos últimos definidos por técnicas de inmunohistoquímica (Breastcancer.org, 2021; Wu & Hicks, 2021).

Debido a que aún no existen terapias dirigidas contra el CMTN aprobadas por la FDA, la terapia estándar utilizada o *standard of care* continúa siendo la quimioterapia. A pesar de tener un efecto positivo de disminución del tamaño tumoral y contra la enfermedad en general, posee varios efectos adversos ya que no solo resulta citotóxica para las células cancerígenas, sino para todas las células que componen los tejidos sanos. A su vez, al igual que con la radioterapia, la quimioterapia puede en algunos casos, generar resistencia al tratamiento (Wu & Hicks, 2021).

Teniendo en cuenta una clasificación basada en la expresión diferencial de ciertos *clusters* de genes se pueden identificar cuatro subtipos de CMTN, entre los cuales se encuentran: los cánceres con expresión del receptor de andrógenos luminal (LAR), el tipo basal 1 (BL1), el tipo basal 2 (BL2) y el mesenquimal (MES) (Lehmann y col., 2016; Provenzano y col., 2018).

El subgrupo LAR se caracteriza por la alta expresión del receptor de andrógenos y por lo tanto, puede ser regulado hormonalmente. Suelen tener una mejor respuesta al tratamiento con posibilidad de ser tratada tanto con quimioterapia neoadyuvante como con agentes antiandrogénicos. Por otro lado, los carcinomas basales se ven enriquecidos en la expresión de genes involucrados en la proliferación y la reparación del ADN (BL1); y en la señalización vía receptor del factor de crecimiento, glucólisis y gluconeogénesis, junto con marcadores mioepiteliales (BL2). Ambos son tratados con quimioterapia, pero en lo que respecta al subtipo BL2, el tratamiento demuestra tener menor efectividad. Por último, el tipo de cáncer de mama Mesenquimal presenta una sobreexpresión de los genes involucrados en la motilidad, la diferenciación, las vías de señalización de crecimiento y moléculas involucradas en interacciones con la MEC. A su vez presenta baja expresión de genes relacionados a la

proliferación y supervivencia libre de progresión luego de ser expuesto a quimioterapia (Lehmann y col., 2016; Provenzano y col., 2018; Sporikova y col., 2018).

## **2.4 Tratamientos del Cáncer de mama triple negativo**

Dada la variada heterogeneidad que presenta el CMTN, y gracias a la profunda investigación y caracterización de los diferentes subtipos, se han logrado alcanzar tanto terapias sistémicas como locales.

Las terapias sistémicas son aquellas en las que el tratamiento no posee un efecto localizado, sino que por lo general es administrado vía oral, o directamente al torrente sanguíneo, y todo el cuerpo se ve afectado por la misma. Según el subtipo de carcinoma mamario se puede tener terapias dirigidas, como las terapias hormonales para aquellos cánceres de mama RE+, RP+ y/o HER2+, o terapias inespecíficas como la quimioterapia, altamente utilizada en CMTN.

Por otro lado, las terapias locales son aquellas en las que generalmente el tumor es lo suficientemente pequeño para circunscribir la terapia al sitio en donde este se encuentra, sin afectar otros tejidos. El más común entre ellos, es la cirugía en la cual se trata de extraer todas las células tumorales y tejidos circundantes afectados para evitar una reaparición del tumor en la zona, o recidiva local. Por lo general, este procedimiento suele estar precedido por radioterapia, aunque también puede ser aplicado luego de la cirugía.

El tipo de tratamiento a utilizar dependerá del tipo de cáncer mamario, su etapa, características moleculares y cualquier otra consideración clínica que deba tomarse en cuenta, además de la preferencia del paciente. A continuación, se profundizará en los distintos tratamientos (American Cancer Society, 2021).

### **2.4.1 Cirugía**

En la mayoría de las mujeres con cáncer de mama se emplea algún tipo de cirugía como parte del tratamiento. La cirugía es un tratamiento localizado y se emplea como terapia única o acompañada de radioterapia u otros tratamientos sistémicos. En primer lugar, existen dos tipos

de cirugías al momento de extraer el tumor. En este sentido, se puede extraer únicamente el tejido dañado de la glándula mamaria, extrayendo, a su vez, parte del tejido circundante sano para asegurar eliminar todas las células cancerígenas. Como se mencionó anteriormente, este procedimiento suele estar acompañado de radioterapia. Por otra parte, se puede optar por realizar una mastectomía que conlleva extirpar la mama completa. Esta última práctica, se suele dar en aquellas mujeres en las que el tumor presenta un tamaño considerable o en casos en los que hay sospechas de que la enfermedad se ha extendido a tejidos adyacentes. En etapas tempranas de la enfermedad, realizar cualquiera de los dos tipos de cirugías resulta equivalente en cuanto a la supervivencia y progresión en los pacientes.

Por otro lado, en ciertos casos se procede a extraer los ganglios linfáticos axilares para evaluar si los mismos se encuentran comprometidos, lo que en caso de ocurrir evidenciaría un grado de avance mayor de la enfermedad. De esta manera, se puede extraer y realizar una biopsia del ganglio linfático centinela (SLNB) – ganglio axilar más próximo al tumor – hacia el cual el cáncer tendería a extenderse en primera instancia; o se puede proceder a la disección de varios ganglios linfáticos axilares (ALND) y así evaluar el estado de la enfermedad. En ambos casos, suelen estar precedidas por radioterapia, al igual que ésta puede ser indicada como postratamiento. En las cirugías en las que se extrae únicamente el ganglio centinela, si el mismo estuviese comprometido, se somete al paciente a un análisis ALND. Nuevamente, dichas cirugías no presentan diferencias en relación a la supervivencia de los pacientes (American Cancer Society, 2021; Waks & Winer, 2019).

## 2.4.2 Radioterapia

La radioterapia (RI) se basa en la exposición del tejido dañado, en este caso las células tumorales, a rayos de alta energía que dañan al ADN ralentizando e incluso impidiendo el crecimiento del tumor, eliminando las células cancerígenas que se encuentran en constante división. Como se mencionó anteriormente, la radioterapia se usa como adyuvante o neoadyuvante para las cirugías conservadoras del seno y mastectomías. La RI puede ser aplicada a una porción del tejido, generalmente el sitio donde se realizó la cirugía, pared torácica y nodos linfáticos regionales, o puede ser aplicada al seno en su totalidad (Fisher, 2002; Waks & Winer, 2019). Existen dos tipos de radioterapia según en donde se encuentre la fuente de

radiación. Por un lado, la radioterapia de haz externo emite los rayos de alta energía desde un equipo fuera del cuerpo que puede emitir haz de fotones protones o electrones. Por otro lado, la radioterapia puede ser aplicada de forma interna, en donde la fuente de radiación se encuentra dentro del cuerpo del individuo, y puede ser sólida o líquida (National Cancer Institute, 2021). La radioterapia puede llegar a ser efectiva en ciertos tipos de cánceres de mama en cuanto a que reduce las probabilidades de recidiva, mejorando la supervivencia y reduciendo la mortalidad de las pacientes (Hausmann y col., 2020; Waks & Winer, 2019; Shah y col., 2020). Sin embargo, la RI para el tratamiento de CMTN, a pesar de ejercer cierto control sobre el tumor localmente, suele estar asociado a una baja eficacia debido a la generación de resistencia y a una pronta recidiva (He y col., 2018).

### 2.4.3 Quimioterapia

El uso de agentes quimioterapéuticos como terapia sistémica contra el cáncer es inespecífica y afecta a todas las células del individuo. Se basan en la premisa de que las células cancerígenas tienen una tasa de duplicación más elevada que las células normales, por lo que generalmente, la quimioterapia tiene como objetivo inhibir elementos que estén involucrados en el proceso de división celular. En este sentido, se utilizan antraciclinas como la doxorrubicina (*Adriamycin*®) y la epirubicina (*Ellence*®) que se unen al ADN interfiriendo con su duplicación; taxanos como el paclitaxel (*Taxol*®) y el docetaxel (*Taxotere*®) que inhiben el funcionamiento de los microtúbulos en la división celular; Análogos de pirimidinas como el 5-fluorouracilo (5-FU) que inhibe la síntesis de ciertos ácidos nucleicos; ciclofosfamida (*Cytosan*®), un agente alquilante que daña al ADN; derivados del platino como el cisplatino y carboplatino (*Paraplatina*®) que alteran la estructura del ADN impidiendo su transcripción y duplicación; capecitabina (*Xeloda*®) y gemcitabina (*Gemzar*®), antimetabolitos que al tener estructura similar con intermediarios metabólicos alteran el normal metabolismo de la célula; y otros inhibidores de microtúbulos como ixabepilona (*Ixempra*®), Eribulina (*Halaven*®) y Vinorelbina (*Navelbine*®). Por lo general, en la quimioterapia ninguno de ellos es utilizado como droga única, sino que se suministra un cóctel de quimioterapéuticos al paciente.

Debido a la falta de marcadores específicos y, por ende, de terapias dirigidas, en CMTN la quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos continúa siendo el estándar de tratamiento (American Cancer Society, 2021).

### 2.4.3 I Paclitaxel

El Paclitaxel (PTX) es el taxano más frecuentemente utilizado en quimioterapias tanto como tratamiento único, como en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Fue descubierto en 1964 y aprobado por la FDA en 1999 para el tratamiento de cáncer de mama (Weaver, 2014). Como se mencionó anteriormente, el PTX es un estabilizante de microtúbulos, que inhibe la división celular al afectar la correcta segregación cromosómica. Asimismo, altera las vías de señalización en las que interviene el calcio, y sobre todo en la mitocondria, dando lugar a la liberación del citocromo C, factor que desencadena el proceso de apoptosis. A su vez, afecta la expresión de micro-ARNs que regulan el perfil de expresión génica en general, aumentando aquellos con potencial actividad antitumoral y antiangiogénico. Por último, posee también efectos inmunomoduladores, suprimiendo o activando determinadas células del sistema inmune.

La quimioterapia para el tratamiento de CMTN puede ser administrada por vía intravenosa o de forma oral. Esta se puede aplicar como adyuvante, es decir, ser utilizada luego de realizada la cirugía para reducir las probabilidades de recidiva de la patología, o como neoadyuvante. En este último caso, la quimioterapia es administrada previo a la intervención quirúrgica con el fin de aumentar las probabilidades del individuo de entrar en el régimen de una cirugía conservadora de seno y no una mastectomía, al reducir el tamaño tumoral y de los ganglios linfáticos comprometidos (Chaudhary y col., 2018).

A pesar de ser uno de los taxanos más utilizados, el PTX posee varios efectos adversos que limitan su aplicabilidad al igual que su efectividad (Samaan y col., 2019). Entre las complicaciones más severas se encuentra la hipersensibilidad y la neuropatía sensorial que se producen por la utilización de un vehículo de aceite de ricino, un solvente polioxil a base de lípidos. Comercialmente se lo denomina *Cremophor*®, y se le asocia el deterioro del sistema de entrega de la droga y la baja de eficiencia de la misma (Yamamoto & Kawano, 2011; Vishnu

& Roy, 2011; Ma & Mumper, 2013). Este vehículo se utiliza para contrarrestar la baja hidrosolubilidad del PTX alargando la vida media del taxano y aumentando las probabilidades de alcanzar el tumor. A su vez, la administración de PTX tiene efecto citotóxico sobre el hígado, puede causar hemólisis, neutropenia y neutropenia febril por lo que el paciente puede verse expuesto a diversas infecciones. Además, en algunas ocasiones, el agente quimioterapéutico puede acumularse y formar micelas polares, lo cual altera la farmacocinética del mismo en el torrente sanguíneo, afectando su actividad terapéutica (Vishnu & Roy, 2011). Por último, la administración de PTX se la relaciona con afecciones cardíacas, nuevamente debido al uso de *Cremophor*® como vehículo de la droga (Bristow y col., 1980; Rowinsky y col., 1991).

Debido a todos los efectos adversos mencionados anteriormente es preciso encontrar terapias dirigidas y específicas contra los tumores, o en su defecto mejorar la biodistribución y la eficacia de los tratamientos ya aprobados por la FDA. En este sentido, se han desarrollado diversos sistemas de *delivery* para la droga (DDS) como el nab-Paclitaxel (Abraxane®) aprobado en 2005 para el tratamiento de cáncer de mama (Yamamoto & Kawano, 2011). El nab-Paclitaxel es un nanosistema de PTX asociado a albúmina que mejora el índice terapéutico del mismo a la vez que alivia alguno de los efectos secundarios que posee en su estado libre, sobre todo aquellos asociados al *Cremophor*®, como la hipersensibilidad. La albúmina mejora su estabilidad en el torrente sanguíneo y facilita su ingreso a las células tumorales mediada por la glicoproteína SPARC altamente expresada en cáncer de mama. Aun así, con estos beneficios, efectos adversos como neuropatías, neutropenias y neutropenia febril continúan presentándose en los pacientes a los que se les administra la quimioterapia (Ibrahim y col., 2005; Samaan y col., 2019).

Como sucede con la radioterapia, algunos individuos pueden presentar resistencia a la quimioterapia la cual puede ser adaptativa, por la selección de clones preexistentes, o adquirida mediante mutaciones inducidas por el mismo tratamiento (Kim y col., 2018). Sin embargo, en los casos en los que se la utiliza como neoadyuvante, entre el 30% y el 40% de los pacientes logran alcanzar una respuesta patológica completa (pCR), sin evidencias de células tumorales al momento de la cirugía. Los carcinomas mamarios BL1 son el subtipo de CMTN con mayor probabilidad de alcanzar una pCR utilizando quimioterapia neoadyuvante. Mientras que, los

subtipos LAR y BL2 presentan baja respuesta al tratamiento. En aquellos pacientes donde no se logra eliminar por completo las células cancerígenas se observa una mayor probabilidad de recidiva y de progresión a un estadio metastásico (Lehmann y col., 2016).

En la actualidad nuevas terapias y DDS están siendo investigadas para lograr mejorar el índice terapéutico obtenido por los tratamientos estándares predominantes. A su vez, la búsqueda de marcadores moleculares sigue siendo una importante tarea para un mejor diagnóstico y elección del régimen más adecuado para cada paciente con CMTN (Lyons, 2019). A continuación, se presentan tratamientos novedosos que están siendo investigados y desarrollados en la actualidad.

#### **2.4.4 Respuesta antitumoral e Inmunoterapia**

Como se mencionó anteriormente, la evasión del sistema inmune por parte del tumor se presenta como uno de los sellos distintivos del cáncer descritos por Hannan y Weinberg. Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo intervienen en el desarrollo, progresión y control del tumor. El infiltrado tumoral y su composición dentro del microambiente tumoral pueden dar indicios del pronóstico y la respuesta que se obtendrá a determinadas terapias. Los linfocitos T citotóxicos (LTC) y las células NK suele relacionarse a un mejor pronóstico debido a que los LTC reconocen neoantígenos presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase uno (MHC1) en la superficie de las células tumorales, a partir del cual desarrollan su actividad citotóxica. Por otro lado, aquellos tumores que evaden a los LTC por disminuir la presencia de MHC1 en superficie, entre otras cosas, son reconocidos por las células NK y marcados para su eliminación (Hanahan & Weinberg, 2011; Galluzzi y col., 2015; Barzaman y col., 2020).

En el proceso hacia la evasión del sistema inmune existen tres etapas. En primer lugar, se produce una respuesta en contra de las células tumorigénicas. El sistema inmune innato las reconoce y luego desarrolla una segunda respuesta adaptativa más específica. Luego se pasa a una etapa de equilibrio o inactividad en la cual las células tumorales que logran escapar de la inmunovigilancia comienzan a progresar y expandirse, pero de forma restringida por la respuesta inmunológica que se produce al mismo tiempo. Por último, en el estadio de escape,



se seleccionan aquellos clones tumorales capaces de evadir estas respuestas debido a su progresión y eliminación de aquellos inmunosensibles (Galluzzi y col., 2015).

En la primera etapa de eliminación, los LTC, las células T *helper* o CD4<sup>+</sup> y las células NK predominan entre las células infiltrantes del tumor. Sin embargo, más tarde en la etapa de escape, se produce una inflamación crónica en el microambiente tumoral, la cual se caracteriza por la presencia de células y factores inmunosupresores, que aumentan el efecto inmunoresistente del tumor y favorecen la progresión del mismo. Entre los elementos que atenúan la respuesta inmune se encuentran las células Treg, las MDSCs, y la secreción de factores atenuantes de la actividad inmune como TGF- $\beta$  y IL-10 (Barzaman y col., 2020; Hanahan & Weinberg, 2011).

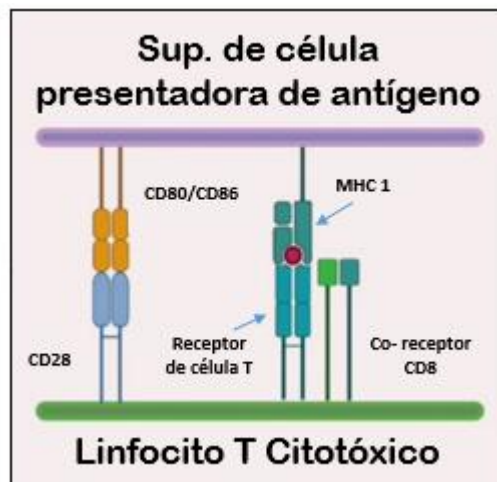
A su vez, la expresión de puntos de control inmunológico, como el antígeno 4 del linfocito T citotóxico o CTLA-4, la proteína de muerte programada o PD1 y su ligando PDL1, que normalmente evitan que las células del sistema inmune reconozcan y ataquen a las células sanas, se ve aumentada en las células tumorales.

Todas estas características promueven la progresión tumoral y el desarrollo de un tumor inmunoresistente. Tratar de buscar estrategias terapéuticas que promuevan la activación y acción del sistema inmune teniendo en cuenta estas características tumorales es realmente importante y prometedor. Es por ello que, por ejemplo, existen diversas inmunoterapias dirigidas a bloquear las interacciones de los puntos de control inmunitario con sus respectivos receptores y ligandos antes mencionados, haciendo más eficiente la respuesta antitumoral natural (Galluzzi y col., 2015; Barzaman y col., 2020; Hanahan & Weinberg, 2011; Emens, 2017).

#### **2.4.4 I Inhibidores del Antígeno 4 de Linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)**

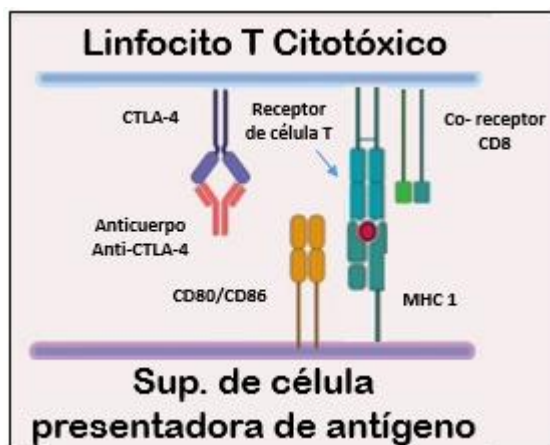
El CTLA-4 es un antígeno expresado constitutivamente en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que se ve aumentado luego de la activación de los mismos tras la exposición a un antígeno. Esta molécula compite con el *cluster* de diferenciación 28 (CD28) por la unión con el *cluster* de diferenciación 80 y 86 (CD80/86 o B7.1/B7.2), presente en la superficie de la célula contraria que se encuentra presentando un antígeno en el MHC1 (**Figura 4**). Si el CTLA-

4 logra unirse al CD80/86 la célula T es suprimida evitando la generación de una respuesta. En caso de que el CD80/86 logre unirse con el CD28, el linfocito T se activa y prolifera. Este mecanismo evita que pueda ocurrir una respuesta exacerbada de las células T que puedan originar respuestas inmunológicas en contra de tejidos sanos (Walunas y col., 1994; Mediratta y col., 2020).



**Figura 4.** El cluster de diferenciación 80/86 (CD80/86) en la superficie de la célula presentadora de antígeno y el cluster de diferenciación 26 (CD26) son dos moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de la célula T y su proliferación. Extraída y adaptada de (Mediratta y col., 2020).

En la mayoría de los tumores, el CTLA-4 se ve altamente expresado por células Treg que inhiben la actividad de los linfocitos T citotóxicos que reconocen los neoantígenos presentados por el MHC1 en su superficie. Por ello, el bloqueo del CTLA-4, a través de una terapia basada en anticuerpos, surge como una estrategia para aumentar la actividad propia del sistema inmune y promover la eliminación de los tumores capaces de ser reconocidos (**Figura 5**). Actualmente, existen dos terapias con anticuerpos anti-CTLA-4: *ipilimumab* desarrollado por *Bristol-Mayers Squibb* y aprobada en 2011 por la FDA, y *tremelimumab* que aún se encuentra en fase de aprobación. Ambas aún son investigadas para el tratamiento de cáncer de mama, como monoterapias o en combinación con otras drogas, y han demostrado gran eficacia en el tratamiento de varios tipos de cánceres (Mediratta y col., 2020; Emens, 2017; Chae y col., 2018).



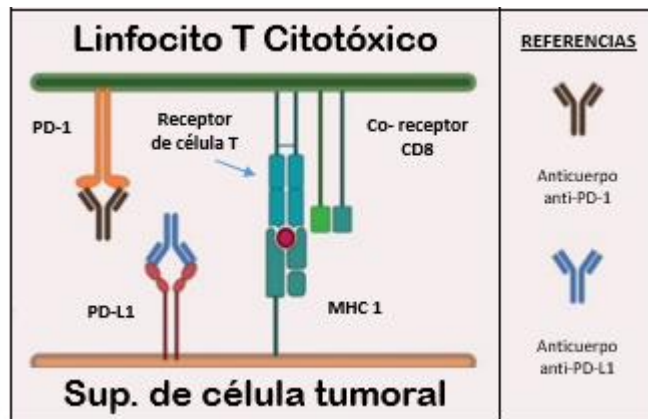
*Figura 5. Ilustración del bloqueo del CTLA-4 por anticuerpos anti-CTLA-4 que inhibe la supresión inmunológica dada por la inactivación de linfocitos T. Extraída y adaptada de (Mediratta y col., 2020).*

#### 2.4.4 II Inhibidores de PD-1/PD-L1

PD-1 es una molécula expresada en la superficie de la membrana plasmática de células mieloides, linfocitos B y por sobre todo células T citotóxicas y cumple la función de inhibir la respuesta inmune por parte de los LTC al evitar su activación, proliferación y liberación de factores pro-inflamatorios. Esta función es ejercida mediante la expresión del ligando de PD-1, PD-L1, presente en varios tipos celulares, en especial células hematopoyéticas, leucocitos, células del parénquima y células tumorales (Chae y col., 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, PD-L1 se encuentra sobreexpresado en ciertos tumores y en particular en CMTN, por lo que el desarrollo de inmunoterapias dirigidas al bloqueo de la interacción entre PD1 y su ligando es de gran relevancia (Mediratta y col., 2020) (**Figura 6**). En la actualidad la FDA ha aprobado distintas terapias basadas en anticuerpos anti-PD1 (*nivolumab*, *pembrolizumab* y *cemiplimab*) y anti-PD-L1 (*durvalumab*, *avelumab* y *atezolizumab*). Por otro lado, ya existen tratamientos combinados con quimioterapéuticos aprobados por la FDA como la administración de *atezolizumab* y nab-paclitaxel, mientras que su combinación con otras drogas y demás inmunoterapias aún están siendo investigadas (Palleschi y col., 2019; Lyons, 2019).

Los beneficios obtenidos por el uso de inhibidores de PD-1/PD-L1, varían desde la reducción del tamaño tumoral, hasta una mayor sobrevida libre de progresión y supervivencia global. Las neoplasias en las que se han observado mejores resultados son aquellas en las que la gran cantidad de mutaciones permite un mayor infiltrado inmune del tumor y en las que PD-L1 se ve sobreexpresado. Los carcinomas mamarios no suelen exhibir estas características, pero se ha demostrado que el CMTN presenta gran acumulación mutacional y un elevado porcentaje de infiltrado inmune comparado con otros subtipos. De esta forma, este tipo de inhibidores poseen un gran potencial para el tratamiento de CMTN en estadios tempranos (Palleschi y col., 2019; Azim y col., 2019).



**Figura 6.** Anticuerpos Anti-PD-1 o anti-PD-L1 previenen la unión entre PD-1 y PD-L. Por lo tanto, se inhibe la señal supresora y se promueve la inmunidad antitumoral. Extraída y adaptada de (Mediratta y col., 2020).

### 2.4.4 III Inhibidores de PARP

Todas las células poseen mecanismos de reparación del ADN para poder afrontar eventuales rupturas de doble hebra (DSB) y de simple hebra (SSB) ocasionadas durante el ciclo de vida de la misma. Una de las características inherentes a los tumores es su inestabilidad genómica que se produce debido a la ineficiencia de los mecanismos de reparación. Esta inestabilidad produce la progresiva acumulación de mutaciones que pueden alterar parte de la información genética vital de una célula codificada en el ADN, que finalmente conduce a las mismas a la transformación maligna (Hanahan & Weinberg, 2011).

De entre las varias proteínas involucradas en la reparación del ADN se encuentra la enzima polimerasa poli-adenosin difosfato ribosa o poli-ADP ribosa, que pertenece a la familia de proteínas PARP. La misma se encarga de la correcta recomposición de la información genética dañada en situaciones de SSB. Su deficiencia no incurre en la muerte de la célula, sino en la ruptura de doble cadena al momento de su replicación. En estos casos, existen mecanismos que pueden remediar esta situación, pero en los tumores en los que a su vez se encuentran mutados dichos mecanismos, como BRCA1 y BRCA2, la restauración de la información genética recae en el proceso de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esta vía de reparación, es una vía inespecífica que frecuentemente produce errores en el proceso de recuperación de la información por lo que tras varios ciclos de replicación dicha inestabilidad genómica puede causar la progresión tumoral y, con mayor frecuencia, la muerte celular (Azim y col., 2019; Waks & Winer, 2019).

Es por ello que, la administración de *olaparib* y *talazoparib*, dos inhibidores de PARP, se presentan como tratamientos de gran efectividad para el tratamiento de carcinomas con mutaciones en BRCA1 y BRCA2. En CMTN, aproximadamente el 20% de los tumores presentan dichas características (Lyons, 2019).

## 2.5 Histamina

La histamina, también llamada 2-(4-imidazolil)-etilamina o  $\beta$ -aminoimidazol, es una bioamina imidazólica la cual fue descubierta en 1910 debido a sus propiedades vasoactivas. La histamina está compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino y es sintetizada mediante la decarboxilación del aminoácido L-histidina.

La misma se encuentra involucrada tanto en procesos biológicos como en procesos patológicos. Hoy en día se la reconoce por cumplir varias funciones entre las que se destaca su rol como regulador digestivo, neuronal e inmunológico, su participación en reacciones alérgicas en la piel, inflamación séptica y como neurotransmisor. Asimismo, se la ve involucrada en la proliferación células, diferenciación y funcionalización durante desarrollo embrionario y crecimiento tumoral, entre otras cosas (Blaya y col., 2010; Schneider y col, 2002; Medina & Rivera, 2010).

La histamina es sintetizada por la enzima histidina decarboxilasa (HDC) y aunque se encuentra expresada en una variedad de células hematopoyéticas - excepto por el linaje eritrocítico y megacariocito – se produce y almacena principalmente en mastocitos y basófilos. Los demás tipos celulares derivados de células hematopoyéticas, en ciertas circunstancias, presentan expresión de HDC pero carecen de la capacidad de almacenar la histamina producida y, por lo tanto, la misma es liberada de forma inmediata. Diversos estudios han demostrado que en ciertos tumores la expresión de HDC se ve disminuida. Una elevada expresión del mismo se encuentra asociada a una mejor sobrevida libre de progresión en los pacientes. Por el contrario, la disminución de la actividad de la HDC puede verse implicada en la progresión tumoral y un peor pronóstico de la enfermedad. En CMTN, la expresión del ARNm de la HDC se ve reducida en comparación con otros subtipos de carcinoma mamario (Nicoud y col., 2020a).

La actividad de la HDC está altamente regulada por diversos estímulos entre los que se presenta la exposición de antígenos foráneos, diversas citoquinas, hormonas y demás factores de crecimiento como GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-3, IL-18, IL-12, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), lipopolisacáridos (LPS), progesterona, estradiol, gastrina, entre otras (Schneider y col., 2002; Blaya y col., 2010; García-Martín y col., 2009).

El metabolismo de la histamina tiene lugar en el hígado y los riñones. En este proceso, se ven involucradas varias enzimas, entre ellas, la enzima diaminoxidasa (DAO) o histaminasa que cataliza la transformación de la histamina a ácido imidazol acético (ImAA). Sin embargo, el 70% del metabolismo de la histamina se lleva a cabo mediante la vía de la histamina N-metiltransferasa (HNMT), una enzima que se encarga de transferir un grupo metilo para obtener así metilhistamina. Eventualmente, subsiguientes oxidaciones darán lugar a la generación de ácido tele-metilimidazol acético (MeImAA). Tanto ImAA como MeImAA serán luego excretados por la orina (Blaya y col., 2010; Lieberman, 2011; Schneider y col., 2002).

### **2.5.1 Receptores de histamina**

El pleiotropismo que presenta la molécula de histamina se debe a que su función biológica se encuentra mediada por 4 receptores histaminérgicos distintos (H1, H2, H3 y H4) en la superficie de numerosos tipos celulares. Cada uno de ellos pertenece a la familia de

receptores *rodopsin-like* acoplados a proteínas G (GPCR) compuestos por 7 dominios transmembrana. Estos receptores en presencia de histamina pasan a una conformación activa mientras que, en presencia de sus antagonistas, los antihistamínicos, se comportan como receptores inactivos (Lieberman, 2011).

El **RH1** se encuentra presente en varios tipos celulares como células del sistema inmune, células endoteliales de los vasos sanguíneos y células nerviosas sensoriales, entre otras (Lieberman, 2011; Schneider y col., 2002). Está conformado por 491 aminoácidos y tiene un peso molecular de 56 kD. Asimismo, pertenece a la familia de GPCR, más específicamente al subtipo  $G_{\alpha q/11}$ , ejerciendo su función de señalización y actividad mediante la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular presente en el retículo endoplasmático. Cuando el receptor es activado, la fracción intracelular del receptor media la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) que cataliza la conversión de fosfoinositol2-fosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Más tarde, el IP3 que posee gran afinidad por ciertos receptores en la membrana del retículo endoplásmico, interactúa con los mismos liberando el calcio almacenado. Finalmente, el  $Ca^{2+}$  activa proteínas que se ven involucradas en la proliferación y supervivencia celular (Blaya y col., 2010).

Por otra parte, este receptor se ve involucrado en la permeabilidad vascular, la estimulación de los nervios sensoriales presentes en las vías respiratorias, la contracción del músculo liso y la quimiotaxis de eosinófilos. De esta manera, se deduce que se ve implicado en la hipersensibilidad, reacciones alérgicas y procesos de inflamación (Lieberman, 2011; García-Martín y col., 2009; Blaya y col., 2010).

El **RH2** es un receptor heptamérico transmembrana conformado por 359 aminoácidos. Pertenece al subtipo  $G_s$  de GPCR, por lo que, su vía de señalización se basa en la acumulación y producción, por parte de la adenilato ciclasa, de AMPc como segundo mensajero. A su vez, tiene la capacidad de generar IP3, que como se mencionó anteriormente, libera  $Ca^{2+}$  intracelular. Ambos sistemas de señalización están acoplados a mecanismos dependientes de GTP (Schneider y col., 2002; Blaya y col., 2010).

En cuanto a su localización, el RH2 es principalmente encontrado en el tejido cerebral, estómago, corazón y músculo liso. De esta manera, primordialmente se ve involucrado en la proliferación celular, secreción de ácido gástrico, relajación del músculo liso presente en las vías respiratorias y en los vasos sanguíneos. A su vez, se ha descrito su presencia en ciertas células del sistema inmune, y está involucrado en la quimiotaxis de basófilos, inhibición de la síntesis de anticuerpos, la proliferación de células T y su actividad citotóxica, y la producción de citoquinas, entre otras (Lieberman, 2011; Blaya y col., 2010).

El **RH3** es un receptor acoplado al subtipo Gi/o de proteína G, por lo que su estimulación produce una disminución de la actividad de la protein kinasa A (PKA) y de la expresión génica mediada por CREB, debido a la regulación negativa de la adenilato ciclasa. Por el contrario, su señalización intracelular es llevada a cabo a través de las vías proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) (Blaya y col., 2010; Schneider y col., 2002).

El RH3 se encuentra mayormente expresado en el sistema nervioso central (nervios histaminérgicos) y periférico (sistema simpático adrenérgico), en terminales presinápticas. En estos sitios cumplen la función de inhibir la producción y secreción de histamina, al mismo tiempo en que regulan la liberación de otros neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina y ácido aminobutírico (GABA). Adicionalmente, se la ve involucrada en la estimulación de las glándulas de la submucosa nasal (Lieberman, 2011; Pearsons & Ganellin, 2006; García-Martín y col., 2009).

Por último, el **RH4**, al igual que los demás, es un receptor heptamérico transmembrana acoplado a proteína Gi/o, compuesto por 390 aminoácidos. Comparte entre un 37% y un 43% de homología con el RH3 por lo que al igual que este último, su activación disminuye la concentración de AMPc intracelular mientras que estimula las vías de señalización de MAPK y PLC con movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Schneider y col., 2002; Massari, 2018 y col.; Pearsons & Ganellin, 2006).

El RH4 fue el último subtipo de la familia de receptores de histamina descubierto hasta el momento y está presente en células hematopoyéticas periféricas y de la médula ósea. Entre



ellas, se encuentran los eosinófilos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, linfocitos B y T. De esta manera, el RH4 se ve involucrado en la quimiotaxis de mastocitos y eosinófilos, en particular, al sitio de inflamación. Asimismo, otras células del sistema inmune son atraídas a través la inducción a la expresión de moléculas de adhesión como MAC-1 y la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) mediada por el RH4 (Blaya y col., 2010; Lieberman, 2011).

En tejidos periféricos, por ejemplo, el bazo, médula ósea y el timo, los niveles de expresión del RH4 pueden variar en presencia de estímulos inflamatorios, regulando la respuesta inmunológica (García-Martín y col., 2009; Sterle y col., 2019).

### **2.5.2 Histamina e inmunidad tumoral**

Varios tipos celulares y moléculas componen el microambiente tumoral (TME), proveyendo al tumor de un entorno favorable para su progresión. Tomar al TME como objeto de estudio y entender qué elementos se ven involucrados y promueven su progresión se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes en la búsqueda de nuevas terapias para combatir el cáncer.

En varios estudios se ha demostrado que la histamina se encuentra en elevadas concentraciones e involucrada en varios eventos a lo largo del desarrollo tumoral como por ejemplo en la carcinogénesis de tejidos, la invasión tisular, la migración, y la angiogénesis. Asimismo, la expresión de los receptores de histamina se ha visto aumentada en gran parte de las subpoblaciones celulares que componen al tumor y su TME. De esta manera, tanto el metabolismo de la histamina, como los demás componentes del microambiente tumoral y el receptor involucrado, son factores importantes a tener en cuenta a la hora de estudiar la progresión tumoral. Es por ello que se ha planteado a la histamina como un posible marcador pronóstico de la patología (Sterle y col., 2019; Nguyen & Cho, 2021).

Como se mencionó anteriormente distintas células estromales e inmunitarias componen el TME. La gran mayoría de ellas, al igual que las células tumorales, expresan en mayor o menor medida alguno o algunos de los 4 subtipos de receptores de histamina. A través de la

activación de los mismos, la histamina ejerce sus funciones inmunomoduladoras (Sarasola y col., 2021).

En el caso de los mastocitos, que se presentan como las células con mayor producción y almacenamiento de histamina (Derakhshani y col., 2019), pueden promover el desarrollo tumoral al beneficiar el proceso de angiogénesis mediante la liberación de factores como histamina, VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 entre otros. Contrariamente, poseen actividad antitumoral mediante la activación de distintas células del sistema inmune. Además, a través de la liberación de la histamina recluta mayor cantidad de mastocitos al sitio tumoral y amplifica la respuesta inflamatoria la cual puede progresar a un estadio crónico. La quimiotaxis de los mastocitos al sitio tumoral ha probado ser mediada por la estimulación del RH4 (Hofstra, 2003; Sarazola y col., 2021; Branco y col. 2018; Nguyen & Cho, 2021).

Por otro lado, la histamina también interfiere con la actividad de los linfocitos T tanto CD8+ (citotóxicos o LTC) como T *helper* CD4+ (Th 1 y 2) y Treg. Todos ellos expresan de forma constitutiva la mayoría de los receptores histamínicos. En mayor medida los Th1 expresan RH1 y los Th2 el RH2 (Okeke & Uzonna, 2019). Al unirse el RH1 en las células Th1, estimula la activación de otras células inmunitarias como las T citotóxicas y NK, al mismo tiempo que aumenta la expresión del MHC, elevando la eficiencia en la presentación de antígenos. Por el contrario, cuando la histamina estimula el RH2 presente en las células Th2 ejerce un efecto protumoral al inhibir a las Th1 y a las mismas Th2 (Oldford & Marshall, 2015). En algunos tipos de cáncer como el colorrectal, la presencia de histamina instala un desbalance entre estos dos tipos celulares promoviendo la expresión de factores inmunosupresores por parte de las células Th2 y actuando en favor del crecimiento y la progresión tumoral (Sarazola y col., 2021; Nguyen & Cho, 2021).

A su vez, la histamina regula de forma indirecta y directa la activación de LTC. Por un lado, inhibe la supresión de células T llevada a cabo por macrófagos mediante la liberación de ROS, mientras que, por otro, fomenta la liberación de IL-16, una citoquina quimioattractante y factor estimulador de crecimiento de células T, a través de la estimulación del RH2.

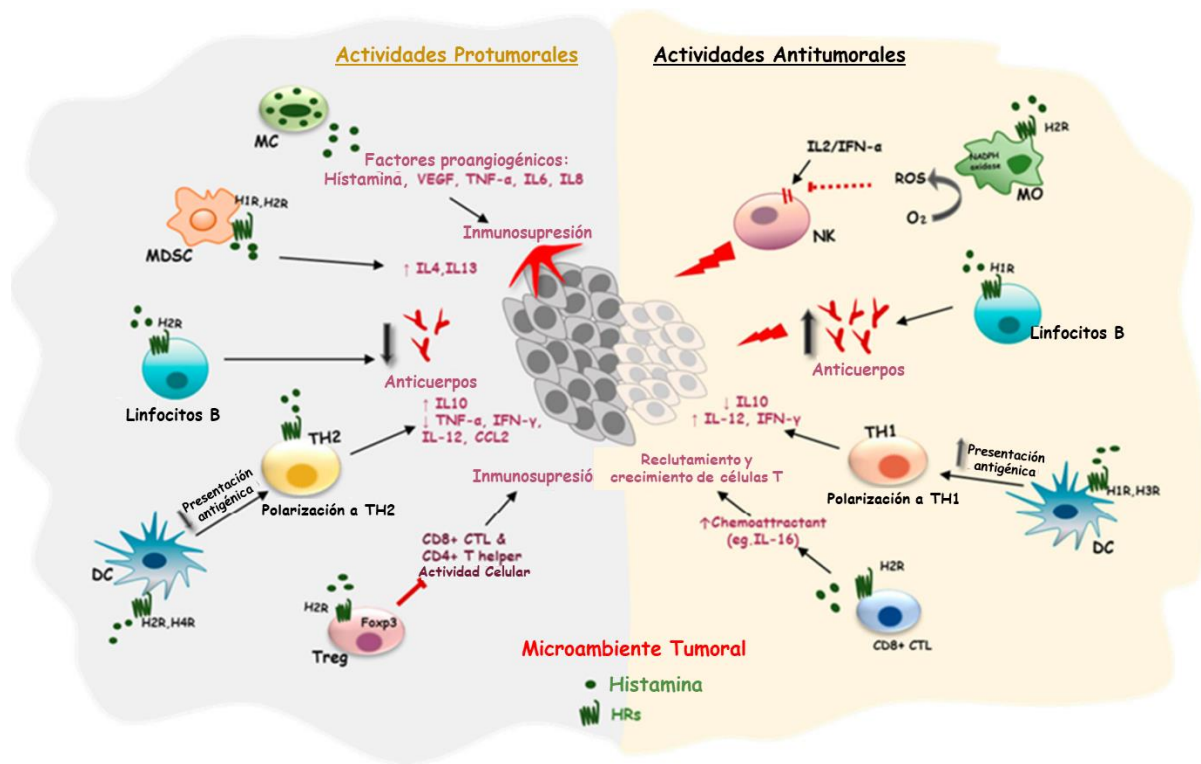
En cuanto a las células Treg, la histamina promueve su activación y por ende su rol inmunosupresor de restringir la actividad de linfocitos T citotóxicos y Th mediante su unión al RH2. Sin embargo, a través del RH1 la misma puede evitar la supresión del sistema inmune por parte de las Treg (Oldford & Marshall, 2015; Sarasola y col., 2021; Nguyen & Cho, 2021).

Es importante mencionar que la histamina también posee influencia sobre las funciones de las células presentadoras de antígenos (CPA) como lo son los macrófagos, las células B y células dendríticas. La histamina a través del RH2 puede inhibir el efecto inmunosupresor que los macrófagos ejercen sobre las células T y sobre todo las NK (Hellstrand, 2002; Oldford & Marshall, 2015). Asimismo, la histamina aumenta la producción de ROS en estas células permitiendo la eliminación e inhibición de la proliferación de ciertos tipos de cáncer como por ejemplo melanoma, leucemia mieloide aguda y carcinoma renal (Medina y col., 2009; Perz & Ho, 2008). Por otro lado, la histamina en las células dendríticas posee un efecto dual en el que, al estimular los receptores RH1 y RH3, mejora la habilidad de éstas para presentar neo-antígenos a las células T, promueve la liberación de factores proinflamatorios e induce la polarización a Th1. Mientras que, por otro lado, al unirse al RH2 inhibe la presentación de antígenos, promueve la producción y secreción de factores inmunosupresores e induce la polarización a Th2. Cuando la histamina interactúa con el RH4 inhibe la polarización a Th2 al mismo tiempo que disminuye la liberación de factores proinflamatorios (Sarazola y col., 2021; Nguyen & Cho, 2021). Continuando con las CPA, las células B presentan una mayor respuesta antitumoral basada en un aumento de la producción de anticuerpos antitumorales cuando son estimuladas a través de sus RH1, mientras que el efecto contrario se observa cuando la histamina estimula los RH2 (Fujimoto & Kimata, 1994; Nguyen & Cho, 2021; Sarazola y col., 2021).

Por último, las MDSCs también se ven afectadas por la presencia de histamina en el TME. La misma regula su supervivencia, diferenciación y proliferación, mientras que al mismo tiempo, inhibe la supresión de las células T llevada a cabo por las MDSCs basada en la liberación de factores inmunosupresores como la IL-4 y IL-13 (Martin y col., 2014; Oldford & Marshall, 2015). Estudios han demostrado que antagonistas del RH2 revierten los efectos de la histamina sobre las MDSCs al aumentar su índice apoptótico, reducir la expresión de genes

involucrados en la supresión de células T y su acumulación en el tumor (Nguyen & Cho, 2021). Asimismo, la histamina estimula la maduración de las MDSCs y evita su participación como factor promotor del crecimiento tumoral (Oldford & Marshall, 2015).

Por lo descrito anteriormente, se observa que la histamina puede cumplir tanto funciones proinflamatorias como inmunosupresoras según la célula y el subtipo de receptor que estimule (Nguyen & Cho, 2021; Sarasola y col., 2021). A continuación, en la **Figura 7**, se grafica el rol de la histamina sobre las células del sistema inmune en diferentes eventos pro- y antitumorales.



**Figura 7.** Rol dual de la histamina y sus receptores en el microambiente tumoral. La histamina puede ejercer efectos protumorales y antitumorales durante la progresión. La histamina también posibilita la comunicación con otras células infiltrantes del tumor a través de los receptores presentes en la superficie de sus membranas celulares. En la figura se ven representadas las acciones más importantes llevadas a cabo por la histamina. Referencias: MC: Mastocitos; MDSC: Células Supresoras Mieloides; TH1: Célula CD4+ T helper 1; TH2: Célula CD4+ T helper 2; CD8+ TCL; Linfocitos T Citotóxicos; NK: Células Natural Killer; MO: Macrófagos; DC: Células Dendríticas; HRs: Receptores de Histamina. (Extraída y adaptada de Nguyen & Cho, 2021).

### 2.5.3 Histamina y cáncer

Gran cantidad de estudios han demostrado la relación que posee la histamina con los diferentes tipos de cáncer. Tanto sus receptores, su síntesis y metabolismo como su biodisponibilidad y distribución en el microambiente tumoral se pueden ver involucrados en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral, al mismo tiempo en el que pueden, contrariamente, participar de eventos que tengan como finalidad eliminar el tumor. En este sentido, las mismas condiciones de los factores antes mencionados pueden tener distintos efectos sobre los distintos tipos de cáncer.

Varios tipos de neoplasias presentan altas concentraciones de histamina comparado con los tejidos sanos del mismo tipo. Ejemplos de ello son, el cáncer colorrectal (CRC), el melanoma y el cáncer de mama (Reynolds y col., 1997; Falus y col., 2001; Mach-Szczypinski y col., 2009). Al mismo tiempo la actividad de la HDC se encuentra elevada en ciertos tipos de cánceres como CRC, melanoma y cáncer de pulmón. Es por ello que, esta desregulación de la concentración de histamina, comparado con tejidos normales, se cree que está asociada a la progresión tumoral (Nguyen & Cho, 2021; Massari y col., 2020).

De la misma forma, muchos de ellos presentan desregulaciones en la expresión y la actividad de la enzima HDC encargada de la síntesis de histamina. En melanoma, los niveles de HDC están asociados a la malignidad (Haak-Frendscho y col., 2000; Pócs y col., 2004), y se ha demostrado que, en algunos modelos murinos de melanoma, la sobreexpresión de HDC promueve el crecimiento tumoral y aumenta las probabilidades de progresión de la patología a un estadio metastásico (Pócs y col., 2005). Por otro lado, se cree que una alta actividad de la enzima y disminución del metabolismo de la histamina se relacionan con la carcinogénesis, actividad proliferativa e invasión de nodos linfáticos en CRC (Massari y col., 2020).

Es a través de los diferentes receptores de histamina que ejerce sus efectos tanto en favor como en detrimento de la progresión tumoral en los diferentes tipos de cáncer. Incluso la sobreexpresión o disminución en la expresión de alguno de ellos puede llegar a ser un posible marcador pronóstico de la enfermedad. En cuanto al RH1, en carcinomas orales de células escamosas, la expresión se ve significativamente reducida a comparación de tejidos normales

de pacientes sanos. Estadísticamente esta característica se ve mayormente relacionada con pacientes que presentan un peor pronóstico (Grimm y col., 2012). De la misma forma, se ha reportado que el RH1 está sobreexpresado en carcinoma hepatocelular y asociado al crecimiento tumoral e invasión, al inducir la progresión del ciclo celular y la supresión de la apoptosis (Zhao y col., 2019). Por otro lado, se ha demostrado que en líneas celulares tumorales de hígado y cáncer de estómago la histamina tiene efectos positivos en el crecimiento tumoral actuando a través del RH2, al igual que en melanoma, donde en algunas células induce también la melanogénesis (Massari y col., 2020). Por su parte el RH3, se expresa en colangiocarcinoma, un tipo de cáncer biliar en donde se ha demostrado que los antagonistas del RH3 poseen efectos antiproliferativos *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, en otras líneas celulares de hepatocarcinoma como la McA-RH7777 se ha observado el mismo efecto, al mismo tiempo que en que la sobreexpresión del RH3 está asociado al crecimiento tumoral y metástasis en este tipo celular (Yu y col., 2019). Por último, el RH4 se ha visto involucrado en la inhibición de la progresión tumoral en melanoma, al mismo tiempo que induce a la senescencia celular en melanocitos. Varios estudios han demostrado una significativa disminución en la expresión del mismo en varios tipos de neoplasias como en cáncer de pulmón y de estómago. Además, tanto en cáncer gástrico como en cáncer de mama, melanoma, cáncer pancreático y CRC, se ha observado que la estimulación del RH4 produce el arresto del ciclo celular, el aumento de la apoptosis y la senescencia celular (Massari y col., 2020; Nguyen & Cho, 2021).

#### **2.5.4 Histamina y cáncer de mama**

La histamina en el contexto de la glándula mamaria cumple funciones fisiopatológicas actuando a través de los cuatro subtipos de receptores de histamina (RH1, RH2, RH3, RH4) presentes en la superficie de las células que componen este tejido. En condiciones normales, la histamina participa del desarrollo embrionario, embarazo y lactancia, regulando el crecimiento, la diferenciación y el funcionamiento de las células (Wagner y col., 2003; Maslinski y col., 1997).

Sin embargo, se la han encontrado elevados niveles de histamina en distintos tipos de neoplasias, al igual que de sus receptores, lo que conduce a pensar que el sistema histaminérgico

se encuentra implicado en la compleja biología del cáncer (Falus y col., 2001; Rivera y col., 2000; Reynolds y col., 1993; Bartholeyns, 1984; Massari y col., 2020).

En tumores y líneas celulares mamarias humanas, y en adenocarcinomas mamarios inducidos en ratas mediante carcinogénesis química con N-nitroso-N-metilurea (NMU), se ha demostrado una elevada actividad de la enzima HDC al igual que se ven aumentadas las concentraciones de histamina comparado con tejidos mamarios sanos (Medina y col., 2006; Rivera y col., 2000; Sieja y col., 2005). Estudios realizados en la población China Han demostraron que ciertos polimorfismos asociados al gen de HDC poseen mayor relación con el desarrollo del cáncer mamario (He y col., 2014). Sin embargo, en el subtipo CMTN y sobre todo en el tipo basal, distintos estudios han demostrado que los niveles de expresión del ARNm de HDC eran menores a los encontrados en tejido normal (Nicoud y col., 2019).

Se ha visto que los diferentes efectos que posee la histamina sobre el cáncer de mama se deben a la participación de los distintos receptores que presentan vías de señalización intracelular diferentes, por lo que de esta manera sus moléculas efectoras y los eventos que se producen en consecuencia a su estimulación son distintas. La concentración de la molécula estimuladora de los receptores, en este caso la histamina, también es un factor que modifica la respuesta que se produce.

En lo que respecta al RH1, se ha descrito que el mismo se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de mama tipo HER2+ e implicado en el arresto del ciclo celular en G<sub>0</sub>, la progresión, motilidad y activación de la vía de señalización de ERK que desencadena el proceso de apoptosis mitocondrial. Por su parte, el tratamiento de líneas celulares de carcinoma mamario MCF-7 con *astemizole* inducen la autofagia y la apoptosis a través del bloqueo del RH1 (Jakhar y col., 2016). Además, el tratamiento con el antagonista del RH1, clorfeniramina, redujo el crecimiento de las células MDA-MB-231 y MCF-7 (Gomez-Fabre y col., 1997). Por otro lado, estudios *in vivo* han demostrado que antagonistas del RH1, como la *terfenadina*, producen una reducción del crecimiento tumoral en cáncer de mama tipo basal y resistentes a inmunoterapia con *trastuzumab* (Fernández-Nogueira y col, 2018). Sin embargo, en modelos de carcinoma mamarios inducidos por NMU, el uso de *astemizole*, antagonista del RH1, genera un aumento en el número de tumores. Por el contrario, antagonistas del RH2, como *ranitidina*

o *cimetidina*, reducen la incidencia tumoral. De esta manera, la funcionalidad del RH1 tendería a inhibir la progresión tumoral, a diferencia del RH2, que la estimularía (Cricco y col., 1993; Davio y col., 1995; Rivera y col., 2000).

La utilización de *ranitidina*, como se ha mencionado anteriormente, posee un efecto antitumoral. Este mismo resultado se observó en estudios en los que la administración oral del fármaco produjo la remisión total en el 55% de los tumores mamarios desarrollados en el modelo experimental de cáncer de mama inducido por NMU (Rivera y col., 2000). También se ha visto que el RH2 es capaz de modular negativamente la población MDSCs en el bazo y médula ósea, promoviendo el desarrollo y la propagación tumoral mediante la administración oral de ranitidina. Asimismo, en el modelo murino de CMTN desarrollado por la inoculación de células 4T1, este ligando inhibe significativamente la aparición de metástasis pulmonares (Vila-Leahey y col., 2016). Por su parte, en el modelo de adenocarcinoma mamario de tipo medular E0771, la *ranitidina* reduce el crecimiento tumoral y el reclutamiento de monocitos al tumor al suprimir la liberación de la citoquina CCL2, cuyo receptor CCR2 es altamente expresado en este tipo celular (Vila-Leahey y col., 2016). Interesantemente, varios estudios han demostrado que este antagonista del RH2 aumenta la respuesta antitumoral mediada por anticuerpos IgG en la que participa mayormente los linfocitos B, al mismo tiempo en el que pueden estar involucradas células NK (Rogers y col., 2018).

Por otra parte, el RH3 se encuentra presente en líneas celulares humanas, lesiones benignas y carcinomas mamarios. Su elevada expresión en cáncer de mama, la cual se correlaciona con la presencia de HDC y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), se asocia a una elevada proliferación tumoral y producción de histamina (Medina y col., 2008). En línea con estos resultados, elevadas concentraciones de histamina y agonistas del RH3 (*Imetit* y *R- $\alpha$  metil histamina*) promueven la proliferación celular y migración de la línea celular de CMTN humana MDA-MB-231 de forma dosis-dependiente. En concordancia, los antagonistas del RH3, OUP-186 y JNJ5207852, inhiben la proliferación celular (Tanaka y col., 2016; Medina y col., 2008). Además, estudios en los que se ha administrado el antagonista de RH3 JNJ10181457 *in vivo* ha logrado reducir el tamaño de los tumores xenoinjertados de MDA-MB-231 establecidos en ratones *nude* inmunodeficientes (Martinel Lamas y col., 2013, 2015a).



Por último, el descubrimiento del RH4 hace poco más de una década, ha posibilitado comprender aún más los efectos de la histamina sobre el desarrollo y la progresión del cáncer (Martinel Lamas y col., 2015). El mismo se expresa en lesiones malignas de la glándula mamaria, así como también, en líneas celulares de cáncer de mama establecidas, como las MDA-MB-231 y MCF-7. Interesantemente, el gen del receptor presenta distintos polimorfismos de nucleótido único los cuales están asociados a un aumento del riesgo y malignidad del cáncer de mama en la población China Han, dando a entender el rol fundamental de este receptor en la patología (He y col., 2013).

Distintos estudios han demostrado que la histamina y agonistas del RH4 poseen un efecto antitumoral al inducir el arresto del ciclo celular, aumentar el número de células en proceso de apoptosis y senescencia celular (Medina y col., 2011a; Martinel Lamas y col., 2013). En este sentido, el tratamiento de la línea celular de CMTN 4T1 con histamina y agonistas específicos del RH4 (JNJ28610244 y VUF8430) aumenta la apoptosis celular de forma dosis-dependiente. Mientras que, por el contrario, la utilización de antagonistas del RH4 (JNJ7777120) bloquea los efectos observados (Nicoud y col., 2019). En esta línea, la histamina ejerce un efecto antiproliferativo a través del RH4 en la línea celular MDA-MB-231 que es más evidente a medida que se aumentan las concentraciones de la bioamina (Medina y col., 2006; 2008; 2011a).

En línea con estos resultados, modelos ortotópicos de CMTN desarrollados en ratones BALB/c mediante la inyección de células 4T1, han demostrado responder a la histamina y al agonista del RH4 JNJ28610244 de forma negativa, reduciendo el volumen y peso tumoral y disminuyendo el número de vasos intratumorales. Al mismo tiempo, el tumor presentó un menor índice mitótico y de marcadores de proliferación (Nicoud y col., 2020a).

Además, en modelos tumorales *in vivo* desarrollados en ratones *nude* con las células MDA-MB-231 la administración de histamina y del JNJ28610244, redujo el crecimiento tumoral (Martinel Lamas y col., 2013).

Varias investigaciones han demostrado que los carcinomas mamarios generalmente se encuentran infiltrados por células del sistema inmune, en su mayoría macrófagos y linfocitos T

(Mahmoud, 2011). Al mismo tiempo, el infiltrado tumoral de linfocitos es un marcador pronóstico el cual se relaciona con una mejor respuesta a las quimioterapias y una mayor supervivencia en CMTN (Ravelli y col., 2017).

Interesantemente, modelos ortotópicos de CMTN desarrollados con células 4T1 en ratones que no expresan el RH4 (*knockout*, KO) mostraron tumores de menor tamaño y peso, disminución del número de metástasis pulmonares y del porcentaje de células T CD4+ que infiltran el tumor, mientras que exhibieron un mayor infiltrado de células NK y linfocitos B CD19+ respecto de los tumores desarrollado en animales de tipo salvaje. El ganglio drenante del tumor de los ratones KO mostró una disminución de las células T CD4+ y de la subpoblación de las células T regulatorias junto a un mayor porcentaje de células NK. Estos resultados demuestran el papel crítico de la histamina endógena y la activación del RH4 expresado en células del microambiente tumoral, en el desarrollo y la progresión como así también en la inmunidad antitumoral del CMTN (Sterle y col., 2019). También en otro modelo de cáncer de mama desarrollado con la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3 (HER2+) el porcentaje de células Treg disminuyó significativamente en el ganglio drenante de tumor en animales KO para el RH4 (Nicoud y col., 2020b).

### **2.5.5 Histamina en combinación con otras terapias para el tratamiento del cáncer de mama**

Curiosamente, se ha demostrado que la histamina es capaz de potenciar los efectos sobre las células tumorales de terapias tradicionales como la quimioterapia y la radioterapia, al mismo tiempo que en algunos casos logra disminuir los efectos adversos de las mismas.

En cuanto a la radioterapia, se comprobó que el pretratamiento con histamina y agonistas del RH1 (*2-(3-(trifluorometil)fenil)histamina*) y RH4 (*clobenpropit* y *VUF8430*) aumenta el daño oxidativo al ADN, la apoptosis y la senescencia celular que produce la radiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente. Asimismo, resultados obtenidos a partir de un modelo *in vivo* de CMTN demostraron que los tiempos de duplicación celular habían aumentado luego del tratamiento combinado de histamina y radioterapia (Medina y col., 2006; Martinel Lamas D. J., 2015b). También se ha demostrado

que esta amina biogénica inhibe la migración y la invasión de células MCF-7 *in vitro* (Galarza y col., 2016). A su vez, experimentos *in vivo* en modelos de CMTN desarrollados por la inyección ortotópica de células 4T1 en ratones BALB/c, mostraron resultados concordantes al verse aumentados los efectos de la radiación tras el tratamiento con histamina, reduciendo el crecimiento y el peso tumoral (Nicoud y col., 2020a).

Es importante destacar que en modelos *in vivo* de rata y ratón el tratamiento con histamina protegió significativamente dos tejidos altamente radiosensibles, como lo son el intestino delgado y la médula ósea, disminuyendo el daño tisular. (Medina y col. 2007; 2010b; Carabajal y col., 2012) Además, la histamina preservó las glándulas submandibulares de rata frente al daño estructural y funcional inducido por la RI. (Medina y col. 2011b)

En lo que respecta a la quimioterapia, la histamina también ha demostrado cumplir un rol protector frente a los efectos adversos como la cardiotoxicidad y la hepatotoxicidad del uso de doxorubicina en modelos *in vivo*. Al mismo tiempo, mejora la actividad antitumoral del quimioterapéutico como la inducción apoptosis y el daño al ADN en células de CMTN (Martinel Lamas y col., 2015c).

## 2.6 Sistemas de vehiculización de drogas

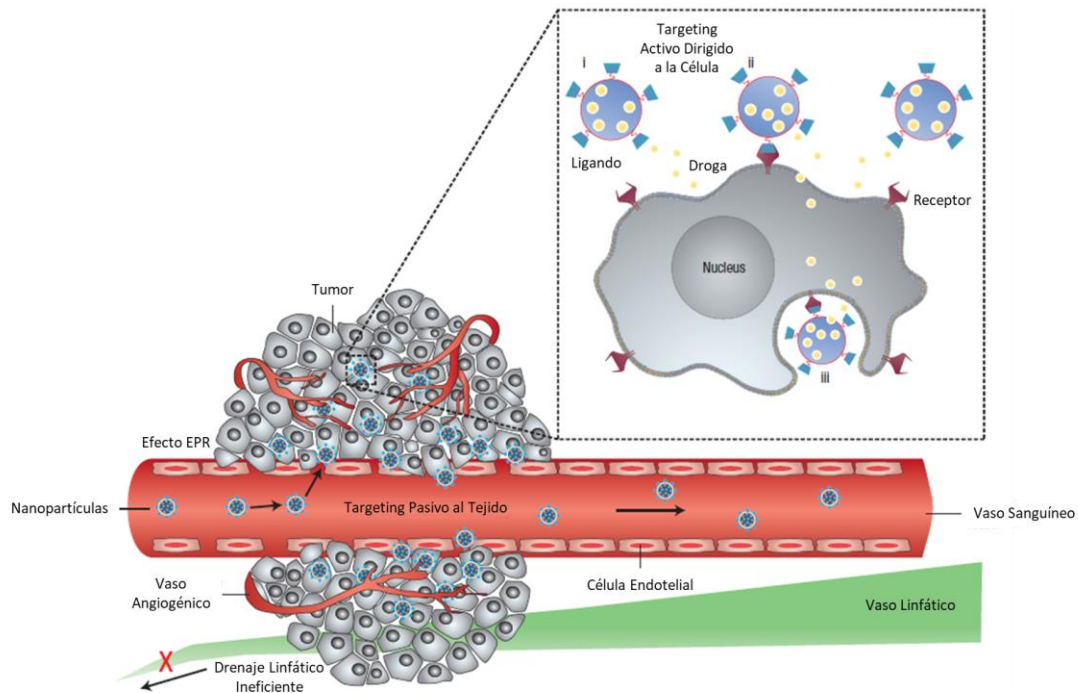
Uno de los mayores desafíos en la terapia oncológica es la vehiculización o vectorización de las drogas antineoplásicas a sus sitios de acción en el organismo. Una vez administrados, la gran mayoría de estos fármacos se distribuye sin una selectividad específica, lo que genera una amplia variedad de efectos adversos en los tejidos sanos y una elevada toxicidad. Por otro lado, el valor terapéutico de estas drogas además se encuentra limitado por propiedades tales como la baja solubilidad y la rápida eliminación (Singla y col., 2002). Ante esta problemática numerosos grupos de investigación y compañías farmacéuticas se han focalizado en el desarrollo de nuevas estrategias de liberación vectorizada de fármacos, con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica de las drogas quimioterápicas, y reduciendo a la vez la toxicidad asociada (Basile y col. 2012). En este sentido, en las últimas décadas la nanotecnología ha contribuido notablemente en el campo de la oncología, mejorando algunas de las limitaciones en la administración de drogas para el tratamiento del cáncer. Aquí es donde

la encapsulación de agentes terapéuticos en diferentes nano-formulaciones ofrece un sistema muy prometedor para aumentar su eficacia (Torchilin, 2007; Montané y col., 2020).

En general, se busca que los vehículos utilizados para el transporte de fármacos sean biodegradables, de preparación fácil y económica, que posean un tamaño de partícula pequeño (preferentemente menor a 100 nm), que presenten una alta capacidad de carga y tiempo de circulación prolongado y que idealmente se acumulen específicamente en los sitios requeridos (Gref y col. 1994). En este sentido, se reconocen dos tipos de mecanismos por los que los nanotransportadores se acumulan en los tumores.

Por un lado, la acumulación pasiva. Una de las características más importantes del tejido tumoral es que, para que las células crezcan rápida y descontroladamente, debe haber una estimulación de la angiogénesis, lo cual da lugar a una arquitectura vascular defectuosa con fenestraciones que van de los 10 a los 800 nm. Esta patofisiología única, en combinación con un pobre drenaje linfático, se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés, *enhanced permeability and retention effect*) (Maeda y col., 2000; Nichols & Bae, 2014; Golombek y col., 2018). Así, los sistemas de tamaño nanométrico llegan al tejido tumoral por difusión pasiva, se internan a través de las fenestraciones y permanecen allí por un tiempo prolongado debido al escaso drenaje linfático (**Figura 8**). De esta manera, se pueden alcanzar concentraciones del nanosistema hasta 10 veces más altas en el tumor en comparación con el tejido sano (Misra y col., 2010).

Por otro lado, la acumulación activa. Las células tumorales suelen sobreexpresar algunos tipos de receptores de membrana que promueven su crecimiento (**Figura 8**). Si el nanotransportador se «decora» con un ligando específico (péptido, proteína o anticuerpo) que reconozca al receptor, se dirigirá y acumulará preferentemente en el tejido tumoral (Peer y col. 2007).



**Figura 8.** Representación esquemática de los diferentes mecanismos por los cuales las nanopartículas pueden liberar drogas a nivel de los tumores. Las nanopartículas poliméricas se muestran como nanotransportadores representativos (círculos). La vehiculización pasiva se logra por extravasación de las nanopartículas a través del efecto EPR. La vehiculización celular activa (recuadro) ocurre al funcionalizar la superficie de las nanopartículas con ligandos que promueven el reconocimiento y la unión específica a la célula tumoral. Las nanopartículas pueden: i) liberar su contenido en la proximidad de las células blanco, ii) adosarse a la membrana celular y actuar como un depósito de droga extracelular de liberación sostenida, o iii) internalizarse en la célula (Extraído y adaptado de Peer y col., 2007).

## 2.7 Uso de nanoformulaciones en la terapia oncológica

De las numerosas variantes de nano-formulaciones desarrolladas disponibles, las nanopartículas poliméricas, los liposomas y las micelas son de las más investigadas para mejorar el patrón de biodistribución e incrementar la captación de diferentes fármacos en sitios blanco para el tratamiento o diagnóstico de procesos infecciosos, inflamatorios y tumorales (A. Bao y col., 2003; Pereira y col., 2009; Underwood y col., 2012).

Dentro de las numerosas ventajas que presentan las nano-formulaciones respecto del uso de las drogas quimioterapéuticas libres podemos reconocer las siguientes (Peer y col. 2007):

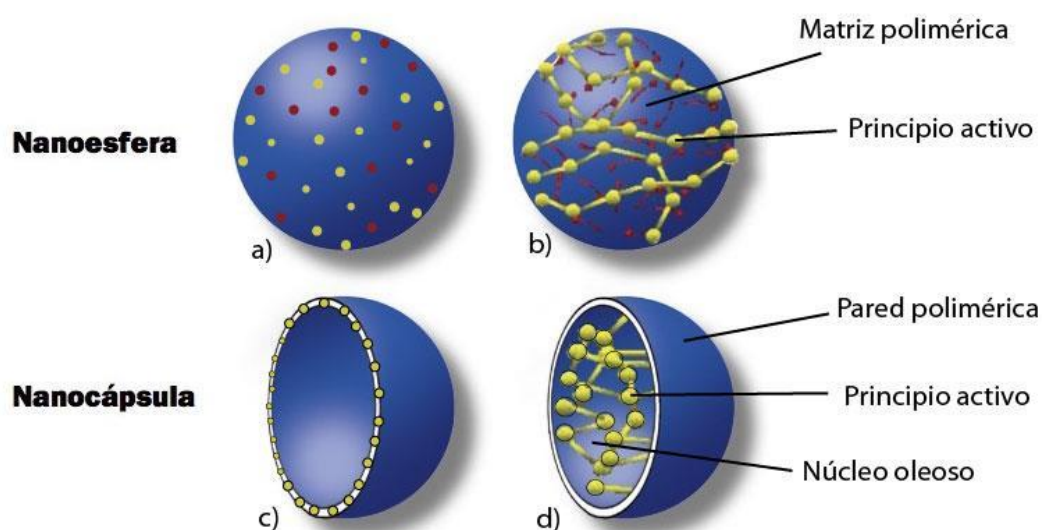
- protegen a las drogas terapéuticas de una degradación prematura logrando una mejor llegada al sitio tumoral,
- previenen la interacción de las drogas con el microentorno biológico,
- aumentan la absorción de las drogas en sitios específicos (p.ej. tumores sólidos),
- permiten controlar la farmacocinética y la biodistribución del fármaco,
- mejoran la penetración intracelular.

Sin embargo, para que un nanotransportador pueda utilizarse en ensayos clínicos de forma rápida y efectiva debe cumplir mínimamente con las siguientes características (Peer y col. 2007):

- estar formado de un material biocompatible, bien caracterizado y que permita una fácil funcionalización,
- exhibir una alta eficiencia de absorción diferencial en las células blanco respecto de células sanas,
- ser soluble o coloidal bajo condiciones acuosas para incrementar su eficacia,
- tener una extensa vida media en circulación, baja agregación y larga durabilidad.

### **2.7.1 Nanopartículas poliméricas**

Son partículas coloidales sólidas con un tamaño de 10 a varios cientos de nanómetros constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar encapsulado en el interior de la matriz. Las nanocápsulas en cambio, son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso (Leonhard, 2013) (*Figura 9*).

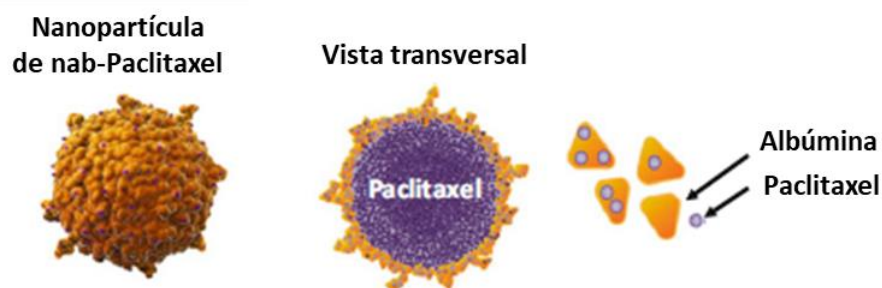


**Figura 9.** Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas: a) principio activo (amarillo) retenido en la matriz polimérica de las nanoesferas; b) principio activo adsorbido o disperso molecularmente en la matriz polimérica de las nanoesferas c) principio activo adsorbido en la pared polimérica de las nanocápsulas d) principio activo disuelto en el núcleo oleoso de la nanocápsulas (Puisieux y col. 1994).

La primera formulación de nanopartículas poliméricas comercializada ha sido la de nanopartículas de albúmina para la vehiculización de paclitaxel (nab-paclitaxel), con un tamaño medio de 130 nm. Esta formulación denominada Abraxane® (**Figura 10**), fue aprobada en primer lugar por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2005 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, luego para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico en 2012 y en 2013 se aprobó su uso para el tratamiento del cáncer de páncreas (Kundranda y col., 2015).

La mayor eficacia de Abraxane® sobre la formulación clásica de paclitaxel (Taxol®) fue atribuida, en principio, al hecho de que los pacientes podían recibir dosis más elevadas debido a la ausencia de *Cremophor*® (aceite de castor polioxietileno), solvente tóxico y principal causante de los efectos secundarios de esta formulación (Damascelli y col., 2001). Los estudios clínicos demostraron que el Abraxane® consigue ralentizar el curso de la

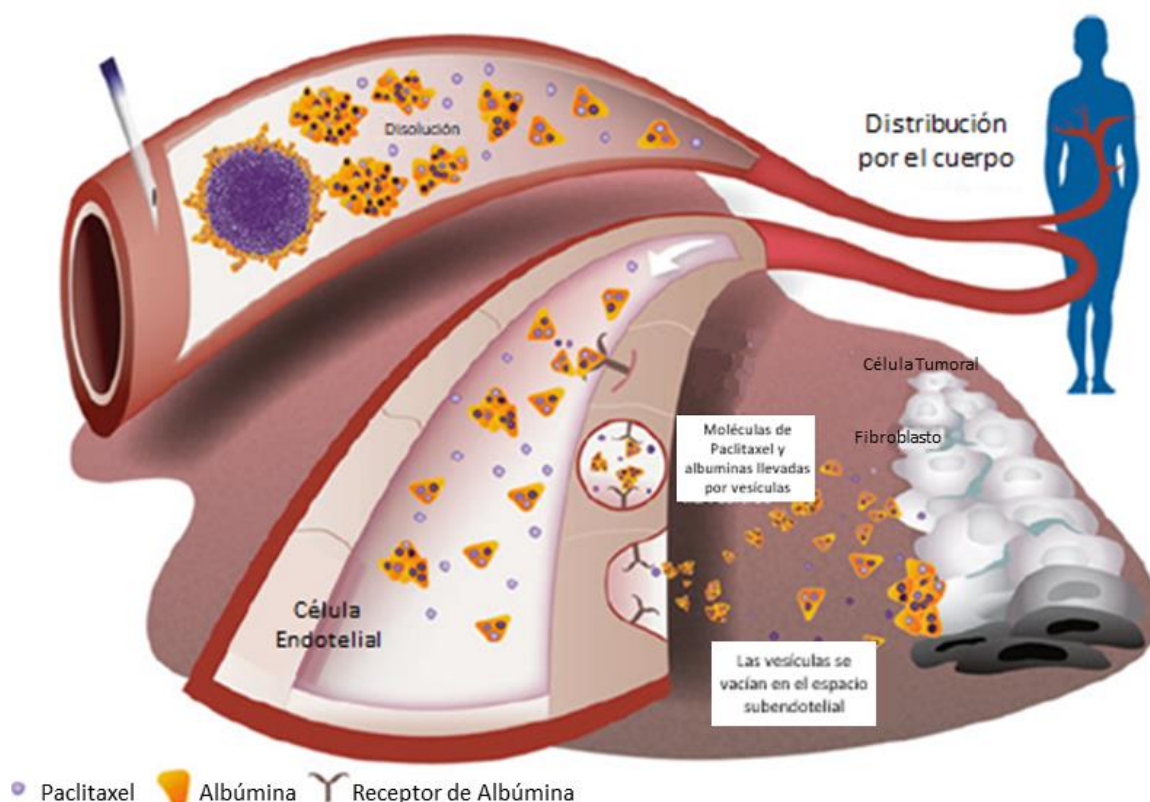
enfermedad, aumentando la supervivencia de los pacientes de cáncer de mama (Untch y col. 2019).



**Figura 10.** Representación esquemática de una nanopartícula de nab-paclitaxel. La nanopartícula de paclitaxel asociada a albúmina tiene un tamaño promedio de 130 nm. La unión entre la albúmina y el paclitaxel es de tipo no covalente. La vista transversal muestra que una capa de moléculas de albúmina con cierto grado de unión entre ellas forma la superficie de la nanopartícula, la cual rodea a un núcleo hidrofóbico que contiene al paclitaxel. (Extraído y adaptado de Desai, 2016).

Luego de ser administradas por vía endovenosa las nanopartículas de nab-paclitaxel se disocian rápidamente en complejos solubles de paclitaxel unidos a albúmina de aproximadamente 10 nm (**Figura 11**). Se sabe que la albúmina participa en la transcitosis endotelial mediada por caveolina (proteína que reviste las invaginaciones de la membrana plasmática de las células endoteliales) y estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de albúmina en nab-paclitaxel aumenta el transporte del mismo a través de las células endoteliales, aumentando así su acumulación en el área tumoral (Cecco y col., 2014).



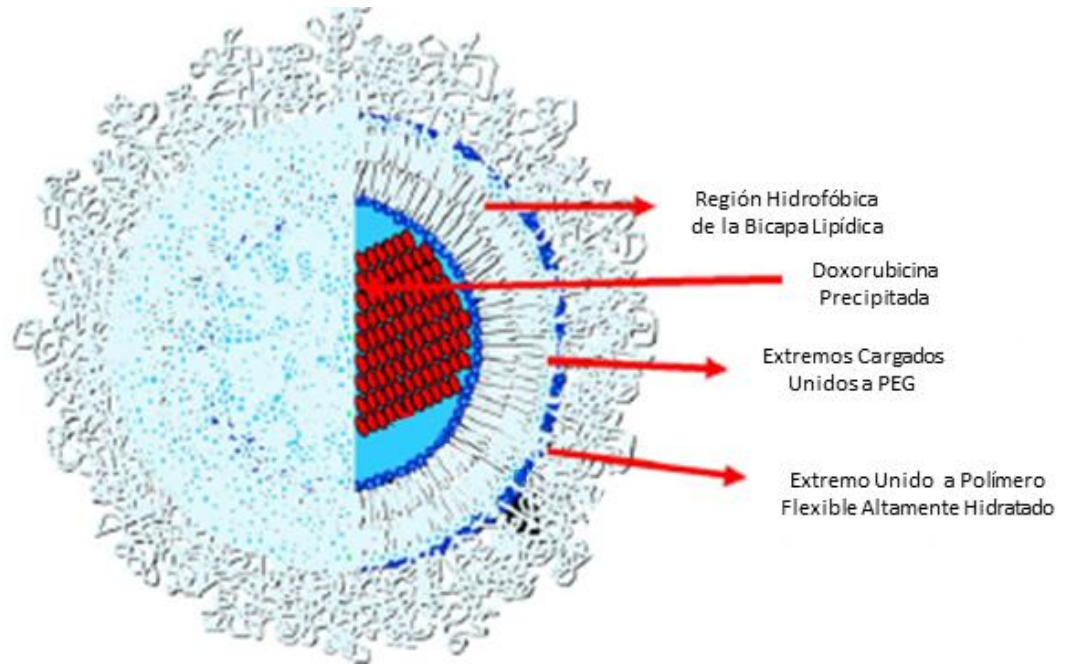


**Figura 11.** Mecanismos para el transporte de nab-paclitaxel al tumor. Luego de la dilución de las nanopartículas de nab-paclitaxel, el transporte de los complejos de albúmina-paclitaxel a través de la barrera endotelial es facilitada por la unión de la albúmina con el receptor gp60 y el transportador calveolar. Una vez dentro del tumor, la demanda de albúmina por parte de las células tumorales en proliferación promueve la acumulación, la distribución y la penetración del paclitaxel unido a la albúmina (Extraído y adaptado de Desai, 2016).

## 2.7.2 Liposomas

Los liposomas son vesículas nanométricas compuestas por una o más bicapas lipídicas con un tamaño mayor o igual a 400 nm (Bangham y col., 1965). El interior de estas vesículas se caracteriza por presentar un medio acuoso que brinda la posibilidad de encapsular fármacos de naturaleza polar. Por otro lado, las moléculas lipofílicas y anfifílicas se pueden solubilizar dentro de la bicapa lipídica de acuerdo por su afinidad con los fosfolípidos.

Una dificultad que presentan los fármacos encapsulados en liposomas es que cuando son administrados por vía endovenosa sufren la desestabilización al alcanzar el torrente sanguíneo debido a la interacción con las lipoproteínas de alta densidad (HDL), conduciendo a la remoción de la bicapa lipídica lo cual facilita la adsorción o inclusión de opsoninas como fibronectina, proteína C reactiva,  $\alpha$ -2 macroglobulina, etc., que juegan un papel importante en el reconocimiento de los liposomas y otras partículas por parte de los macrófagos del sistema retículo-endotelial (Moghini & Patel, 1993). Para evitar este efecto se han desarrollado liposomas recubiertos con polímeros hidrofílicos y flexibles (Moreira y col., 1996). Un ejemplo de estos polímeros son los polietilenglicoles (PEG), los cuales se ubican en la superficie de los liposomas para prevenir la adsorción de proteínas y así aumentar su vida media *in vivo* (Blume y Cevc, 1993). Sin embargo, esta funcionalización puede verse contrarrestada dado que la larga y densa cadena del PEG puede prevenir a los ligandos de alcanzar correctamente el blanco terapéutico (Bertrand y col., 2014). Es así que este efecto protector externo (“*stealth effect*”), que es necesario para la distribución selectiva del nanotransportador, y el efecto de vectorización a nivel del tumor son difíciles de conseguir en forma simultánea (Gullotti & Yeo, 2009). Dentro de este tipo de formulaciones se encuentra el Doxil<sup>®</sup> (Doxorrubicina liposomal), primera nano-droga antitumoral aprobada por la FDA que se corresponde con un sistema nanoparticulado donde se encapsula la doxorrubicina dentro del liposoma y la superficie se encuentra cubierta por PEG (liposoma pegilado, **Figura 12**). En un comienzo esta formulación se utilizó para el tratamiento del sarcoma de Kaposi en pacientes con HIV y hoy en día su uso está aprobado para el tratamiento del cáncer de ovario (Muggia, 1997), cáncer de mama (en EE.UU.) (Barenholz, 2012) y en combinación en el tratamiento de mieloma múltiple (en EE.UU. y Canadá) (Bladé y col., 2011).



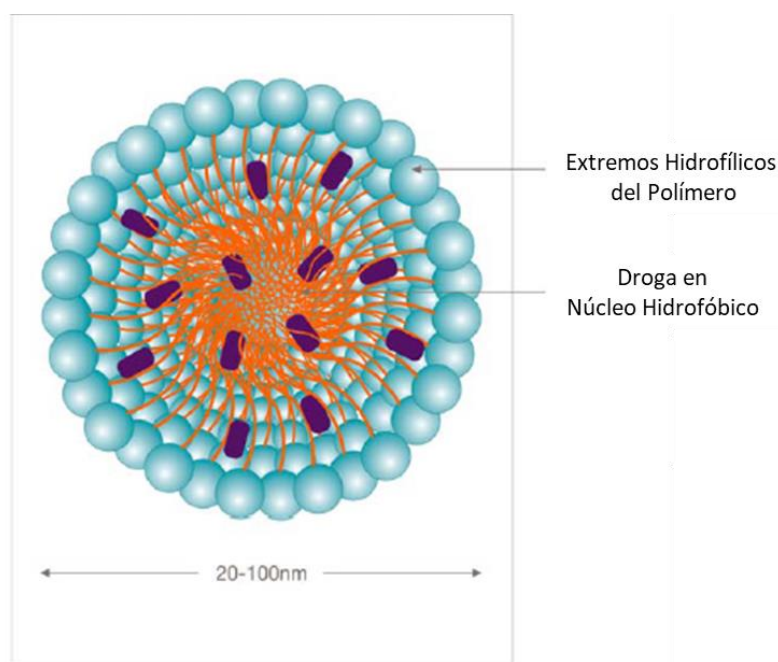
**Figura 12.** Estructura esquemática de la doxorubicina liposomal con residuos de PEG (Extraída y adaptada de Barenholz y col., 2012).

Sin embargo, esta estrategia no es posible de aplicarse en los taxanos como el paclitaxel, dado que, en las condiciones empleadas hasta ahora en su diseño, estas drogas se extruyen rápidamente de la bicapa lipídica, lo que hace que las formulaciones sean inestables (Straubinger y col., 1993; Sharma y Straubinger, 1994). En este contexto, una estrategia para superar la inestabilidad de los vehículos de transporte de taxanos en agua podría ser el uso de micelas.

### 2.7.3 Micelas

Las micelas poliméricas son sistemas de vehiculización compuestas por copolímeros anfifílicos, es decir, por unidades monoméricas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (**Figura 13**). Se caracterizan porque una vez que entran en contacto con un medio acuoso estas unidades se autoensamblan en una estructura donde queda formado un núcleo hidrofóbico rodeado por una corona hidrofílica, es por ello que estos sistemas son ideales para transportar fármacos de baja hidrosolubilidad y permiten a su vez decorar el exterior con moléculas o drogas hidrofílicas que pueden bien dirigir la micela al sitio de interés o potenciar la eficacia de la droga que se

esté vehiculizando. Además, la cubierta hidrofílica de las micelas protege al fármaco incorporado manteniéndolo aislado del ambiente acuoso externo, evitando así procesos de hidrólisis y de degradación enzimática. Por otro lado, está cubierta impide que se produzcan efectos indeseables como agregación inter-micelar, adhesión o fusión con glóbulos rojos y reconocimiento por los macrófagos del sistema retículo endotelial, permitiendo de esta manera prolongar el tiempo en circulación por el torrente sanguíneo. Tienen un tamaño de 10 a 100 nm lo que favorece aún más su acumulación en el sitio tumoral gracias al efecto EPR (Cukierman y Khan, 2010; Lensen y col., 2011; Chaturvedi y col., 2019).



**Figura 13.** Representación esquemática de una micela y su capacidad de incorporar drogas hidrofóbicas dentro de su núcleo interno como así también drogas o moléculas hidrofílicas en la corona (Imagen extraída y adaptada de Cukierman y Khan, 2010).

Como ejemplo de este tipo de nano-formulación actualmente se ha aprobado para su uso clínico (en Hungría, Bulgaria y Corea del Sur) una micela polimérica con paclitaxel, el Genexol-PM, la cual emplea bloques co-poliméricos que incluyen polietilenglicol como cubierta protectora y un núcleo de ácido poliláctico (PLA-PEG), alcanzando un diámetro entre

20-50 nm (Kim y col., 2014). A continuación, se resumen en la **Tabla I** las principales ventajas y desventajas de los tres tipos de nano-formulaciones descriptas anteriormente y seguido se detallan las principales nano-formulaciones de uso clínico en cáncer de mama (**Tabla II**).

**Tabla I:** Principales ventajas y desventajas de las nano-formulaciones más utilizadas.

Nano-formulaciones	Ventajas	Desventajas
<i>Nanopartículas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Biocompatibles</li> <li>*Protección del fármaco</li> <li>*Liberación controlada</li> <li>*Carga de moléculas de distinta polaridad</li> <li>*Funcionalización de su superficie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Liofilización necesaria</li> <li>*Tendencia a gelificar</li> <li>*Relativamente baja capacidad de carga</li> </ul>
<i>Liposomas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Biocompatibles</li> <li>*Biodegradables</li> <li>*Baja toxicidad</li> <li>*Carga de moléculas de distinta polaridad</li> <li>*Funcionalización de su superficie</li> <li>*Liofilización necesaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Elaboración compleja</li> <li>*Baja estabilidad en solución y en circulación</li> <li>*Fusión inespecífica con membranas</li> </ul>
<i>Micelas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Biocompatibles</li> <li>*Biodegradables</li> <li>*Carga de moléculas de distinta polaridad</li> <li>*Isotrópicas</li> <li>*Transparentes</li> <li>*Formación espontánea</li> </ul>	<p>Baja estabilidad en solución por fenómenos de dilución</p>

	<p>*Protección del fármaco</p> <p>*Funcionalización de su superficie</p> <p>*No adhesión o agregación por su cubierta hidrofílica</p>	
--	---	--

Fuente: Leonhard, 2013

**Tabla 2.** Nanopartículas aprobadas o actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de mama.

Tipo de formulación	Descripción	Nombre	Fármaco usado	Aplicación	Estado
<i>Liposoma</i>	Liposoma unido a PEG	Doxil	Doxorrubicina	Cáncer metastásico de mama y ovario. Sarcoma de Kaposi	Aprobado por FDA
<i>Nanopartícula</i>	Albúmina	Abraxane	Paclitaxel	Cáncer de mama metastásico	Aprobado por FDA
<i>Liposoma</i>	Liposoma no unido a PEG	Myocet	Doxorrubicina	Cáncer de mama metastásico	Aprobado en Europa y Canadá. Fase III en EE.UU.
<i>Micela</i>	Polímero	NK-105	Paclitaxel	Cáncer de	Fase I y III

	NK105 unido a PEG			mama metastásico	en EE.UU.
<b><i>Micela</i></b>	Copolímero PLA-PEG	Genexol-PM	Paclitaxel	Cáncer de mama	Aprobado en Hungría, Bulgaria y Corea del Sur. Fase III EE.UU.
<b><i>Liposoma</i></b>	Liposoma activado por calor	ThermoDox	Doxorrubicina	Cáncer de mama	Fase I y II EE.UU.

Fuentes: Barzaman y col., 2020; Chaturvedi y col., 2018.

### 3. Hipótesis

La histamina desempeña un papel crucial en la regulación del crecimiento de tumores de CMTN y en la modulación de la inmunidad antitumoral, pudiendo representar un potencial agente antitumoral que aumente el índice terapéutico de la quimioterapia actualmente utilizada. Las formulaciones farmacéuticas de base nanotecnológicas desarrolladas con polímeros biocompatibles para la vehiculización de estas drogas mejoran su eficacia antitumoral y el perfil de toxicidad del paclitaxel para el tratamiento del CMTN.

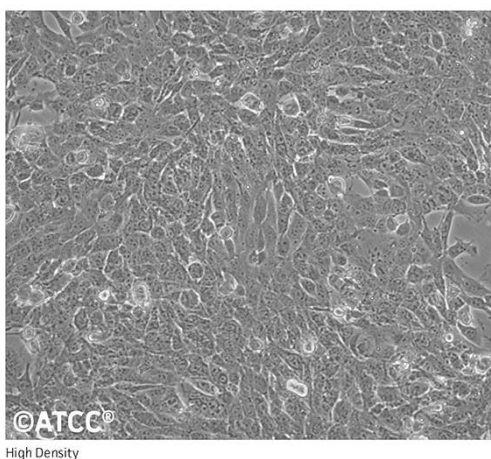
*Consideramos que el esclarecimiento de esta hipótesis contribuirá al mejor conocimiento del papel de la histamina en la respuesta a la quimioterapia con paclitaxel en CMTN, representando un importante avance en el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento de esta enfermedad. Además, la identificación de agentes que modulen los efectos biológicos de la quimioterapia actual, y de esta manera permitan lograr un efecto más selectivo produciendo el máximo daño a las células tumorales sin afectar los tejidos sanos del paciente, sería de vital importancia ya que reduciría la toxicidad y mejoraría el control tumoral.*



## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Líneas celulares

#### 4.1.1 4T1 (ATCC® CRL-2539™)



**Descripción:** Línea celular adherente de origen murino (BALB/cfC3H) de cáncer de mama de tipo epitelial que equivale a un cáncer de mama humano de estadio IV. Se caracteriza por no expresar los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP), o del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (ErbB-2/HER). Es altamente metastásica en órganos como pulmón, cerebro, hueso, hígado, etc. (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001; Kaur y col., 2012)

**Organismo:** *Mus musculus*, ratón

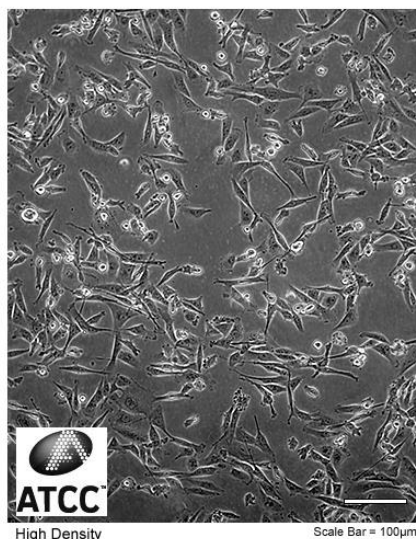
**Tejido:** Mama; Glándula mamaria

**Morfología:** Epitelial

**Propiedades de crecimiento:** Adherentes

**Enfermedad:** Mimetiza el cáncer de mama humano; Estadio IV

## 4.1.2 MDA-MB-231 (CRM-HTB-26™)



**Descripción:** Es una línea celular epitelial de cáncer de mama humano que se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico (Cailleau y col., 1978). Es una línea celular de cáncer de mama triple negativo altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada, ya que carece de la expresión del receptor de estrógeno (RE) y del receptor de progesterona (RP), así como del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (ErbB-2/HER) (Liu y col., 2003; Chavez y col., 2010).

**Organismo:** *Homo sapiens*, humano

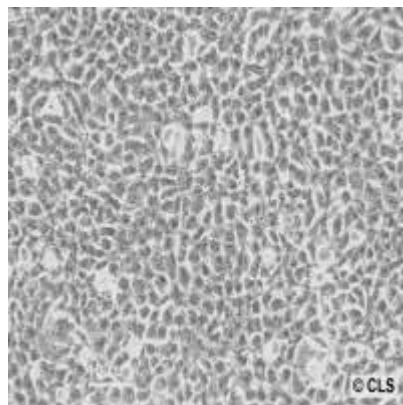
**Tejido:** Mama, Glándula mamaria

**Morfología:** Epitelial

**Propiedades de crecimiento:** Adherentes

**Enfermedad:** Adenocarcinoma

## 4.1.3 HBL-100



**Descripción:** Es una línea celular epitelial obtenida a partir del cultivo primario de células derivadas de una muestra de leche materna (Gaffney y col., 1982).

**Organismo:** *Homo sapiens*, humano

**Tejido:** Mama, Glándula mamaria

**Morfología:** Epitelial

**Propiedades de crecimiento:** Adherentes

**Enfermedad:** Ninguna, células no tumorigénicas

## 4.2 Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Gibco, Life Technologies Corporation*, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB, *Gibco, Life Technologies Corporation*, EE.UU.) al 10%, glutamina (*Gibco, Life Technologies Corporation*, EE.UU.) al 0,03% y penicilina-estreptomina (*Sigma Aldrich*, EE.UU.) al 0,001% (medio completo). Las células se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se subcultivaron 2-3 veces por semana, para lo cual se aspiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con solución fisiológica (SF, solución de NaCl al 0,9%) y se

cosecharon con una solución de tripsina/EDTA (0,25%, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM). El número de células necesarias para cada ensayo se evaluó por conteo en cámara de Neubauer (Alemania) y luego se realizó la siembra en placas de cultivo plásticas mediante dilución adecuada de acuerdo al ensayo a realizar.

El medio de cultivo y las soluciones utilizadas se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  de PVDF (Durapore, Irlanda). El material de vidrio empleado en los cultivos se esterilizó por calor seco en estufa eléctrica a 180°C durante 2 h, mientras que el material de plástico no descartable se esterilizó en autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

La totalidad de los procedimientos relacionados con la manipulación de las líneas celulares, la preparación de medios de cultivos y los tratamientos de las células se realizaron en condiciones de esterilidad trabajando bajo flujo laminar.

## 4.3 Drogas utilizadas

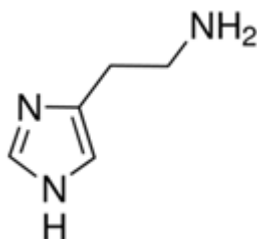
### 4.3.1 Histamina (HA)

**Sinónimo:** 2-(4-Imidazol) etilamina

**Fórmula:**  $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$

**Peso molecular:** 111,15 g/mol

**Estructura química:**



**Adquirida en:** Sigma Aldrich (Missouri, EE.UU.)

La histamina se resuspendió en SF en las concentraciones establecidas en reportes previos (Medina y col., 2006; Massari y col., 2013; Martinel Lamas y col., 2013).

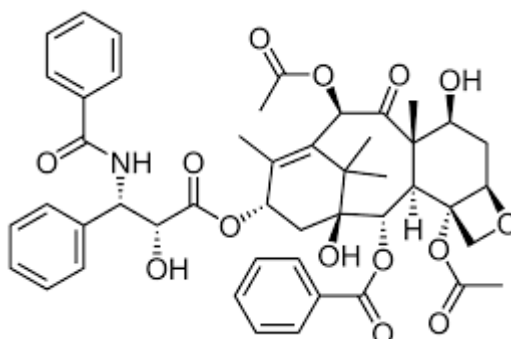
### 4.3.2 Paclitaxel (PTX)

**Sinónimo:** Taxol

**Fórmula:** C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>

**Peso molecular:** 853,906 g/mol

**Estructura química:**



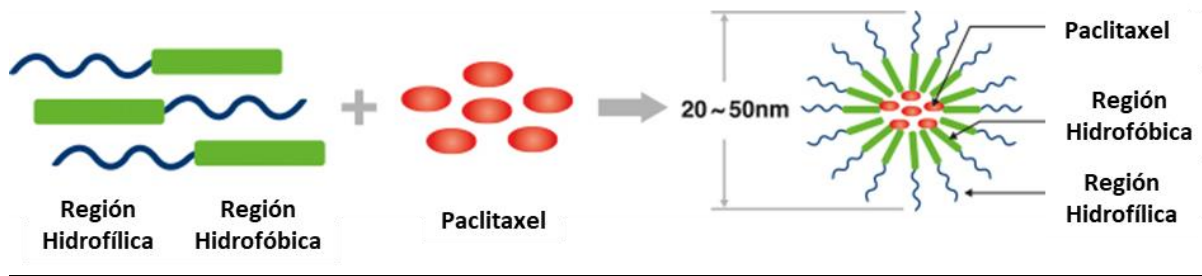
**Adquirido en:** Rhenochem AG (Basilea, Suiza)

El paclitaxel se resuspendió inicialmente en DMSO en una concentración 10 mM y posteriormente se realizaron las correspondientes diluciones en SF.

### 4.3.3 Genexol-PM (GX)

**Características:** formulación polimérica micelar de paclitaxel aprobada para su uso clínico en Hungría, Bulgaria y Corea del Sur. Emplea el co-polímero Metoxi-polietilenglicol-poli(D, L-lactida) como solubilizador. Elaborado por *Samyang Holdings Biopharmaceuticals*

**Estructura**



*Figura 14. Imagen extraída y adaptada de:*

<https://samyangbiopharm.com/eng/ProductIntroduce/injection01>

Para su uso en tratamientos *in vitro*, se preparó una madre en una concentración 10 mM en SF y se sonicó hasta obtener una solución homogénea y de color blanquecino.

#### 4.4 Diseño de nanoformulaciones micelares con Soluplus®

Para este trabajo se diseñaron un conjunto de nano-formulaciones micelares empleando como material formador de las micelas a un copolímero de injerto compuesto por polivinil caprolactama, polivinil acetato y polietilenglicol 6000, el cual es denominado comercialmente Soluplus®. El diseño y caracterización de los sistemas nanomicelares fue llevado a cabo en el laboratorio de Nanomedicinas, dirigido por el Prof. Dr. Diego Chiappetta, del Instituto de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Se utilizaron dos grupos de formulaciones (**Figura 15**): i) Micelas libres de glucosa (S) y ii) Micelas con glucosa (SG); estas últimas fueron decoradas con glucosa en su superficie para favorecer la unión a los transportadores de glucosa en células tumorales (Moretton y col., 2017). En cada uno de estos dos grupos se emplearon micelas blanco (sin cargar) (S, SG), micelas cargadas con histamina (S-HA, SG-HA), micelas cargadas con paclitaxel (S-PTX, SG-PTX) y micelas cargadas con la combinación de histamina y paclitaxel (S-PTX-HA, SG-PTX-HA).

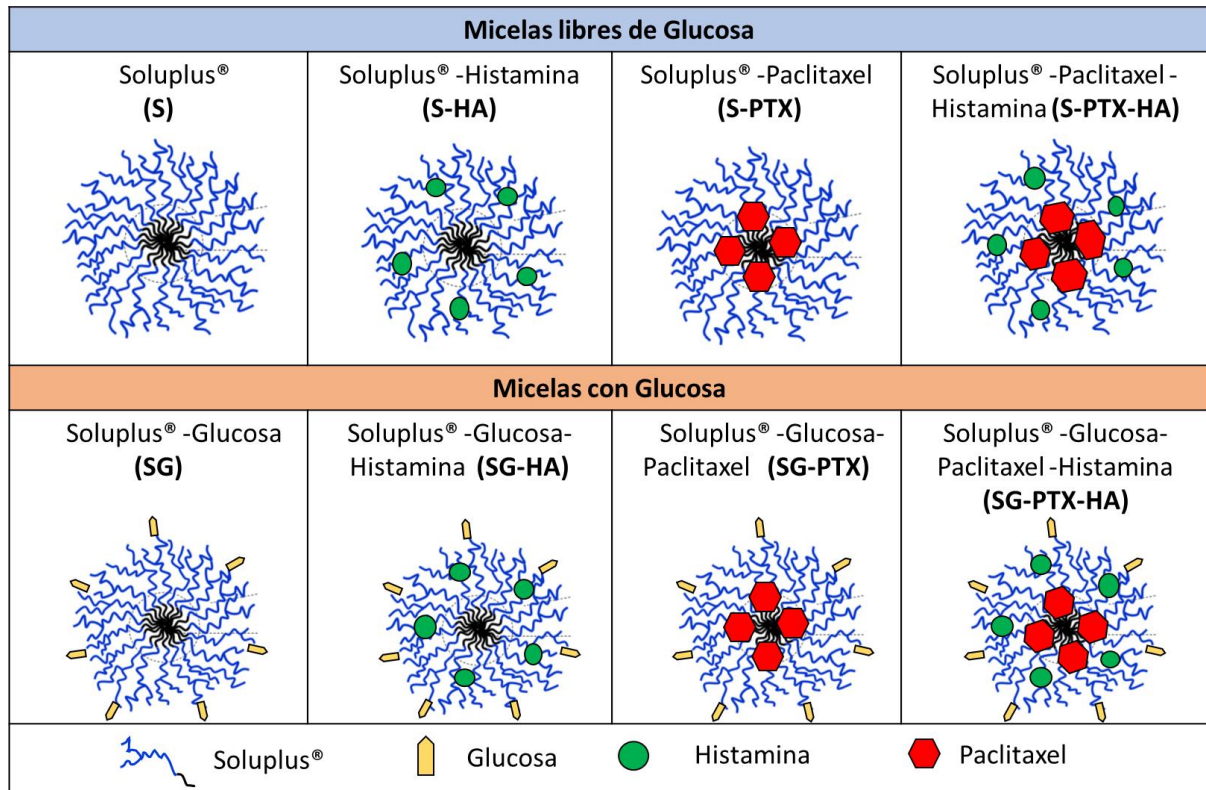


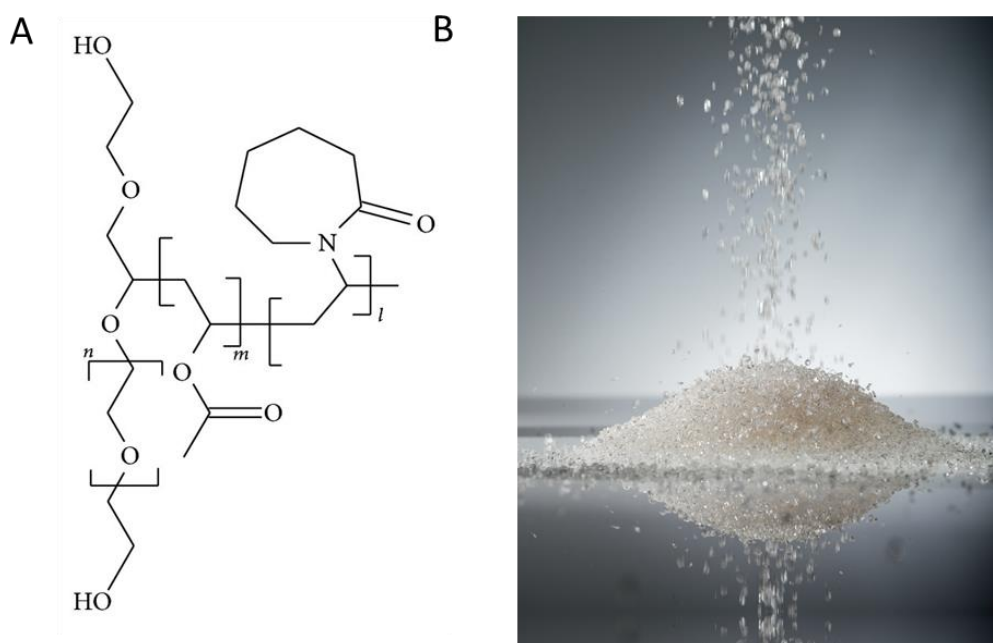
Figura 15. Representación esquemática de las nanoformulaciones micelares utilizados para los tratamientos *in vitro* e *in vivo* en este trabajo.

#### 4.4.1 Soluplus®

El Soluplus® es un solubilizador polimérico que posee una estructura química anfifílica. Debido a su carácter bifuncional, es capaz de actuar como una matriz polimérica para obtener dispersiones sólidas, y a su vez es capaz de solubilizar fármacos poco solubles en medio acuoso.

#### Estructura química y aspecto

Su estructura está compuesta por tres polímeros, por ello se lo denomina copolímero: Polietilenglicol 6000, polivinil caprolactama y acetato de polivinilo. Tiene un peso molecular aproximado de 118000 g/mol y aspecto granular de color blanco a amarillento (*Figura 16*).



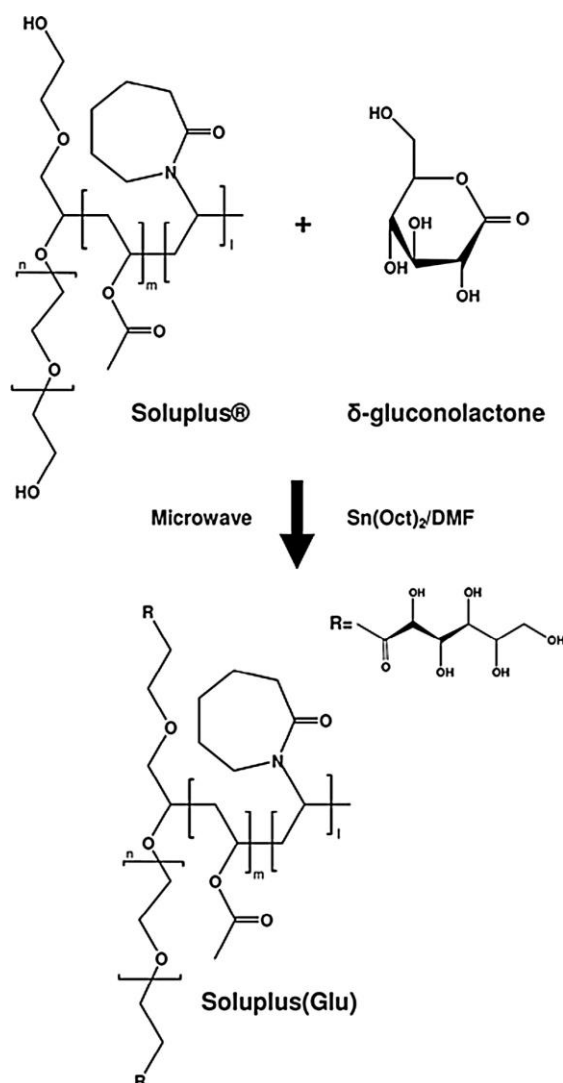
**Figura 16:** A) Estructura química del Soluplus®. B) Aspecto granular del Soluplus® en su estado sólido.

#### 4.4.2 Glucosilación del copolímero Soluplus®

El método de conjugación entre el copolímero y los residuos de glucosa se llevó a cabo mediante una reacción de apertura de anillo de la delta-gluconolactona (Glu) en presencia de Soluplus® (OH-terminal) utilizando microondas (**Figura 17**) como se ha reportado previamente (Bernabeu y col., 2014, Moretton y col., 2010). La síntesis fue llevada a cabo de la siguiente manera, Soluplus® (5 g) y Glu (42,7 mg, 15 % de exceso molar) fueron disueltos en dimetilformamida (DMF, 10 mL) bajo agitación magnética (100 rpm). La mezcla se vertió en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se secó al vacío (100-110 °C, baño de glicerol durante 3 h). Luego, se le añadió a la mezcla el catalizador octoato de estaño (II) [Sn(Oct)2] y se la colocó en el centro de un horno de microondas doméstico (Whirlpool, WMD20SB, frecuencia de microondas 2450 MHz, potencia 800 W, Argentina) con diez niveles de potencia, el cual ha sido adaptado en laboratorio para permitir la conexión de un condensador. La mezcla de reacción se expuso a radiación de microondas durante 1 min a nivel de potencia 2 y 14 min a nivel de potencia 1, lo que representa un tiempo total de reacción de 15 min. Luego, el material crudo se diluyó con agua destilada (10 mL) y se dializó (Membrana de diálisis Spectra/Por,



ancho plano nominal 45 mm, EE.UU.) durante 3 días para eliminar la glucosa sin reaccionar. Finalmente, la dispersión del polímero fue congelada (-20 °C, 24 h) y liofilizada (48 h; temperatura del condensador de -40 °C y presión de 0,03 mbar; FIC-L05, FIC, Scientific Instrumental Manufacturing, Argentina). El copolímero Soluplus® glicosilado se denominó SG (Moretton y col., 2017).



**Figura 17:** Síntesis de Soluplus®-Glucosa (SG) mediante la reacción de apertura de anillo de la delta-gluconolactona en presencia de Soluplus® (OH-Terminal) asistida por microondas.

#### **4.4.3 Preparación de micelas cargadas con paclitaxel (4 mg/mL) e histamina (5 mg/mL)**

La encapsulación de PTX dentro de las micelas con y sin glucosa se llevó a cabo mediante una técnica de difusión de solvente, empleándose en nuestro caso acetona (Bernabeu y col., 2016). Para la preparación de las micelas con PTX se añadió (gota a gota) una solución de PTX en acetona (30 mg/mL, 1,33 mL) a la dispersión micelar (10 mL) con agitación magnética (500 rpm, 10 h) a 25 °C. Luego, las dispersiones micelares se congelaron (-20 °C) y liofilizaron (48 h, temperatura del condensador de -40 °C y 0,03 mbar de presión).

En el caso de las micelas con y sin glucosa cargadas con PTX e HA, fueron preparadas de la siguiente manera: primero se preparó la formulación micelar con PTX (ver arriba), para luego agregar la HA (50 mg) bajo agitación durante 30 min. Una vez obtenido el sistema con PTX e HA, el mismo fue liofilizado como se mencionó previamente.

Las micelas blanco (sin fármacos) fueron utilizadas como control.

#### **4.4.4 Determinación del tamaño micelar promedio (Z-ave), distribución de tamaño e índice de polidispersión (PDI)**

Se determinó el tamaño micelar promedio (Z-ave), la distribución de tamaños y el índice de polidispersión (DPI) de las formulaciones micelares en medio acuoso mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, Zetasizer Nano-ZSP, ZEN5600, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras fueron preparadas en agua destilada y equilibradas a 25 °C durante 24 h. Antes de las mediciones se mantuvieron durante 5 min a 25°C. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar (S.D), n=5.

### **4.5 Ensayos de proliferación celular**

#### **4.5.1 Método Clonogénico**

Para la evaluación de la proliferación celular por el método clonogénico, las células se sembraron en placas de 12 pocillos (entre 900 y 1000 células/pocillo) (Jet Biofil®, China) en 1 mL de medio completo durante 24 h. Luego permanecieron sin tratamiento o se trataron con vehículo (DMSO) o con HA (0,01-10  $\mu$ M), PTX (0,1  $\mu$ g/mL), GX (0,1  $\mu$ g/mL) y con las nano-

formulaciones micelares (entre 0,001- 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PTX) por 5-7 días. Luego, las células se fijaron con formaldehído 2% en PBS, se colorearon con hematoxilina y la proliferación clonogénica, se determinó contando las colonias formadas por 50 o más células. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del número de colonias de células sin tratar.

## 4.5.2 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el método de detección de la fluorescencia emitida en la reducción del compuesto resazurina (CellTiter-Blue; Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se sembraron células en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de medio completo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Jet Biofil®, China) y las células se trataron o no durante 72 h con concentraciones crecientes de HA, PTX y GX, y de las formulaciones micelares. Luego del tratamiento se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del reactivo comercial y se determinó la fluorescencia de las células luego de 15-90 minutos en el lector de placa BMG Labtech NOVostar MicroPlate Reader (Alemania). Se muestra la fluorescencia media para cada tratamiento.

## 4.6 Determinación de la apoptosis celular

### 4.6.1 Ensayo de TUNEL (TdT-mediated UTP-biotin Nick End labeling)

La apoptosis se determinó mediante el ensayo de TUNEL empleando el *kit* de detección de apoptosis *in situ* (*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD, Roche, Basilea, Suiza) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ensayo de TUNEL evalúa la fragmentación del ADN. Las cadenas rotas del ADN son detectadas por unión enzimática de nucleótidos conjugados con digoxigenina al extremo 3'OH libre. Los fragmentos marcados se hacen reaccionar con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa y son detectados con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

Para ello se sembraron células sobre cubreobjetos circulares (12 mm de diámetro, Marienfeld, Alemania) que se colocaron en una placa de 24 pocillos (Jet Biofil®, China) en un volumen de 1  $\text{mL}$  de medio completo. Las células permanecieron sin tratamiento o con vehículo (DMSO) o se trataron con HA, PTX, GX, y/o con las nano-formulaciones micelares durante 72 h. La técnica se realizó siguiendo estrictamente las instrucciones del manual del fabricante.

Finalmente, las células apoptóticas se visualizaron por microscopía óptica usando un microscopio Primovert Karl Zeiss (Alemania). Para cada determinación se contaron por lo menos 200 células. El control negativo se realizó en ausencia del anticuerpo primario. Los resultados se muestran como el porcentaje de células positivas para TUNEL para cada tratamiento.

#### **4.6.2 Marcación con Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V-FITC**

Se utilizó Anexina V-FITC junto con el colorante vital IP para la detección de apoptosis celular. En células normales, la fosfatidilserina se localiza en la superficie citoplasmática de la membrana celular. La inducción de apoptosis produce alteraciones en la membrana plasmática lo que lleva a la exposición de fosfatidilserina en la superficie de las células. En presencia de calcio se produce una unión de alta afinidad entre la fosfatidilserina y la Anexina V, lo que deja evidenciar las células apoptóticas de manera temprana, previo al daño nuclear, a la fragmentación del ADN y a la aparición de muchas moléculas asociadas a la apoptosis.

Para ello, las células se sembraron en placas de 12 pocillos ( $30-50 \times 10^5$  células/pocillo) en 1 mL de medio completo y permanecieron sin tratamiento o con vehículo (DMSO) o se trataron con HA, PTX y/o con las nano-formulaciones micelares. Se reservó el sobrenadante, y las células se cosecharon utilizando tripsina/EDTA. Las células cosechadas y el sobrenadante de cultivo se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. El precipitado obtenido para cada tratamiento se lavó una vez en PBS y una vez con tampón Anexina V (BDB, EE.UU., 0.1 M HEPES pH 7.4, 1.4 M NaCl y 25 mM CaCl<sub>2</sub> en PBS). Las células se resuspendieron en 200 uL de tampón Anexina V y se agregaron 2,5 µL de Anexina V-FITC (BDB, EE.UU.). Los mismos se colocaron en hielo durante 30 minutos y mantuvieron en oscuridad. Finalmente, previo a la medición se adicionaron 2 µL de IP (50 mg/mL) en cada tubo. El porcentaje de células positivas para la marcación con Anexina V y aquellas con doble marca se determinó inmediatamente empleando un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BDB). Los resultados se muestran como fluorescencia media de cada tratamiento respecto de la fluorescencia media de células no tratadas.

## 4.7 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra BALB/c del tipo salvaje de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas a una temperatura de 22-24°C y 50-60% de humedad de acuerdo a un régimen de 12 h luz / 12 h oscuridad con alimento y agua disponible *ad libitum*. Los protocolos de experimentación se realizaron conforme a las recomendaciones del *National Institute of Health* para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Institutional Animal Care and Use Committee Guide-book. ARENA/OLAW, National Institute of Health, 2002. 2º edición*) y se aprobaron por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del lugar de trabajo (Número de referencia: Protocolo 003/2021). En todos los casos, se controló el estado general de los animales, posturas, ingesta de alimento y bebida diariamente. En los casos que se requirió, los animales permanecieron anestesiados con ketamina/xilacina en dosis estándar por peso y bajo control de la temperatura corporal.

### 4.7.1 Generación de tumores mediante inoculación de células 4T1

Para establecer el modelo *in vivo* de cáncer de mama triple negativo singénico se generaron tumores sólidos por inoculación ortotópica con células 4T1 en ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad como se describe en reportes previos (Sterle y col., 2019; Nicoud y col., 2020). Brevemente, las células se cultivaron en placas de cultivo de 10 cm. Cuando estuvieron en confluencia, se lavaron con medio libre de suero y se les adicionó 1 mL de una solución de tripsina/EDTA y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células se cosecharon de la placa con 5-7 mL de medio libre de suero y el volumen se transfirió a un tubo de 15 mL, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendieron en SF y se contaron en cámara de Neubauer. Finalmente, las células se diluyeron de manera tal de obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/mL. 100  $\mu$ L de dicha suspensión se inyectaron con jeringa de tuberculina de 1 mL y aguja 27-G de forma subcutánea y ortotópica en la glándula mamaria abdominal mediante penetración suave a través de la piel con el bisel de la aguja hacia arriba.

Una vez que los tumores fueron palpables, los animales se separaron aleatoriamente en grupos de 4-5 ratones por jaula y se comenzó el tratamiento. El mismo se mantuvo hasta el día del sacrificio. La HA (1 mg/kg) se administró por vía subcutánea (s.c.) diariamente tomando la piel entre los omóplatos de los ratones introduciendo el bisel de la aguja en el espacio generado. El PTX (10 mg/kg) se inyectó de forma intraperitoneal (i.p.) durante 3 veces por semana. Los grupos controles fueron administrados con SF o con DMSO. Las nanoformulaciones se inyectaron mediante dos formas diferentes, una mediante vía i.p y la otra a través de la vena de la cola por vía i.v. En ambos casos, fueron administradas 3 veces por semana (las nanoformulaciones se prepararon de manera que la concentración del PTX fuera de 10 mg/kg, la HA quedó en una concentración final de 12,5 mg/kg).

Luego de los 15 días de tratamiento los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se procedió a pesar todos los órganos, la obtención de sangre y a almacenar a -80 °C los tejidos de interés para su posterior análisis.

## 4.8 Estudios de biodistribución de las formulaciones micelares

### 4.8.1 Biodistribución *in vivo* y *ex vivo*

Un grupo de los animales que desarrollaron tumores 4T1 recibieron por i.v. (vena de la cola) 0,05-0,1 ml de las micelas con Soluplus® marcadas con <sup>99m</sup>Tc (3,7-37 MBq o 0,1-1 mCi/animal). Luego de 15 minutos y 12 h post-administración se obtuvieron imágenes de la biodistribución de los compuestos radiomarcados mediante el uso de una cámara gamma (OHIONUCLEAR, software: IM512P, ALFANUCLEAR). Luego de la obtención de las imágenes, a los animales se les practicó eutanasia mediante uso de cámara de CO<sub>2</sub>, y los órganos de interés fueron resecados, pesados y medidos en un contador de centelleo sólido (Alfanuclear, ZX, Argentina) para evaluar la cantidad de sonda radiactiva acumulada en el tejido de interés como el porcentaje de dosis acumulada en cada órgano normalizada por el peso del órgano (%ID/g) (Tesán y col., 2019). Estos estudios de diagnóstico por imágenes se realizaron en colaboración con la Prof. Dra. Salgueiro, en el Laboratorio de Radioisótopos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), que cuenta con un laboratorio habilitado por la

Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) para el uso de radioisótopos y medición de muestras radiactivas.

#### 4.9 Ensayo *in vitro* de hemólisis

Los potenciales efectos citotóxicos de las formulaciones micelares fueron estudiados en eritrocitos mediante el ensayo de hemólisis. Se obtuvo sangre fresca de rata y anticoagulada con citrato de sodio (1:9). El plasma se colectó luego de centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. La fracción celular de la sangre fue lavada con SF, centrifugada y nuevamente se removió el sobrenadante. Este proceso se repitió 3 veces. Posteriormente se diluyó el pellet en SF para obtener una suspensión de eritrocitos de 25% p/v. El ensayo de hemólisis fue llevado a cabo como se ha reportado previamente (Qui y col., 2014). Brevemente, alícuotas de 1 mL de la suspensión de eritrocitos fue agregada a 1 mL de dispersiones micelares con concentraciones finales de 1 y 10 µg/mL. Todas las muestras fueron preparadas en SF. Suspensiones de eritrocitos fueron incubadas (1:1) con SF y agua para establecer los controles negativos y positivos, respectivamente. Las muestras se mezclaron mediante inversión durante 10 minutos y fueron incubadas a 37°C por 1 h. Luego de la incubación, las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. Finalmente, la absorbancia de la hemoglobina liberada en el sobrenadante fue medida a 541 nm (8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard, EE.UU.). El porcentaje de hemólisis fue calculado como:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left( \text{Absorbancia de la muestra} - \frac{\text{Absorbancia del negativo}}{\text{Absorbancia del positivo} - \text{Absorbancia del negativo}} \right) * 100 \quad (1)$$

Según bibliografía, se consideran hemolíticas sustancias con un porcentaje mayor a un 10% de hemólisis (Krzynzaniak y col., 1997)

#### 4.10 Determinaciones enzimáticas en plasma

Muestras de plasma (200 µl) de cada animal utilizado en los experimentos se enviaron a la Dra. Graciela Inés López del Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires para la determinación de enzimas plasmáticas tales como alanina aminotransferasa (GPT), aspartato aminotransferasa (GOT), fosfatasa alcalina (FAL),

creatina quinasa (CK), isoenzima MB de la creatinquinasa (CK-MB) y lactato deshidrogenasa (LDH). Los valores se expresan en Unidades Internacionales por litro (UI/L).

#### **4.11 Preparación de suspensiones celulares de ganglios linfáticos drenantes de tumor y bazo para determinar subpoblaciones de células inmunitarias**

Inmediatamente después del sacrificio de los animales el ganglio linfático drenante de tumor y los bazos se disgregaron mecánicamente a través del uso de una malla metálica de 1 mm. Posterior a una centrifugación, las suspensiones celulares resultantes se trataron con tampón hipotónico (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.1 mM EDTA) para realizar la lisis de los eritrocitos y luego se resuspendieron en tampón de citometría (0.5% SFB, 2 mM EDTA en PBS). Posteriormente, se llevó a cabo la inmunofenotipificación de las suspensiones celulares (Sterle y col., 2016), utilizando el siguiente panel comercial de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (FITC: Isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, APC: alofocianina), adquiridos en *BD Biosciences* (BDB): anti-CD3-FITC de ratón (BDB-561798), anti-CD4-FITC de ratón (BDB-557307), anti-CD8-PE de ratón (BDB-553032), anti-CD19-PE de ratón (BDB-557399), anti-Ly-6G y Ly6-C-FITC de ratón (GR-1, BDB-553126), anti-CD11b-PE de ratón (BDB-557397), anti-CD49b-FITC de ratón (BDB-561066). Para ello, células provenientes de las suspensiones celulares de bazos y ganglios previamente lavadas con tampón de citometría, se incubaron en una placa de 96 pocillos de fondo en U (Jet Biofil®, China) durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos correspondientes a cada subpoblación en un volumen final de 30 µL por tubo. Luego de la incubación, las muestras se lavaron 2 veces con tampón de citometría y se fijaron en formaldehído al 1% en PBS. Los distintos subtipos de células inmunitarias se identificaron mediante análisis por citometría de flujo usando el citómetro Accuri C6 (BDB). Se construyeron los gráficos de puntos correspondientes y se calcularon los porcentajes de cada subpoblación.

#### **4.12 Determinación de TBARS**

El ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es un método para evaluar la peroxidación lipídica. El método usado en este trabajo fue descrito por Yagi (Yagi y col., 1976) y adaptado como se ha reportado previamente (Martinel Lamas y col., 2013).



Brevemente, una parte del órgano de interés, hígado o corazón, fue homogeneizado en tampón fosfato pH 7.4. A la muestra se le agregó el reactivo conteniendo ácido tricloroacético, HCL y 2-tiobarbitúrico. La mezcla se hirvió durante 1 h y luego fue centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) a 535 nm. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de  $\epsilon=3.28 \times 10^5 \text{ M/cm}$  para el cálculo de TBARS (umol/mg de órgano).

#### 4.13 Análisis estadísticos

Los resultados *in vitro* se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM) de al menos tres experimentos independientes, mientras que resultados *in vivo* se expresaron como la media  $\pm$  el desvío estándar de la media (DS). El tipo de análisis estadístico se determinó de acuerdo a las características de cada ensayo y a la determinación de la distribución de las variables mediante el Test de normalidad *Shapiro Wilks*. Se utilizó el Test T de *Student* o el Test no paramétrico *Mann-Whitney* para comparaciones entre dos grupos. Para comparaciones entre más de dos grupos se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de una vía o el Test no paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo en todos los casos. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa *GraphPad Prism* versión 7 (EE.UU.).

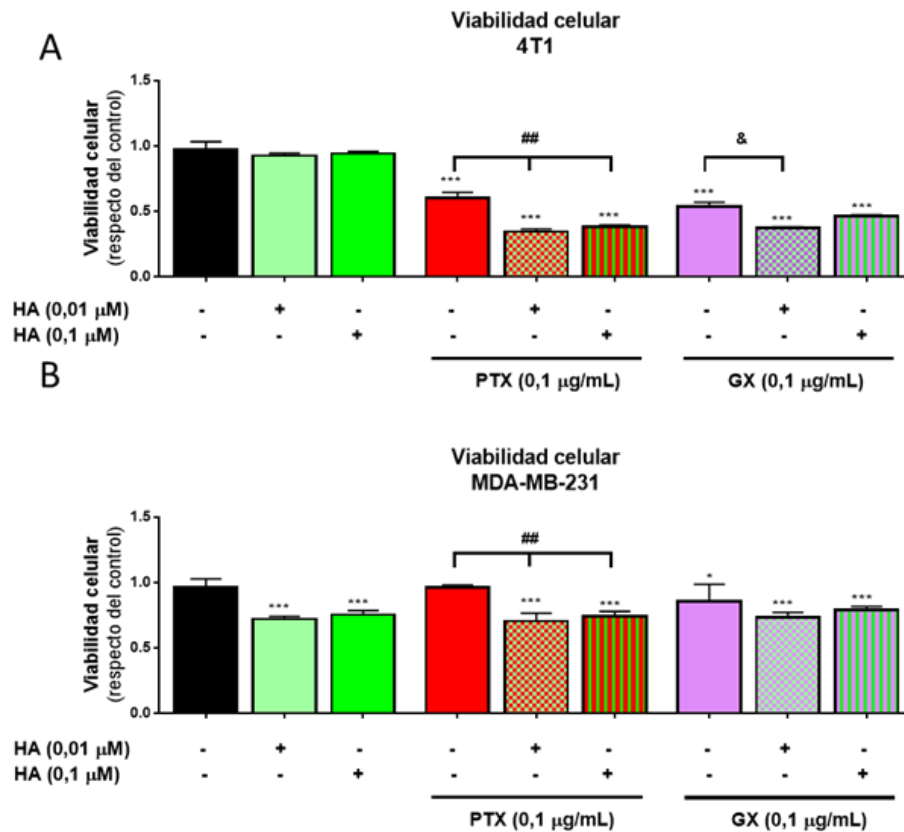
## 5. Resultados

### 5.1 Estudio del efecto antitumoral de formulaciones de paclitaxel en combinación con histamina

#### 5.1.1 Resultados *in vitro*

Con el fin de estudiar el efecto del tratamiento con formulaciones de paclitaxel (PTX) en combinación con histamina (HA) sobre la viabilidad celular *in vitro*, se realizó el ensayo de *celltiter blue* (CTB) que consiste en observar la fluorescencia emitida por la reducción del reactivo resazurina, proceso que es únicamente llevado a cabo por células viables. De este modo, se prosiguió a sembrar células de dos líneas de cáncer mamario triple negativo (CMTN) humanas MDA-MB-231 y murinas 4T1 en placas de 96 pocillos y luego de realizar los tratamientos a 72 h de incubación, se adicionó el reactivo antes mencionado para su determinación. La fluorescencia fue medida en el lector de placa *BMG Labtech NOVostar MicroPlate Reader* (Alemania).

En un primer ensayo, utilizando como tratamiento el PTX en estado libre o el Genexol® (GX) (ambos en una concentración de 0,1 µg/mL) solos y en combinación con HA, se observa que significativamente disminuye la viabilidad celular respecto del control. Por otro lado, en ambas líneas celulares, el tratamiento combinado de PTX con HA en las concentraciones 0,1 y 0,01 µM fue más efectivo que el PTX solo (**Figura 18A,B**). A su vez, en la línea celular 4T1, se evidenció que la menor concentración de HA (0,01 µM) potencia el efecto del tratamiento con la formulación comercial GX (**Figura 18A**).

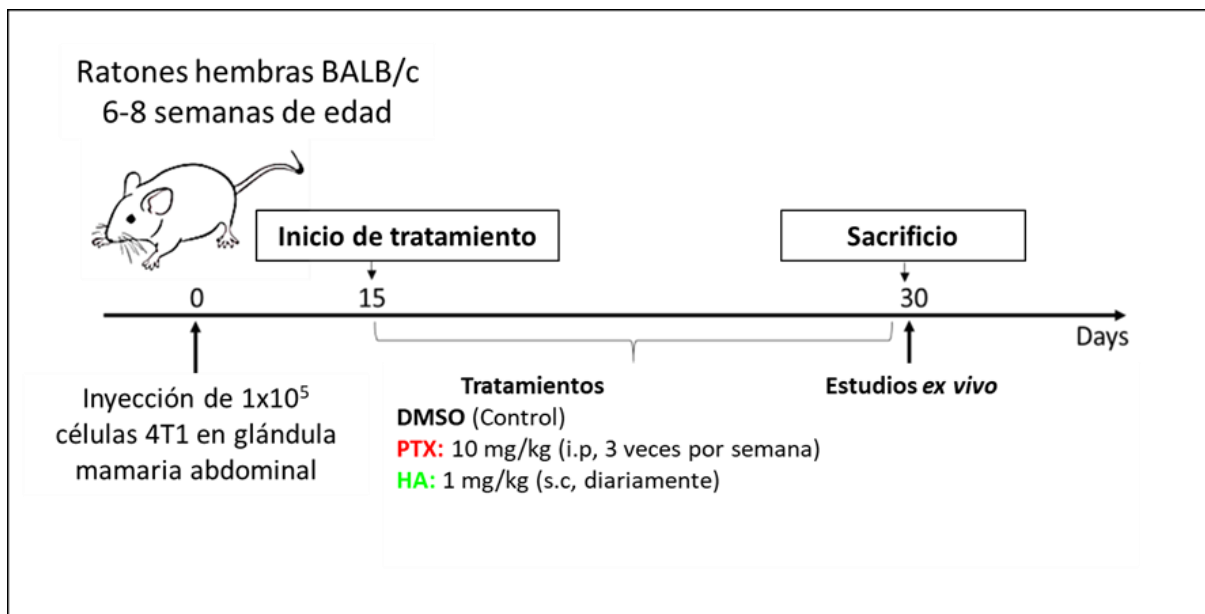


**Figura 18. Efecto de la histamina (HA) en combinación con paclitaxel (PTX) o Genexol (GX) en la viabilidad celular.** Las células se trataron con HA (0,01–0,1 uM), PTX (0,1 ug/mL) o GX (0,1 ug/mL) durante 3 días y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de detección de la fluorescencia emitida en la reducción del compuesto resazurina en la línea celular **A)** 4T1 y **B)** MDA-MB-231. Las barras de error representan la media ± ESM. (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. control; ### $P < 0,005$  vs. PTX 0,1 μg/mL, & $P < 0,05$  vs. GX 0,1 μg/mL).

Interesantemente, en la línea celular MDA-MB-231 se observó que el tratamiento único de HA en ambas concentraciones (0,01-0,1μM) disminuyó la proliferación respecto del control demostrando tener efectos antitumorales propios, como habíamos reportado previamente (Martinel Lamas y col., 2013a) (**Figura 18B**). Por otra parte, también se pudo distinguir que a medida que se aumenta la concentración del quimioterapéutico se obtiene un mayor efecto antiproliferativo; pero sobrepasada una determinada concentración, la eficiencia de la terapia disminuye. Se cree que este fenómeno puede deberse a la baja solubilidad que posee el PTX en medio acuoso en grandes concentraciones (resultados no presentados).

### 5.1.2 Resultados *in vivo*

Más tarde, para poder validar los resultados obtenidos *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* utilizando un modelo de CMTN desarrollado en ratones hembra BALB/c mediante la inoculación de células 4T1. Una vez que los tumores fueron palpables, los ratones fueron separados de forma aleatoria en 3 grupos según el tratamiento a recibir: DMSO (Control), tratamiento con PTX (10 mg/kg) (Dian y col., 2018) y tratamiento con PTX (10 mg/kg) en combinación con HA (1 mg/kg) (Nicoud y col., 2020). Los ratones recibieron 3 dosis de los distintos regímenes por semana, durante 15 días. Durante el lapso de tiempo en que los ejemplares fueron tratados, se los controló en cuanto a su peso total y tamaño tumoral. Cumplido el tiempo de tratamiento, se procedió al sacrificio de los animales con el fin de realizar experimentos *ex vivo* para indagar aún más en la efectividad de los distintos tratamientos (**Figura 19**).

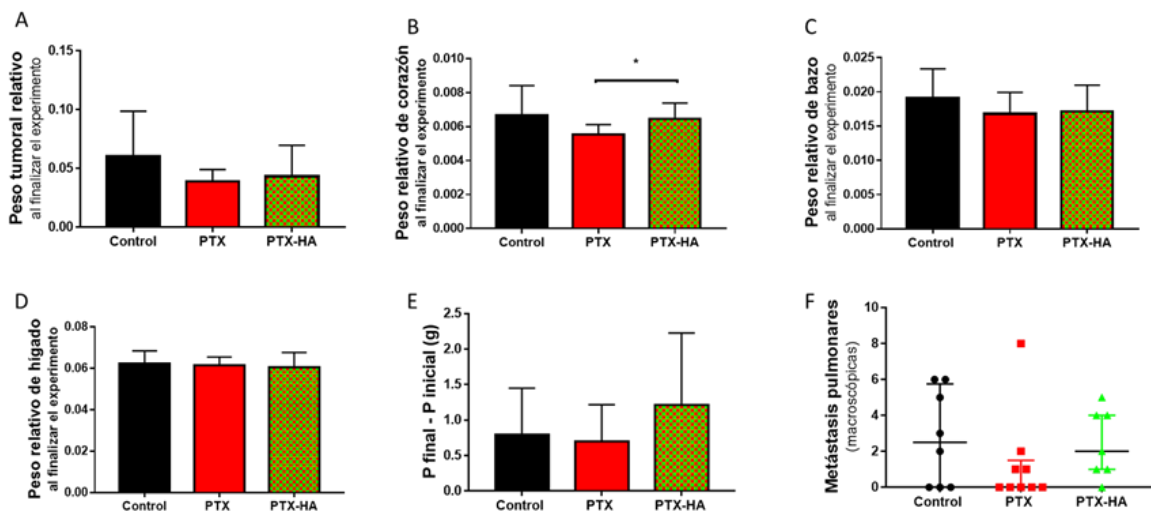


**Figura 19.** Diseño experimental para la evaluación *in vivo* del efecto antitumoral del tratamiento con paclitaxel (PTX) en combinación con la histamina (HA).

Al observar el peso tumoral de los animales, a pesar de notarse una pequeña disminución en los animales tratados tanto únicamente con PTX como en combinación con HA, estas diferencias respecto del control no resultan ser significativas (**Figura 20A**). Sin embargo, al

analizar el peso del corazón relativo al peso corporal de cada individuo se pudo observar que la HA en el tratamiento combinado es capaz de revertir el efecto cardiotoxico generado por el PTX. Este resultado sugiere un efecto protector de la HA sobre la cardiotoxicidad que caracteriza a la quimioterapia basada en el uso de PTX (*Figura 20B*).

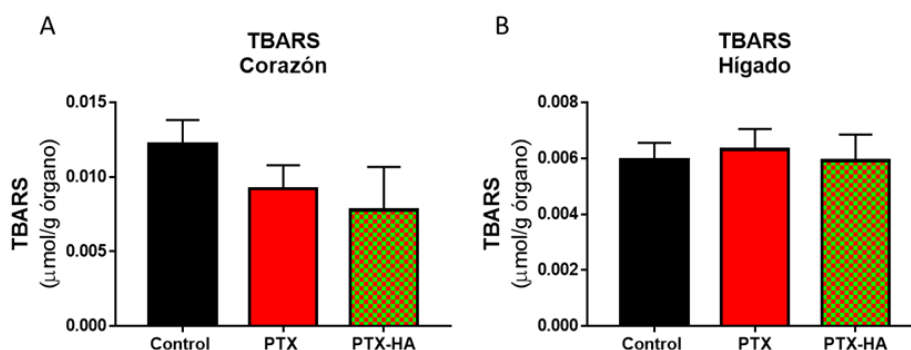
Por otra parte, no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos analizados en cuanto a la diferencia resultante de los pesos finales e iniciales, pesos relativos del hígado y bazo, y la cantidad de metástasis pulmonares (*Figura 20C-F*).



**Figura 20. Efecto del tratamiento combinado de histamina (HA, 1 mg/kg) y paclitaxel (PTX, 10 mg/kg) en un modelo de CMTN desarrollado en ratones BALB/c con células 4T1.** Se evaluaron parámetros de crecimiento tumoral y pesos de órganos de animales controles (tratados con el vehículo DMSO, n= 8), tratados con PTX (n=9) y con la combinación de HA y PTX (n=7). Se muestra **A)** el peso tumoral, **B)** el peso del corazón (*T test* \**P*<0,05 PTX vs. PTX-HA), **E)** peso del bazo y **D)** el peso del hígado de los animales relativo al peso corporal al final del experimento. Las barras representan la media ± DE. **E)** Se muestra la diferencia entre el peso final de los animales y el peso al inicio del tratamiento. **F)** Se contabilizaron macroscópicamente las metástasis pulmonares (el gráfico representa la distribución de puntos con la mediana y los rangos intercuartiles).

Realizando estudios en profundidad del daño generado por estrés oxidativo en corazón e hígado en los 3 grupos, se llevaron a cabo experimentos de determinación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en dichos órganos mediante la técnica de TBARS. Las

diferencias encontradas no fueron significativas en ninguno de los órganos en cuestión (*Figura 21A-B*).



*Figura 21.* Evaluación del daño por oxidación lipídica mediante la detección de TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) en muestras de **A)** corazón y **B)** hígado. Las barras representan la media  $\pm$  DE. Paclitaxel (PTX) 10 mg/kg, Histamina (HA) 1 mg/kg.

## 5.2 Estudio del efecto antitumoral de nanoformulaciones micelares con paclitaxel en combinación con histamina

### 5.2.1 Caracterización micelar

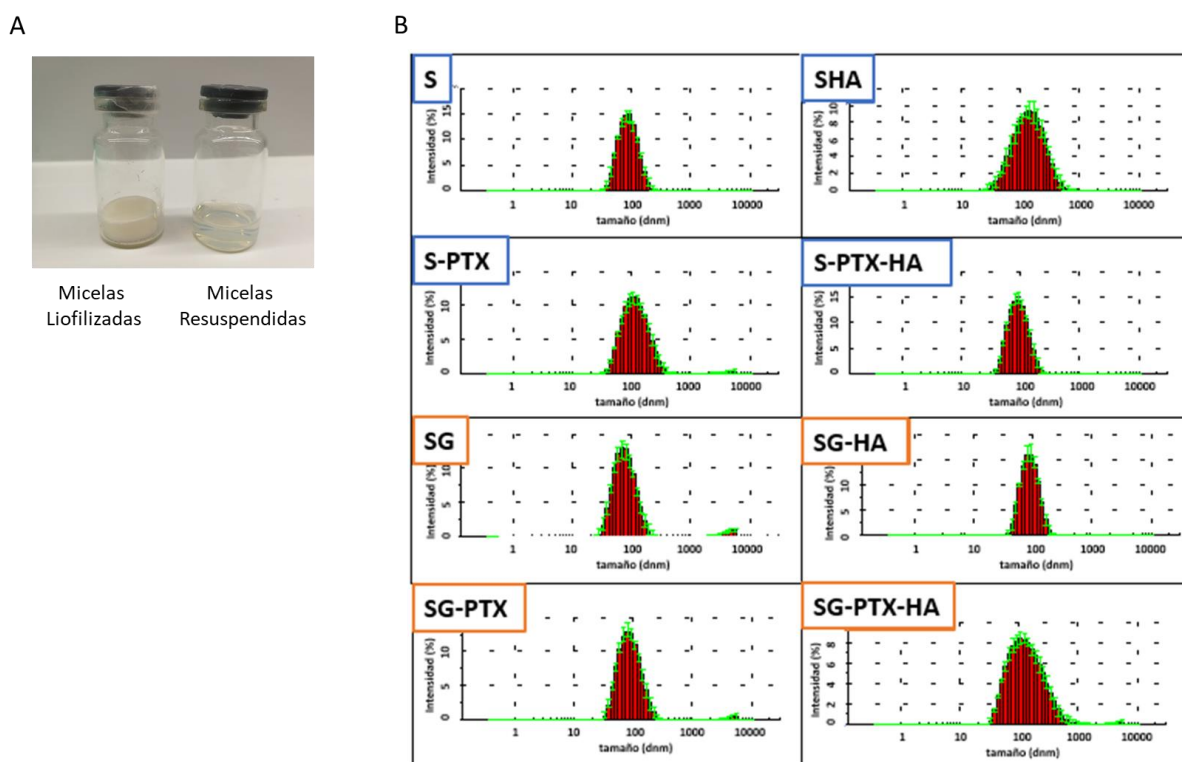
Las nanomicelas se obtuvieron en colaboración con el Prof. Dr. Diego Chiappeta de la Cátedra de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB) de la UBA, quien nos las proporcionó y realizó su previa caracterización (*Figura 22A*). Las mismas se desarrollaron únicamente a partir del polímero Soluplus® (S) o del mismo recubierto con residuos de glucosa (SG) en la superficie. Ambos tipos de micelas fueron cargadas con histamina (HA, 5 mg/mL) y/o con paclitaxel (PTX, 4 mg/mL).

En primer lugar, se caracterizó a las micelas en función de su tamaño promedio (Z-Ave). Se observó que el rango en el que varía el tamaño de estas nanoformulaciones fue de 80 a 100 nm, mostrando una distribución unimodal entre las nanopartículas con las mismas propiedades. Dicha uniformidad de tamaño se corroboró también a través del índice de polidispersión (PDI) que tomó valores cercanos a 0.2 indicando dicha propiedad de la distribución de tamaños (*Tabla*

III). Ésta última información fue obtenida mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz, cuyos gráficos resultantes se encuentran presentes en la *Figura 22B*.

Sistemas micelares		Z-Ave (nm) (±SD)	PDI (±SD)
Micelas libres de Glucosa	Soluplus 5% p/v (S)	79.0 (1.0)	0.13 (0.02)
	Soluplus 5% p/v con PTX 4 mg/ml (S-PTX)	101.3 (1.9)	0.21 (0.01)
	Soluplus 5% p/v con Histamina 5 mg/ml (S-HA)	115.5 (1.0)	0.24 (0.01)
	Soluplus 5% p/v with PTX 4 mg/ml con Histamina 5 mg/ml (S-PTX-HA)	82.3 (1.6)	0.14 (0.01)
Micelas con Glucosa	Soluplus-glucosa 5% p/v (SG)	71.4 (1.5)	0.22 (0.01)
	Soluplus-glucosa 5% p/v con PTX 4 mg/ml (SG-PTX)	78.3 (0.9)	0.19 (0.01)
	Soluplus-glucosa 5% p/v con Histamina 5 mg/ml (SG-HA)	80.5 (0.8)	0.12 (0.02)
	Soluplus-glucosa 5% p/v con PTX 4 mg/ml y con Histamina 5 mg/ml (SG-PTX-HA)	107.8 (2.0)	0.26 (0.01)

**Tabla III: Caracterización de los sistemas micelares.** Se muestran los tamaños promedios en nm (Z-Ave) e índice de polidispersión (PDI), con sus respectivos desvíos estándar (DE).



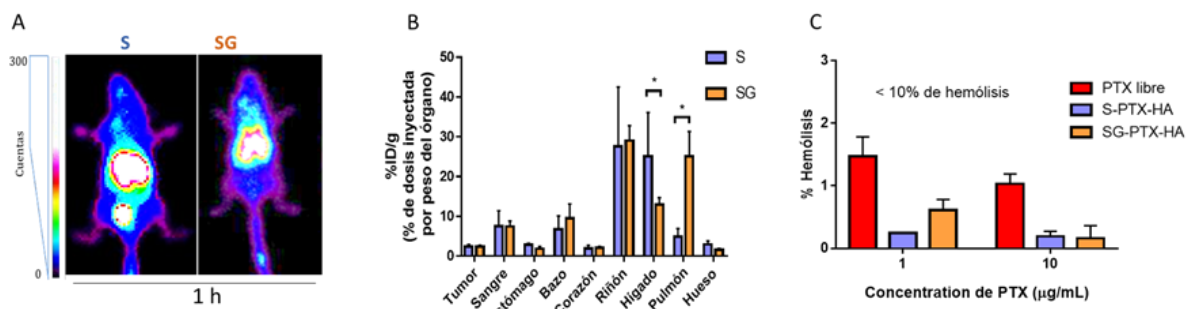
**Figura 22: Caracterización de las nanoformulaciones micelares.** *A)* Aspecto macroscópico de las micelas liofilizadas y redispersadas en agua destilada. *B)* Histogramas de la distribución de los tamaños de las distintas nanoformulaciones observándose una distribución unimodal.

## 5.2.2 Estudios de biodistribución de las nanoformulaciones

En colaboración con la Prof. Dra. Jimena Salguero del Laboratorio de Radioisótopos, FFyB de la UBA, se llevaron a cabo ensayos para evaluar la biodistribución de las nanomicelas *in vivo* (**Figura 23A**). Micelas marcadas radiactivamente con  $^{99m}\text{Tc}$  se inyectaron a animales BALB/c que tenían desarrollado tumores 4T1 y se pudo evaluar *in vivo* mediante la obtención de imágenes en una cámara *gamma* que las micelas con y sin glucosa presentan acumulación en el sitio tumoral, como así también en otros órganos (**Figura 23A**). Luego mediante el análisis *ex vivo* de la actividad en los órganos de los animales se pudo observar una acumulación significativa de las micelas radiomarcadas en riñón, hígado y pulmón. Las micelas con glucosa (SG) exhibieron una menor acumulación en riñón, pero mayor en pulmón que las micelas sin glucosa (S) (**Figura 23B**).



Para evaluar el posible daño citotóxico en eritrocitos, se realizaron estudios de hemólisis comparando el PTX en su estado libre (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ) contra las micelas S-PTX-HA y SG-PTX-HA donde el PTX permaneció en las mismas concentraciones que el PTX libre. Los resultados obtenidos demostraron un menor porcentaje de hemólisis de las células sanguíneas en los casos en los que se utilizaban las nanoformulaciones. Sin embargo, los tres tratamientos estuvieron muy por debajo del límite de 10% de hemólisis, por lo que se las considera no hemolíticas (Krzynzaniak y col., 1997) (**Figura 23C**).

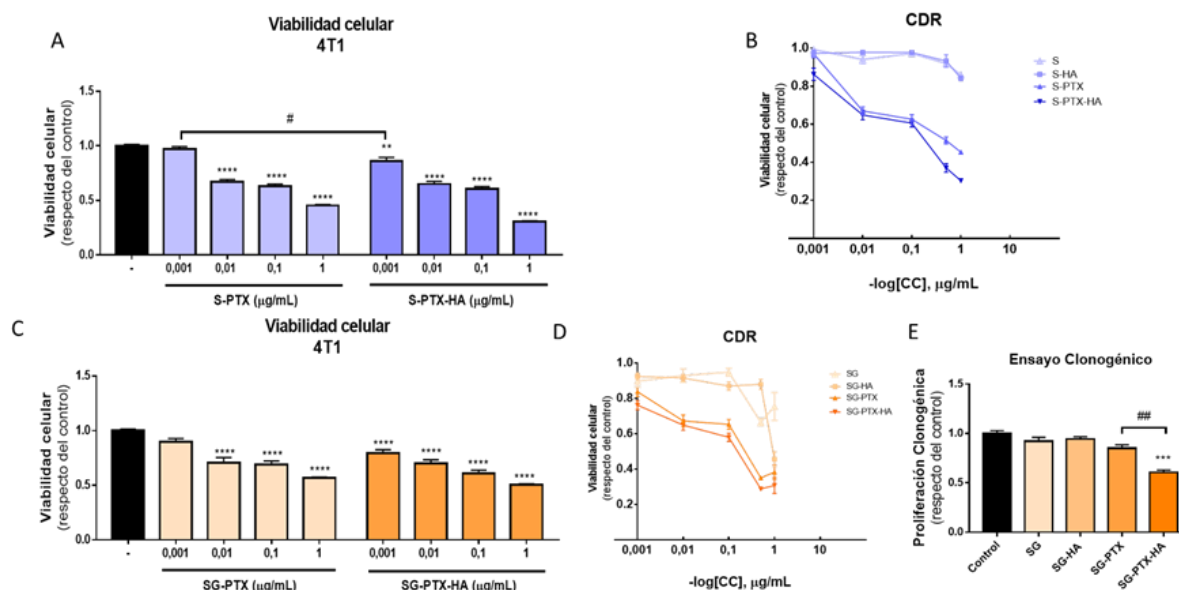


**Figura 23: Caracterización de las nanoformulaciones micelares.** **A)** Se muestra la biodistribución in vivo de las nanoformulaciones micelares con glucosa (SG) y sin glucosa (S). Las imágenes fueron obtenidas en una cámara gamma (OHIONUCLEAR, software: IM512P, ALFANUCLEAR, Argentina) en animales BALB/c portadores de tumores desarrollados con las células 4T1 1 hora post-inyección con las nanoformulaciones marcadas con el radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$ . Las flechas amarillas indican la acumulación de las micelas en la zona tumoral (Zoom: 1.5; Matriz: 256x256; Actividad Inyectada: 0,1 mCi; Colimador: alta resolución). A la izquierda se muestra la escala de colores con el máximo y mínimo de cuentas y los colores correspondientes a la señal. Escala: arcoíris. **B)** El gráfico representa la distribución ex vivo de las micelas marcadas con el radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$  como el porcentaje de la dosis inyectadas por gramo de tejido (%ID/g). Este estudio se realizó utilizando un contador de centelleo sólido (Alfanuclear, ZX, Argentina). **C)** Se presenta el porcentaje de hemólisis resultante de los diferentes tratamientos en las concentraciones 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de PTX. Para ello se incubaron suspensiones de eritrocitos con las nanoformulaciones durante 1 hora en agitación leve a 37°. En **B)** y **C)** los gráficos de barra representan la media  $\pm$  DE. (T test \* $P < 0,05$  hígado y pulmón de animales inyectados con micelas S respecto de animales inyectados con micelas SG).

### 5.2.3 Estudios *in vitro* con las nanoformulaciones de paclitaxel en combinación con histamina en las células 4T1

El ensayo de viabilidad celular mostró que tanto para micelas sin glucosa (S) como en las que tienen glucosa (SG) hay una disminución en la viabilidad de manera dosis dependiente cuando se cargaron tanto con PTX sólo como con la combinación de HA y PTX. Se puede observar que la nanoformulación de S-PTX-HA en la concentración 0,001  $\mu\text{g/mL}$  fue más efectiva en la reducción de la viabilidad comparada con la nanoformulación S-PTX en la misma concentración evidenciando que a bajas concentraciones la histamina potencia el efecto del PTX sólo (**Figura 24A,C**). Se muestran además curvas dosis respuesta para todo el conjunto de nanoformulaciones (**Figura 24B,D**) en donde también se puede observar el efecto de disminución de la viabilidad dependiente de la concentración ( $\text{IC}_{50(\mu\text{g/mL})}$  S-PTX=  $0,50 \pm 0,10$ ;  $\text{IC}_{50(\mu\text{g/mL})}$  S-PTX-HA=  $0,18 \pm 0,11$ ;  $\text{IC}_{50(\mu\text{g/mL})}$  SG-PTX=  $0,20 \pm 0,10$ ;  $\text{IC}_{50(\mu\text{g/mL})}$  SG-PTX-HA=  $0,18 \pm 0,09$ ).

A su vez, para las micelas con glucosa, el ensayo clonogénico mostró una reducción significativa de la proliferación celular en las células tratadas con SG-PTX-HA respecto de las tratadas con SG-PTX (PTX en una concentración de 0,0001  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Figura 24E**). Es importante mencionar que el vehículo, es decir ambos sistemas micelares libres comienzan a presentar efectos citotóxicos en las cantidades que corresponden a nanomicelas cargadas con concentraciones mayores a 10  $\mu\text{g/mL}$  de PTX.



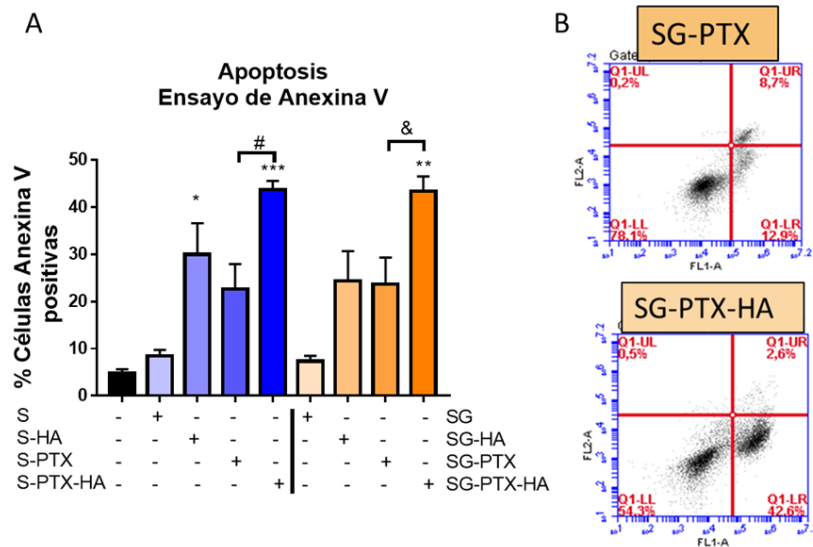
**Figura 24: Estudio del efecto de las nanoformulaciones micelares en la proliferación de la línea celular 4T1.** Las células se dejaron sin tratar (control) o se trataron con las nanoformulaciones micelares A) sin glucosa (S) y C) con glucosa (SG) en las concentraciones 0,001, 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 3 días y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de detección de la fluorescencia emitida en la reducción del compuesto resazurina. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey,  $**P < 0,005$ ,  $****P < 0,0001$  vs. control; #P  $< 0,005$  S-PTX 0,001  $\mu\text{g/mL}$  vs. S-PTX-HA 0,001  $\mu\text{g/mL}$ ). Se realizaron curvas dosis respuesta (CDR) de la viabilidad celular para B) micelas libres de glucosa y D) micelas con glucosa. E) Las células se trataron o no con las nanoformulaciones micelares con glucosa (HA y PTX 0,0001  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 7 días y se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo clonogénico. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey,  $***P < 0,001$  vs. control; ##P  $< 0,005$  SG-PTX-HA vs. SG-PTX).

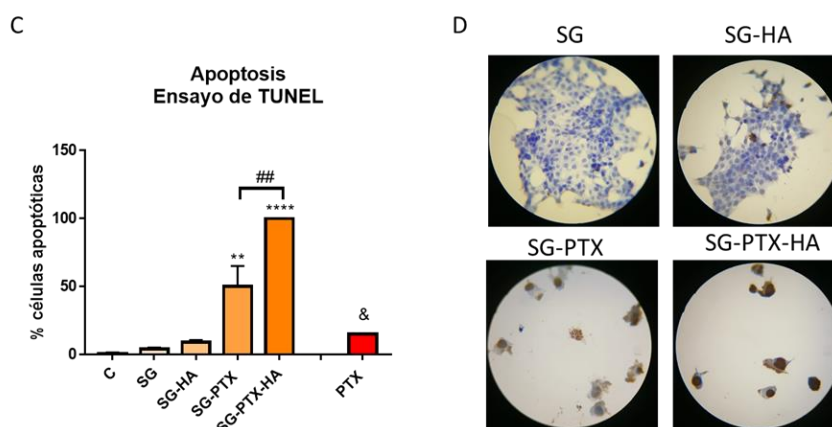
Continuando con los experimentos *in vitro*, se evaluó la muerte celular por apoptosis a partir de ensayos de Anexina V. Los resultados mostraron que el tratamiento micelar combinado, glicosilado o no, de PTX e HA 0.01 $\mu\text{g/mL}$  induce una mayor apoptosis celular respecto de las respectivas nanoformulaciones únicamente cargadas con PTX y el control. Curiosamente, la micela S-HA por sí sola fue capaz de elevar el número de células apoptóticas respecto del control, (Figura 25A). En la Figura 25B se muestran gráficos de puntos

representativos de la citometría de flujo para las micelas con glucosa cargadas con PTX y con la combinación de PTX-HA, donde se evidencia para éstas últimas una mayor acumulación de células en el cuadrante Q1-LR correspondiente a células positivas para la marca de anexina V.

Adicionalmente, a fin de confirmar los resultados obtenidos en el experimento de anexina V, se realizaron ensayos de TUNEL.

Los datos obtenidos demostraron que, como se puede observar en la **Figura 25C**, las micelas SG-PTX-HA en concentraciones 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  poseen un mayor efecto apoptótico sobre las células, en comparación a las micelas SG-PTX en la misma concentración. A su vez, ambas nanoformulaciones demostraron ejercer una mayor muerte celular en la línea 4T1, respecto del control e incluso del PTX en estado libre (**Figura 25C**). Se muestran imágenes representativas al microscopio de la detección de las células TUNEL positivas (núcleos marrones) (**Figura 25D**).





**Figura 25.** A) Evaluación de la apoptosis de las células 4T1 frente al tratamiento con las nanoformulaciones micelares con (SG) y sin glucosa (S) (HA, PTX 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mediante el ensayo de Anexina V por citometría de flujo. Las barras representan la media  $\pm$  ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. micela libre (S o SG); # $P < 0,05$  S-PTX-HA vs. S-PTX, & $P < 0,05$  SG-HA-PTX vs SG-PTX. B) Se muestran gráficos de punto representativos de la apoptosis de las células 4T1 tratadas con las micelas con glucosa cargadas con PTX y con la combinación de PTX-HA. En los cuadrantes derechos pueden observarse las células Anexina V positivas. C) Evaluación de la apoptosis de las células 4T1 frente al tratamiento con las nanoformulaciones micelares con glucosa (HA, PTX 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con PTX libre (0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mediante el ensayo de TUNEL. Las barras representan la media  $\pm$  ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, \*\* $P < 0,005$ , \*\*\*\* $P < 0,001$  vs. control; ## $P < 0,005$  SG-PTX-HA vs. SG-PTX, & $P < 0,05$  PTX libre vs. SG-PTX y SG-PTX-HA. D) Imágenes microscópicas representativas de la apoptosis de las células 4T1 tratadas con las micelas decoradas con glucosa (magnificación 400X).

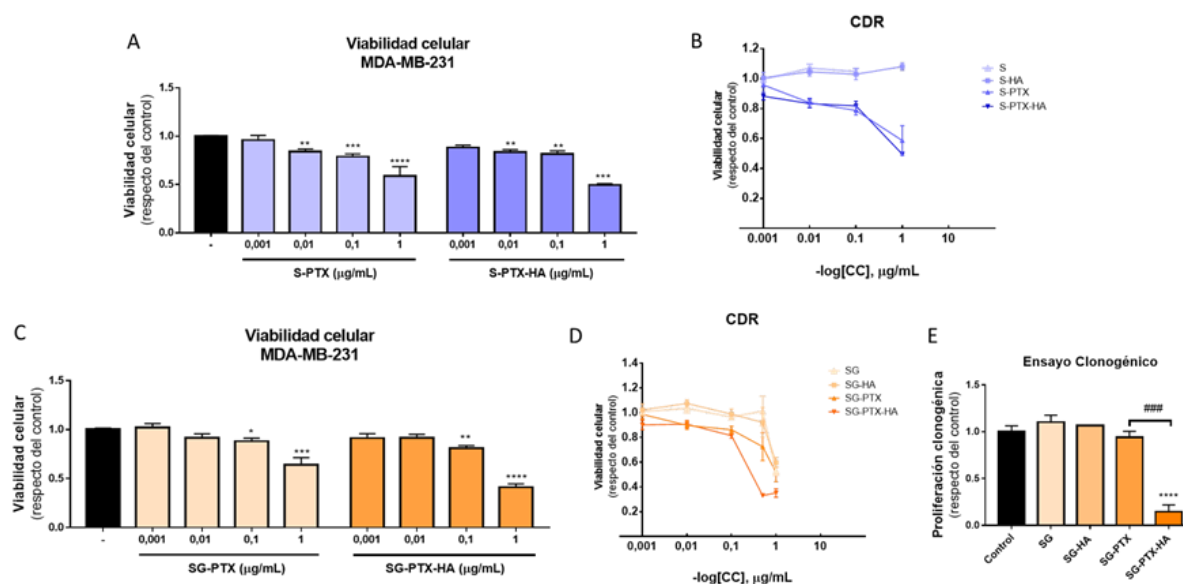
#### 5.2.4 Estudios *in vitro* con las nanoformulaciones de paclitaxel en combinación con histamina en las células MDA-MB-231

Los mismos experimentos descriptos para la línea celular 4T1 fueron realizados para la línea de CMTN humana, MDA-MB-231.

Evaluando la viabilidad celular a través del ensayo de CTB se comprobó que tanto las micelas glicosiladas (SG-PTX y SG-PTX-HA) como las no glicosiladas (S-PTX y S-PTX-HA) ejercen un efecto negativo en la viabilidad celular, mientras que las nanoformulaciones por sí

solas o que poseen únicamente histamina, no resultan citotóxicas a las concentraciones utilizadas (0,001 -1  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Figura 26A,C**). Asimismo, las curvas dosis respuesta (CDR) ratifican la inhibición de la proliferación, mediada por ambos grupos micelares de forma dosis dependiente, siendo mayor el efecto a mayores concentraciones. ( $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$  S-PTX=  $1,29 \pm 0,69$ ;  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$  S-PTX-HA=  $0,77 \pm 0,39$ ;  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$  SG-PTX=  $1,97 \pm 0,20$ ;  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$  SG-PTX-HA=  $0,52 \pm 0,18$ ) (**Figura 26B,D**).

Nuevamente a través de ensayos de proliferación más sensibles como los experimentos clonogénicos se observó que, incluso a concentraciones 0,0001  $\mu\text{g/mL}$ , la micela combinada continúa potenciando la actividad antiproliferativa del PTX. De forma contraria, como se ve representado en el gráfico **E** de la **Figura 26**, la micela SG-PTX no mostró diferencias significativas en cuanto a la inhibición de la proliferación respecto del control en dicha concentración.



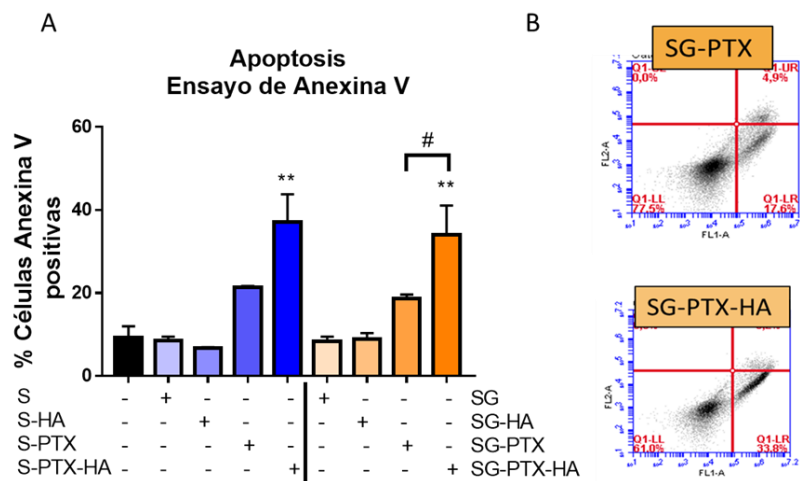
**Figura 26: Estudio del efecto de las nanoformulaciones micelares en la proliferación de la línea celular MDA-MB-231.** Las células se dejaron sin tratar (control) o se trataron con las nanoformulaciones micelares **A**) sin glucosa (S) y **C**) con glucosa (SG) en las concentraciones 0,001, 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 3 días y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de detección de la fluorescencia emitida en la reducción del compuesto resazurina. Las barras representan la media  $\pm$  ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey,  $**P < 0,005$ ,  $***P < 0,001$ ,

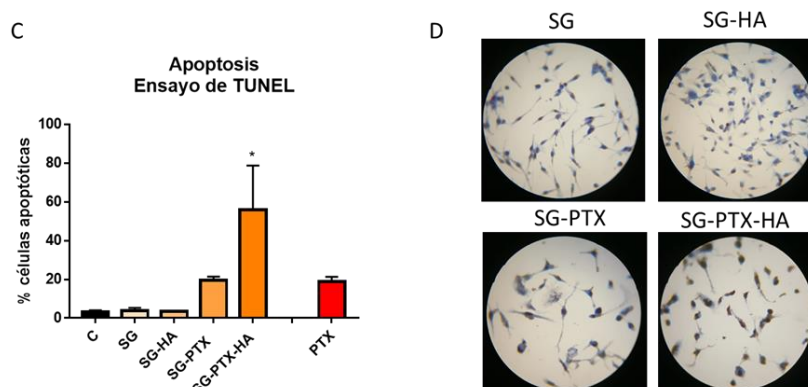
\*\*\*\* $P < 0,0001$  vs. control). Se realizaron curvas dosis respuesta (CDR) de la viabilidad celular para **B) micelas libres de glucosa y D) micelas con glucosa. E) Las células se trataron o no con las nanoformulaciones micelares con glucosa (HA y PTX 0,0001  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 7 días y se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo clonogénico. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, \*\*\*\* $P < 0,0001$  vs. control; ### $P < 0,001$  SG-PTX-HA vs. SG-PTX).**

Más tarde, se realizaron estudios del porcentaje de células apoptóticas a través de ensayos de anexina V medidos por citometría de flujo. Los resultados obtenidos revelaron que las micelas con residuos de glucosa y aquellas no glicosiladas, cargadas con PTX e HA, presentaron un elevado porcentaje de células en proceso de apoptosis respecto del control. Por otro lado, las micelas SG-PTX-HA superaron significativamente el porcentaje de apoptosis visto en las células tratadas con SG-PTX, (**Figura 27A,B**).

También se llevaron a cabo experimentos de TUNEL para confirmar los resultados obtenidos por los ensayos de anexina V. El recuento de células apoptóticas se realizó por microscopía óptica y se describe en la **Figura 27B**.

Nuevamente se observó un porcentaje de células apoptóticas más elevado en aquellas tratadas con las micelas glicosiladas cargadas con PTX y HA, respecto del control (**Figura 27A**). Por otro lado, las micelas SG-PTX, no aumentaron la apoptosis celular de forma significativa al igual que el tratamiento con PTX libre.





**Figura 27.** **A)** Evaluación de la apoptosis de las células MDA-MB-231 frente al tratamiento con las nanoformulaciones micelares con (SG) y sin glucosa (S) (HA, PTX 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mediante el ensayo de Anexina V por citometría de flujo. Las barras representan la media  $\pm$  ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey,  $**P < 0,005$  vs. micela libre (S o SG);  $\#P < 0,05$  SG-PTX-HA vs. S-PTX. **B)** Se muestran gráficos de punto representativos de la apoptosis de las células MDA-MB-231 tratadas con las micelas con glucosa cargadas con PTX y con la combinación de PTX-HA. En los cuadrantes derechos pueden observarse las células Anexina V positivas. **C)** Evaluación de la apoptosis de las células MDA-MB-231 frente al tratamiento con las formulaciones micelares con glucosa (HA, PTX 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con PTX libre (0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mediante el ensayo de TUNEL. Las barras representan la media  $\pm$  ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey,  $*P < 0,05$  vs. control. **D)** Imágenes microscópicas representativas de la apoptosis de las células MDA-MB-231 tratadas con las micelas con glucosa (magnificación 400X).

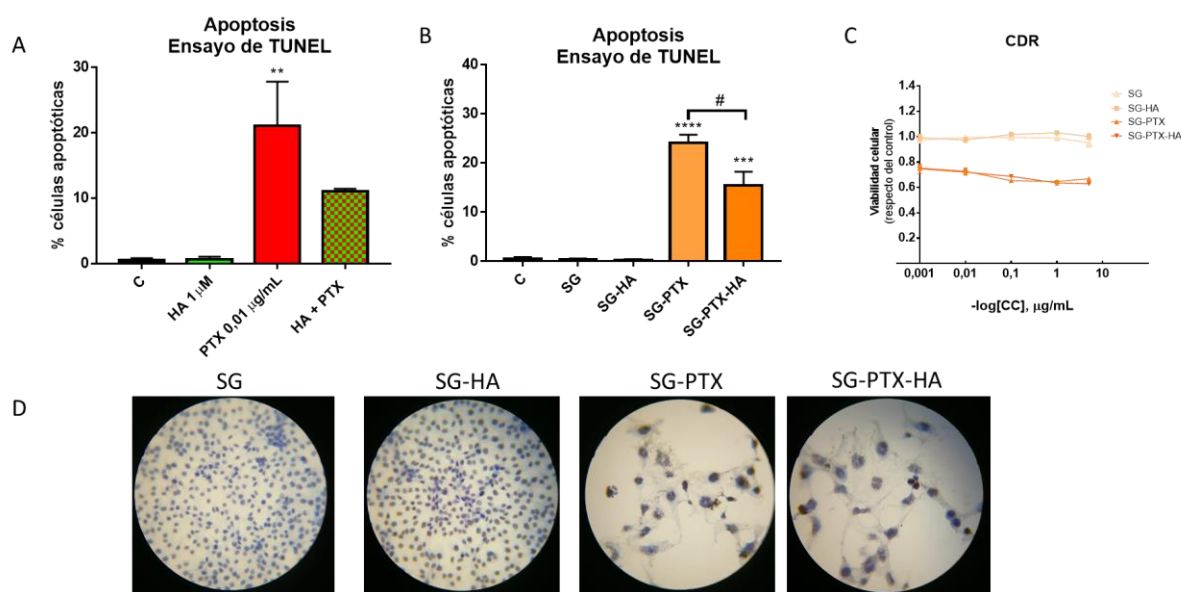
### 5.2.5 Estudios *in vitro* con las nanoformulaciones de paclitaxel en las células HBL-100

En cuanto a los últimos experimentos *in vitro* realizados, se buscó evaluar la toxicidad de las nanoformulaciones en la línea celular HBL-100, una línea no tumorigénica de células epiteliales derivadas de la glándula mamaria. Además, se estudió si la HA era capaz de proteger a las células del daño ocasionado por la terapia con PTX. Para ello, se observó el porcentaje de células apoptóticas mediante ensayos de TUNEL frente a los diferentes tratamientos. A las células cultivadas en portaobjetos circulares en placas de 24 pocillos se les administró únicamente PTX 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o en combinación con HA 1  $\mu\text{M}$ , tanto en estado libre como



integrado en las nanoformulaciones. Los resultados obtenidos del recuento microscópico de células positivas para apoptosis (**Figura 28D**), mostraron que el tratamiento único con PTX libre y en micela elevaba el porcentaje de células apoptóticas respecto del control. Al mismo tiempo, la micela combinada SG-PTX-HA también demostró tener cierto grado de citotoxicidad aumentando la apoptosis respecto de las células que no recibieron tratamiento. Sin embargo, se observa en ambos grupos (drogas en estado libre y en nanoformulaciones) que la adición de HA al tratamiento promueve la reducción de la apoptosis de las células no tumorigénicas respecto del PTX como monoterapia, siendo estas diferencias significativas para el grupo micelar, (**Figura 28A-B**).

En línea con los experimentos realizados anteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular con el objetivo de comprobar nuevamente el efecto quimioprotector de la HA en el tratamiento contra el CMTN. Para ello, se utilizó la técnica de CTB que, como se mencionó anteriormente, se basa en la reducción del reactivo resazurina por parte de células viables a un compuesto capaz de ser detectado por fluorescencia. De esta manera, las células cultivadas en placas de 96 pocillos fueron tratadas durante 72 h con las diferentes nanoformulaciones (SG, SG-HA, SG-PTX y SG-PTX-HA) en distintas concentraciones (0,001 - 10 $\mu$ g/mL). Los resultados obtenidos demostraron que, a pesar de haber una reducción de la viabilidad celular tanto en las micelas SG-PTX como en las SG-PTX-HA, a medida que se aumenta la concentración del tratamiento la viabilidad celular tiende a mantenerse constante (**Figura 28C**). Los datos nuevamente resaltan el rol protector de la HA en la línea celular no tumorigénica HBL-100.

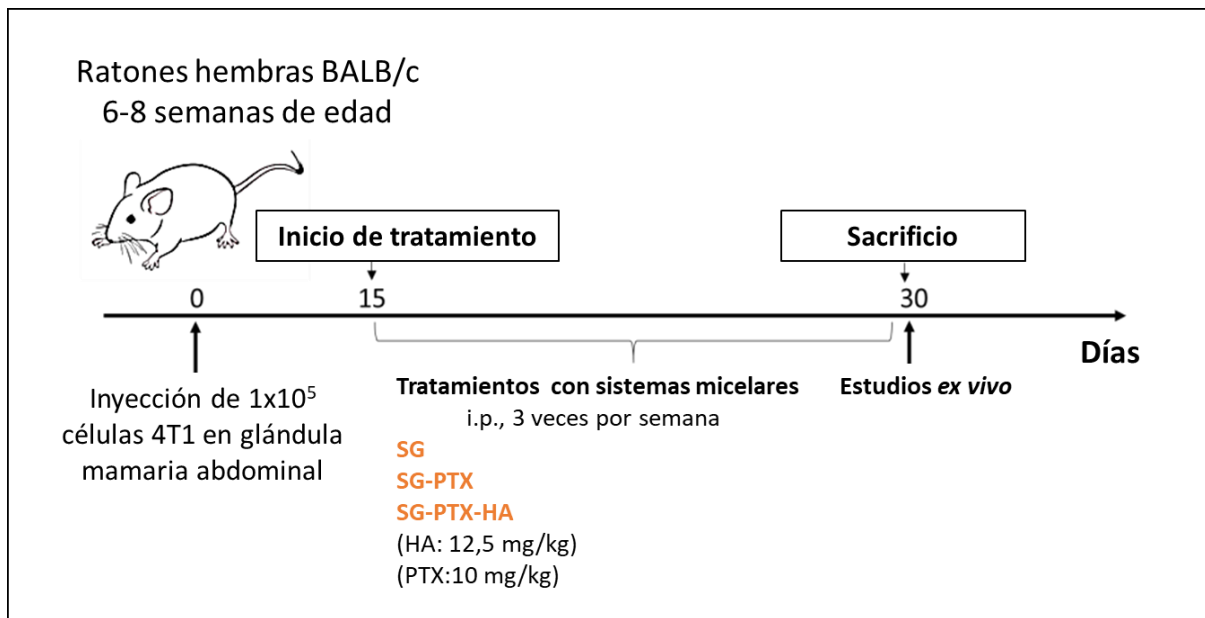


**Figura 28.** Evaluación de la apoptosis de las células no tumorigénicas HBL-100 frente al tratamiento con **A**) Histamina (HA), Paclitaxel (PTX) y en combinación (HA-PTX) y **B**) con las nanoformulaciones micelares con glucosa (HA, PTX 0,01 μg/mL) mediante el ensayo de TUNEL. Las barras representan la media ± ESM (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  vs. control; # $P < 0,05$  SG-PTX-HA vs. SG-PTX. **C**) Curvas dosis respuesta (CDR) de la viabilidad celular para tratamientos con las micelas con glucosa. **D**) Imágenes microscópicas representativas de la apoptosis de las células HBL-100 tratadas con las micelas con glucosa (magnificación 400X).

### 5.2.6 Estudios *in vivo* con las nanoformulaciones micelares de paclitaxel en combinación con histamina

Por último, para comprobar el efecto antitumoral de las nanoformulaciones micelares en un modelo de CMTN *in vivo*, se desarrollaron tumores en ratones BALB/c mediante la inyección ortotópica de células 4T1. Luego de establecido el tumor en los animales, se los separó en 3 grupos diferentes de acuerdo al tratamiento micelar a recibir: tratamiento con SG (control), tratamiento con SG-PTX y tratamiento con SG-PTX-HA, todas en dosis 10 mg/kg de PTX (en aquellas micelas combinadas la HA quedó en una dosis final de 12,5 mg/kg). Es importante mencionar que en este experimento la vía administración de las drogas se realizó mediante inyección intraperitoneal (i.p), 3 veces por semana durante 15 días. Pasada la etapa

de tratamiento, se procedió al sacrificio y extracción de los distintos órganos para su conservación y posterior realización de experimentos *ex vivo*. El flujo de trabajo trazado para el experimento se encuentra representado esquemáticamente en la **Figura 29**.

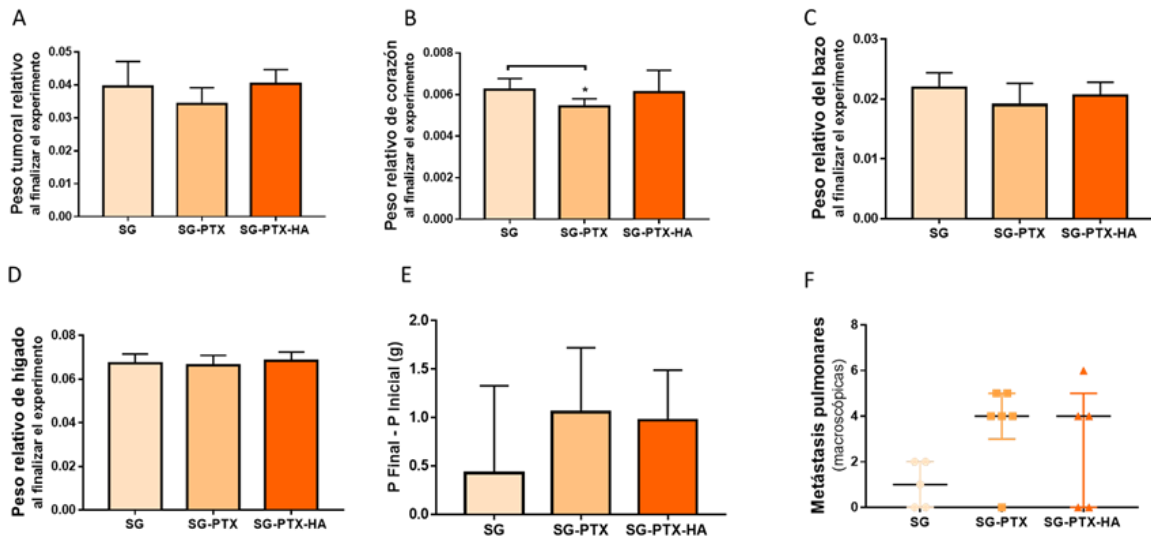


**Figura 29.** Diseño experimental: Evaluación del efecto antitumoral de nanoformulaciones con paclitaxel en combinación con la histamina en un modelo de cáncer de mama murino triple negativo. Vía de administración intraperitoneal (i.p).

En primer lugar, se observó que el peso tumoral relativo al peso corporal de los animales al final del experimento no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados (SG, SG-PTX, SG-PTX-HA). En cambio, en cuanto al peso relativo del corazón si se observaron diferencias entre el grupo tratado con SG-PTX y el grupo SG. Se evidenció un significativo descenso del peso del corazón en el primer grupo mencionado respecto del grupo control, (**Figura 30A**). Sin embargo, el peso relativo del corazón en el grupo SG-PTX-HA no mostró cambio significativo respecto del grupo SG (**Figura 30B**).

Al mismo tiempo, no se observaron diferencias significativas entre los pesos relativos del bazo, hígado y en la diferencia entre peso inicial y final de los ratones entre los tres grupos analizados. En cuanto a la cantidad de metástasis pulmonares, tampoco se obtuvieron

diferencias estadísticamente significativas al momento del sacrificio de los animales (*Figura 30C-F*).



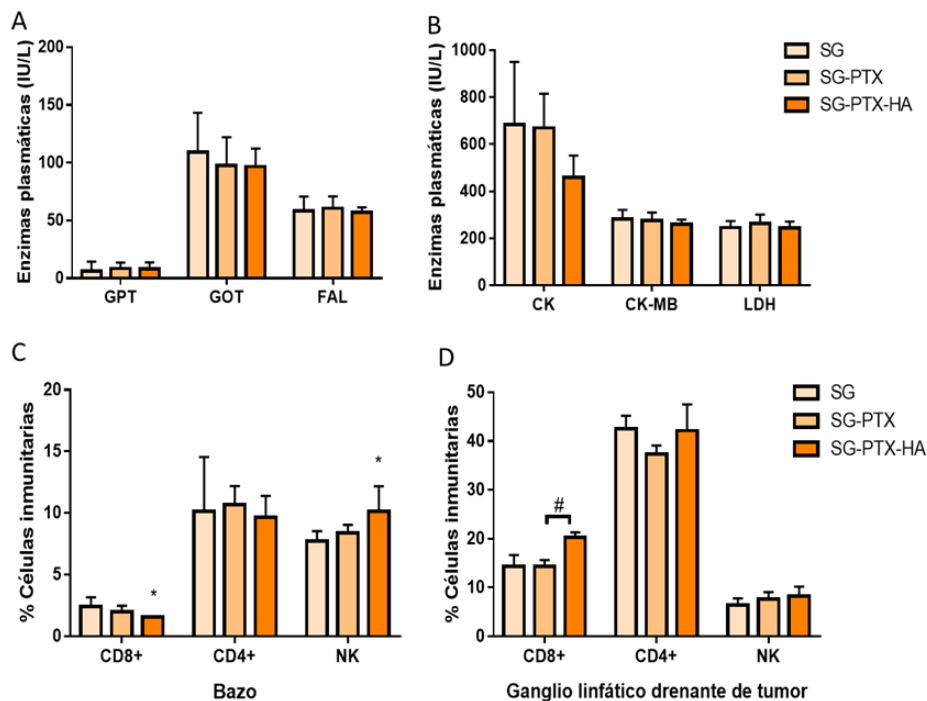
**Figura 30:** Efecto del tratamiento con las nanoformulaciones micelares con glucosa (SG) cargadas con histamina (HA) y paclitaxel (PTX, 10 mg/kg) por vía intraperitoneal en un modelo de CMTN desarrollado en ratones BALB/c con células 4T1. Se evaluaron parámetros de crecimiento tumoral y pesos de órganos de animales tratados con SG (n= 5), SG-PTX (n=6) y SG-HA-PTX (n=5). Se muestra **A)** el peso tumoral, **B)** el peso del corazón (Test de Kruskal-Wallis, \*P<0,05 SG-PTX vs. SG), **E)** peso del bazo y **D)** el peso del hígado de los animales relativo al peso corporal al final del experimento. Las barras representan la media ± DE. **E)** Se muestra la diferencia entre el peso final de los animales y el peso al inicio del tratamiento. **F)** Se contabilizaron macroscópicamente las metástasis pulmonares (el gráfico representa la distribución de puntos con la mediana y los rangos intercuartiles).

Por otra parte, se realizó la determinación de enzimas en plasma obtenido de todos los animales. Los resultados se encuentran expresados en la *Figura 31A-B*. Como se puede observar no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las determinaciones enzimáticas entre los 3 grupos analizados.

Adicionalmente, se investigó la distribución de distintas subpoblaciones de células inmunitarias tanto en ganglios linfáticos drenantes de tumor como en bazo. En cuanto a las

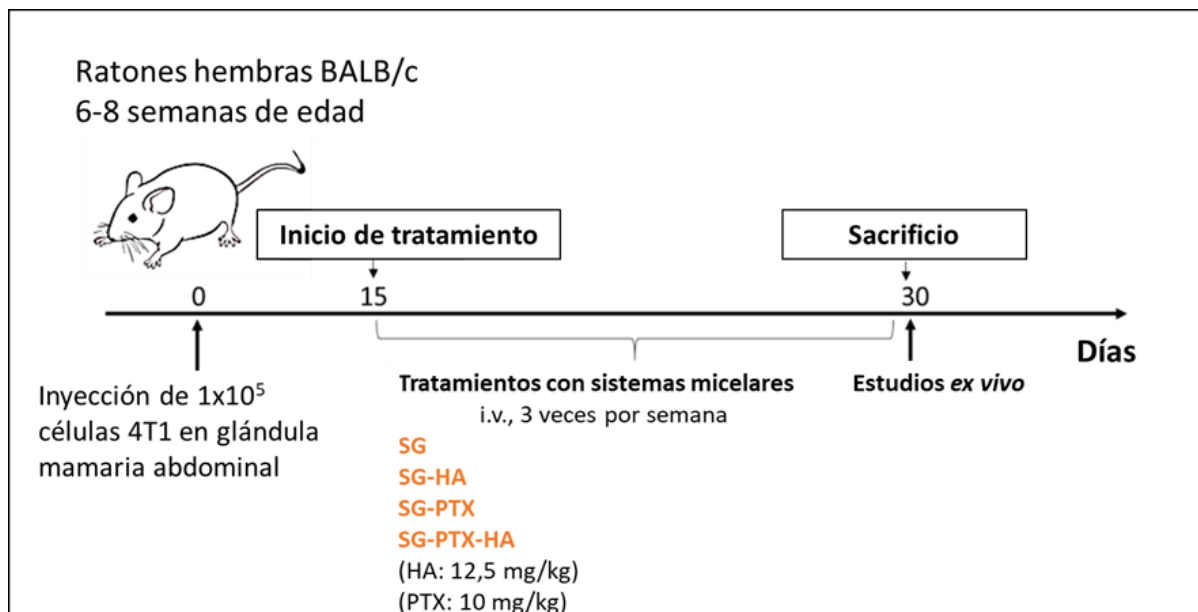
subpoblaciones presentes en el bazo, se puede observar una disminución estadísticamente significativa de la subpoblación de linfocitos T CD8+ en el grupo de ratones tratados con el sistema micelar SG-PTX-HA respecto del control. Por el contrario, el grupo SG-PTX no presentó diferencias significativas en el porcentaje de células T CD8+ situadas el bazo. Por otra parte, en cuanto a las células T CD4+, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos analizados. Sin embargo, en lo que respecta a la subpoblación de células *natural killer* (NK) se evidenció un aumento en el porcentaje de las mismas presente en el bazo en aquellos individuos tratados con la micela combinada con PTX e HA a comparación del grupo control, (**Figura 31C-D**).

En referencia a las mismas subpoblaciones analizadas anteriormente, pero esta vez en el ganglio drenante de tumor no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de células T CD4+ y NK allí presentes. No obstante, los linfocitos T CD8+ se vieron aumentados en el grupo tratado con SG-PTX-HA con respecto a los ratones que recibieron la terapia micelar de SG-PTX, mientras que no se observaron disimilitudes entre los otros dos grupos restantes (**Figura 31D**).



**Figura 31. A), B)** Evaluación de enzimas plasmáticas en animales tratados por vía intraperitoneal con las nanoformulaciones micelares con glucosa (SG). Se determinó en plasma la alanina aminotransferasa (también llamada transaminasa glutámico pirúvica GPT; valor del vehículo:  $1,7 \pm 2,9$  IU/L), aspartato aminotransferasa (también llamada transaminasa glutámico-oxalacética GOT; valor del vehículo:  $94,0 \pm 23,4$  IU/L), fosfatasa alcalina (FAL, valor del vehículo:  $64,8 \pm 13,3$  IU/L), creatina quinasa (CK, valor del vehículo:  $503,0 \pm 157,9$  IU/L), isoenzima miocárdica de la creatina quinasa (CK-MB, valor del vehículo:  $261,0 \pm 48,5$  IU/L) y lactato deshidrogenasa (LDH, valor del vehículo:  $320,8 \pm 108,8$  IU/L). Evaluación de subpoblaciones de células inmunitarias en suspensiones celulares de **C)** bazo y **D)** ganglio linfático drenante de tumor se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos: CD8-PE: marcador de linfocitos T citotóxicos, CD4-FITC: marcador de linfocitos T colaboradores y CD49-PE y CD3-FITC: marcadores de células NK. (Test Mann Whitney  $*P < 0,05$  SG-PTX-HA vs. SG,  $\#P < 0,05$  SG-PTX-HA vs. SG-PTX).

Finalmente, a fin de investigar si la vía de administración de los tratamientos tiene alguna injerencia en la efectividad de las terapias administradas, se procedió a realizar un nuevo experimento *in vivo*, cambiando la vía de administración intraperitoneal a una administración por vía intravenosa (i.v). Así es que nuevamente, en un modelo murino CMTN desarrollado mediante la inyección ortotópica de células 4T1, se probaron las distintas nanoformulaciones (SG, SG-HA, SG-PTX y SG-PTX-HA) administradas a través de la vena de la cola. Las terapias fueron suministradas a los animales 3 veces por semana durante 15 días hasta finalizar la etapa de tratamiento. Llegado el momento, se realizó el sacrificio de los animales, conservando pequeñas muestras de los órganos de interés para posteriores experimentos *ex vivo* (**Figura 32**).

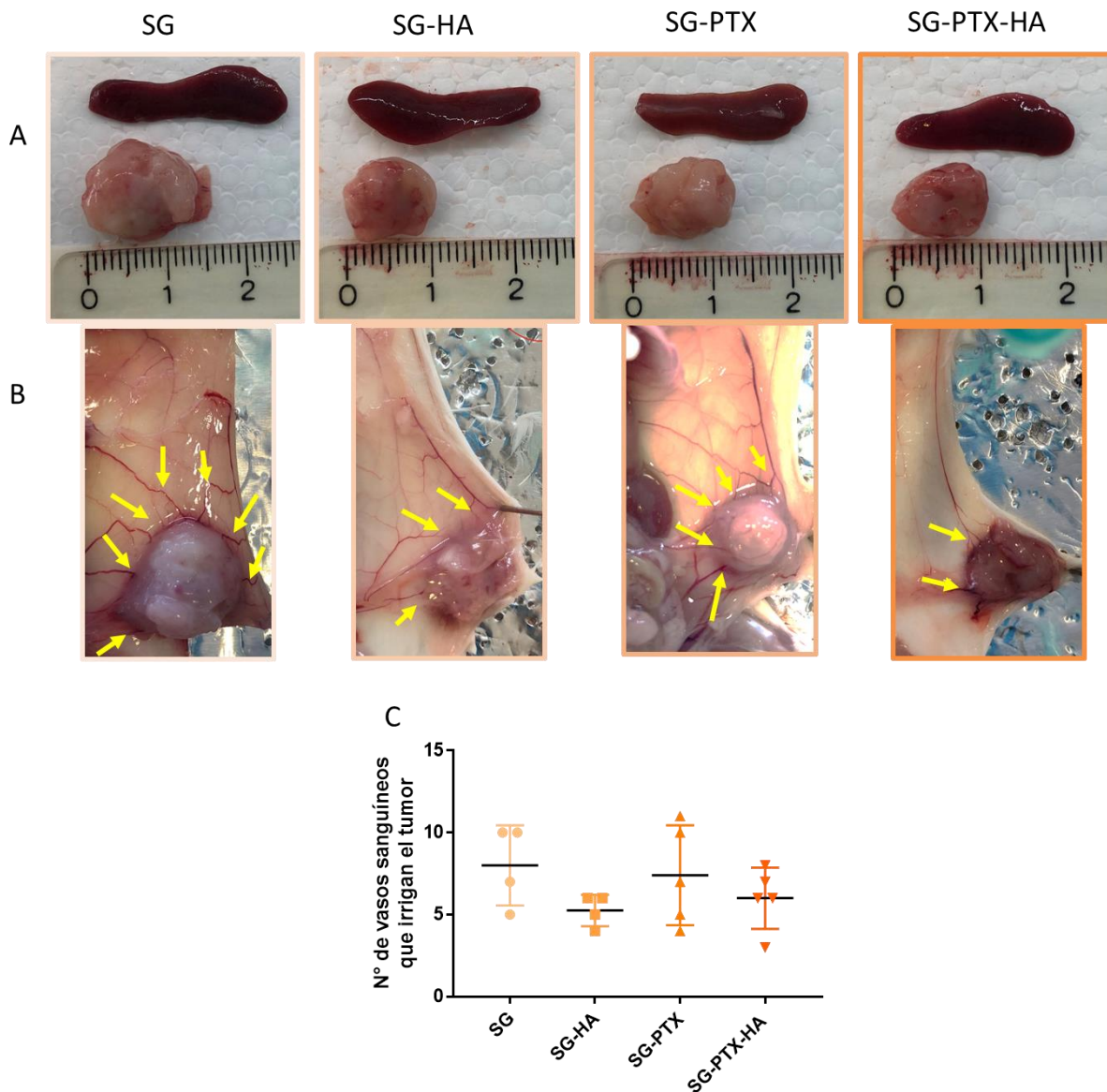


**Figura 32.** Diseño experimental: Evaluación del efecto antitumoral de nanoformulaciones con paclitaxel en combinación con la histamina en un modelo de cáncer de mama murino triple negativo. Vía de administración intravenosa (i.v).

Al momento del sacrificio, se tomaron fotos representativas del bazo y tumor de cada grupo, así como también del tamaño y cantidad de vasos que irrigaban el tumor. A simple vista, se destacan los tumores de gran tamaño presentados en el grupo SG en comparación de los tumores más pequeños percibidos en los grupos SG-HA, SG-PTX y SG-PTX-HA. Al mismo tiempo, y en línea con la esplenomegalia ligada al crecimiento tumoral descrita en bibliografía, se puede observar que los bazos de los grupos que tenían mayor tamaño tumoral también presentaban un aumento en su tamaño. Mientras que, por otro lado, aquellos bazos correspondientes a los tumores más pequeños se perciben de menor tamaño (**Figura 33A**).

Con respecto a los vasos circunscriptos al sitio tumoral, se observa de forma notoria una mayor angiogénesis en los tumores tratados con las micelas SG y SG-PTX. Asimismo, el tamaño y la cantidad de los mismos se ve reducida cuando los animales se trataron con SG-HA y SG-PTX-HA denotando que la histamina reduce la angiogénesis (**Figura 33B-C**).

Figura 16



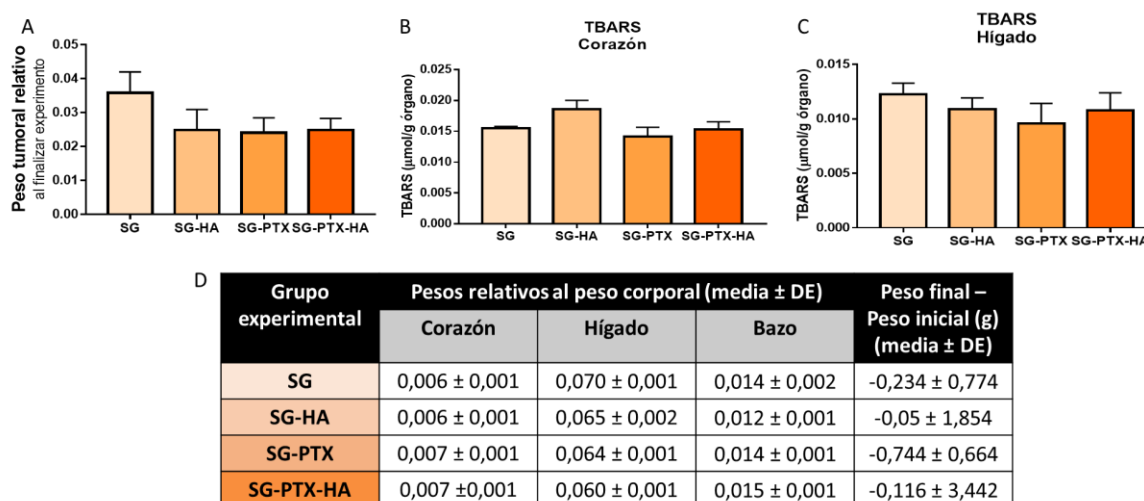
**Figura 33.** Fotos representativas al final del experimento de **A)** los tamaños de los bazo y los tumores y **B)** de los vasos sanguíneos (indicados con una flecha amarilla) que irrigan el sitio tumoral de ratones BALB/c inoculados con células 4T1 y tratados por vía endovenosa con las nanoformulaciones micelares con glucosa cargadas con HA y/o PTX (10 mg/kg). **C)** Se contabilizaron macroscópicamente los vasos neoformados (el gráfico representa la distribución de puntos con la mediana y los rangos intercuartiles).



A pesar de encontrarse diferencias entre los tamaños tumorales de forma visual, las diferencias en los pesos tumorales relativos al peso corporal no resultaron ser significativas (*Figura 34A*).

Continuando con los experimentos *ex vivo*, se realizaron experimentos de TBARS con el fin de evaluar el daño generado por estrés oxidativo en corazón e hígado, órganos usualmente afectados por la administración de PTX. Sin embargo, en ninguno de los órganos mencionados se obtuvieron diferencias significativas en la presencia de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (*Figura 34B-C*).

Por otro lado, en la tabla resumen presentada en la *Figura 34D* se muestran los valores promedio y sus respectivos desvíos estándar de los pesos relativos del corazón, hígado y bazo, al mismo tiempo que se expresa la diferencia entre los pesos finales e iniciales promedio de los animales de cada grupo. Sin embargo, nuevamente, no se observaron diferencias significativas entre los pesos de los distintos órganos de cada grupo.

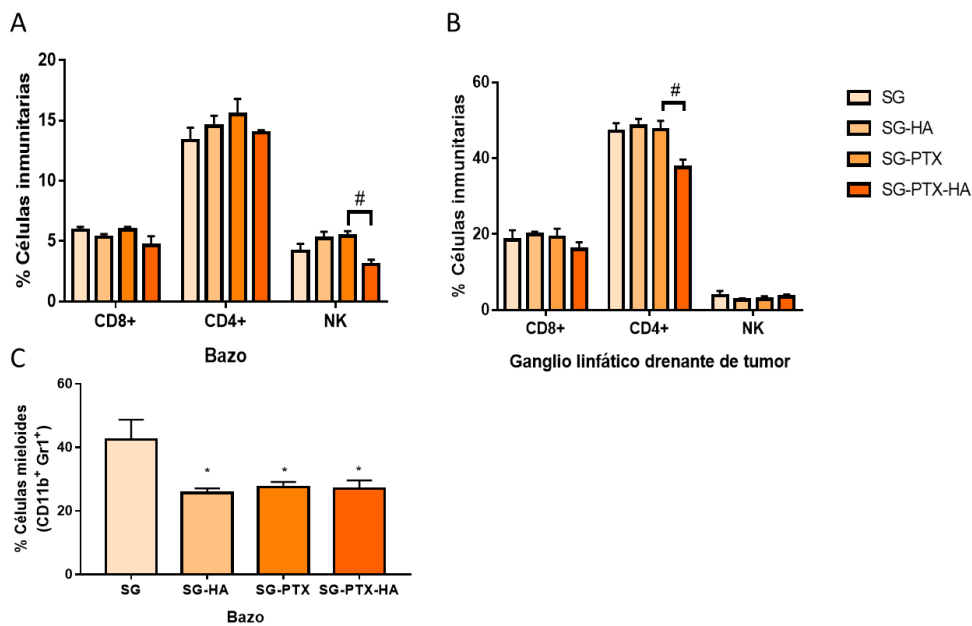


**Figura 34.** A) Evaluación del peso tumoral relativo al peso corporal de animales BALB/c inoculados con células 4T1 tratados por vía intravenosa con las nanoformulaciones micelares con glucosa (SG) (PTX 10 mg/kg) (n=5 para cada grupo). Evaluación del daño por oxidación lipídica mediante la detección de TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) en muestras de B) corazón, C) hígado. Las barras representan la media ± DE. D) La tabla resume los pesos del corazón, hígado y

*bazo relativos al peso corporal obtenidos al finalizar el experimento. Además, se muestra la diferencia entre el peso final de los animales y el peso al inicio del tratamiento.*

Para finalizar con los experimentos *ex vivo*, se llevó a cabo la determinación de las subpoblaciones de las células inmunitarias presentes en el bazo y ganglio linfático drenante de tumor. En lo que respecta al bazo, las células T CD8+ y CD4+, no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos administrados. Sin embargo, las células NK mostraron diferir en el porcentaje presente en dicho órgano disminuyendo en el grupo tratado con SG-PTX-HA con respecto al grupo que recibió la terapia micelar SG-PTX (**Figura 35A**). Por otro lado, el porcentaje de MDSCs en el bazo resultó disminuir con todos los tratamientos respecto del tratamiento control realizado con micelas SG (**Figura 35C**).

En el ganglio drenante de tumor, los linfocitos T CD4+ demostraron encontrarse en menor proporción en el grupo nuevamente tratado con la micela glicosilada combinada respecto del grupo tratado con SG-PTX. Sin embargo, tanto las células T CD8+ y NK no presentaron diferencias significativas entre los grupos analizados (**Figura 35B**).



**Figura 35. Evaluación de subpoblaciones de células inmunitarias.** Suspensiones celulares de A) y C) bazo y B) ganglio linfático drenante de tumor se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos: CD8-PE: marcador de linfocitos T citotóxicos, CD4-FITC: marcador de linfocitos T colaboradores,

*CD49-PE y CD3-FITC: marcadores de células NK, y CD11b-FITC y GR1-PE: marcadores de células mieloides (Test Mann Whitney \*P<0,05 vs. SG, #P<0,05 SG-PTX-HA vs. SG-PTX).*

*Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la histamina potencia el efecto antitumoral del paclitaxel tanto in vitro como in vivo. Al mismo tiempo, estos hallazgos sugieren que la histamina podría proteger tejidos sanos que comúnmente se ven afectados por la quimioterapia. Si bien estos resultados representan un avance hacia el descubrimiento de una terapia que no solo logre optimizar la respuesta quimioterapéutica sino también revertir o, al menos, disminuir los efectos adversos de las terapias sistémicas, aún queda mucho camino por recorrer en la búsqueda de una estrategia terapéutica que beneficie a las pacientes con CMTN.*

## 6. Discusión y Conclusiones

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte y uno de los obstáculos más importantes a superar en la búsqueda de una mayor expectativa de vida tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Bray y col., 2021). La alta inversión en investigación en el área ha logrado mejorar la prevención, el diagnóstico temprano y los tratamientos disponibles para la heterogénea cantidad de neoplasias existentes. Sin embargo, la incidencia y el índice de mortalidad que presenta la patología en todo el mundo continúa en aumento.

Entre las tres primeras causas de muerte relacionadas al cáncer en el mundo se encuentran el cáncer de mama, de pulmón y el colorrectal, siendo la primera de ellas la de mayor incidencia y tasa de mortalidad en el mundo (Sung y col., 2021). En lo que respecta al cáncer de mama, es una de las neoplasias más heterogéneas, con diversos subtipos asociados a una mayor o menor respuesta a tratamientos y con diferentes pronósticos. Como se mencionó en la sección de introducción, los más amplios subtipos de cáncer de mama clasifican a las neoplasias malignas según la presencia o ausencia de receptores hormonales y del HER2. El subtipo que carece de la expresión de cualquiera de estos receptores mencionados es el CMTN. Este subtipo de carcinoma mamario es el de peor pronóstico y representa entre el 10% y el 15% de los casos de cáncer de mama en el mundo (American Cancer Society, 2021). Presenta un alto potencial proliferativo, además de una elevada tendencia a metastatizar otros tejidos. Asimismo, el nivel de respuesta a las terapias, hoy en día aprobadas por la FDA, es bajo por lo que su tratamiento se encuentra circunscripto a las terapias estándar como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Recientemente la inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos para el bloqueo de los puntos de control inmunológicos ha surgido como nueva estrategia para el tratamiento del CMTN. Sin embargo, la aplicabilidad de todos ellos es limitada, no solo por el subtipo de cáncer mamario, sino también por los efectos adversos severos que conllevan por tratarse de terapias sistémicas o inespecíficas, en particular la quimioterapia (Taguchi, 1995; Kayl & Meyers, 2006; Yeh & Biokford, 2009; Vishnu & Roy, 2011). Además, una gran proporción de las pacientes no se benefician, de esta manera, el

estudio de nuevas terapias combinadas capaces de alcanzar un beneficio terapéutico en un porcentaje más amplio de pacientes con CMTN es una necesidad clínica urgente.

El PTX es el tipo de taxano mayormente empleado como tratamiento estándar para varias neoplasias, entre ellas el CMTN, en muchos casos en combinación con otras drogas. Sin embargo, su efecto citotóxico no logra discernir entre el tejido sano y el dañado. Por lo que, su administración se encuentra asociada a números efectos adversos incluyendo cardiopatías, hepatopatías y neuropatías (Samaan y col., 2019).

En este contexto es que surge la histamina como droga potencialmente protectora de las afecciones relacionadas a tratamientos oncológicos y en particular para cáncer de mama. Además, esta amina biogénica ha demostrado ser capaz de regular la proliferación de células tumorales *in vitro* e *in vivo* y, al mismo tiempo, estar que implicada en la regulación de la inmunidad antitumoral (Medina & Rivera, 2010; Nicoud y col., 2019; Sterle y col., 2019; Massari y col., 2020; Sarasola y col., 2021). En abordajes combinados con terapias convencionales, la histamina es capaz de modular selectivamente los efectos producidos tanto por la RI como por el agente quimioterapéutico doxorrubicina, protegiendo tejidos sanos y sensibilizando a las células tumorales humanas de CMTN (Medina y col., 2006, 2007, 2010, 2011; Martinel Lamas y col., 2015b, 2015c, 2015d).

Por otra parte, no solo a fin de revertir efectos adversos sino también reducir la baja solubilidad de agentes quimioterapéuticos como el PTX durante la circulación, aumentando la vida media del mismo y su llegada al sitio blanco, es imprescindible lograr vehiculizar el tratamiento mediante la funcionalización de drogas o el desarrollo de nuevos sistemas de *delivery* de drogas (DDS). En este sentido, varias tecnologías y estrategias como la funcionalización de partículas metálicas, nanopartículas poliméricas, liposomales y micelares han sido desarrolladas a fin de lograr vehiculizar y dirigir los tratamientos a través de la circulación hacia el tumor en específico (Barzaman y col., 2020).

La combinación de quimioterápicos como el PTX, con compuestos capaces de potenciar el efecto antitumoral y al mismo tiempo proteger a los tejidos sanos en novedosos sistemas de

vehiculización, es una de las estrategias más investigadas en el área de la oncología y el objetivo del presente trabajo.

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro laboratorio que demuestran que el tratamiento con histamina potencia el efecto antiproliferativo del agente quimioterapéutico doxorubicina (Martinel Lamas y col., 2015c; 2015d), en este trabajo se evaluó si el tratamiento combinado con histamina podría también mejorar los efectos de la terapia con PTX. Para ello, se desarrollaron formulaciones nanomicelares con el polímero biocompatible Soluplus® (S) y Soluplus® decoradas en su superficie con residuos de glucosa (SG) cargadas con histamina y/o PTX. Para ser considerado un nanomaterial, el tamaño de las nanopartículas debe encontrarse en un rango de 1 a 100 nm. Por otro lado, se ha demostrado que el tamaño por debajo del cual una nanopartícula puede extravasar es de 400 nm siendo óptimo un tamaño menor de 200 nm (Yuan F y col., 1995; Hobbs y col., 1998; Couvreur & Vauthier, 2006; Peer y col., 2007). Acorde a esta información, mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz se determinó el tamaño micelar mediante el diámetro medio (Z-ave) resultando de 80-100 nm con una distribución unimodal.

Los resultados de los experimentos *in vitro* demostraron que la histamina potencia el efecto del quimioterapéutico sobre la viabilidad celular, tanto en estado libre como formando parte de las nanoformulaciones micelares comparado con el PTX administrado como monoterapia. Es importante mencionar que, a su vez, la histamina es capaz de mejorar el efecto antiproliferativo de la quimioterapia basada en el PTX comercial, Genexol. Incluso en los ensayos clonogénicos aún más sensibles, se demostró que la histamina continúa potenciando el efecto antiproliferativo del PTX aún en muy bajas concentraciones. Otros estudios también han demostrado que el uso de nanoformulaciones micelares con PTX han sido más efectivas en inhibir la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7 y MDA-MB-231 y de la línea de cáncer de ovario SKOV-3 que el uso del Genexol o PTX libre (Bernabeu y col., 2016; Moretton y col., 2017).

Los resultados de los ensayos de apoptosis celular muestran que la nanoformulación micelar decorada glucosa y cargada con histamina y PTX aumenta el efecto proapoptótico respecto de las micelas con glucosa cargadas con PTX. En esta línea, Dian y col. reportaron

que la muerte celular en las células tratadas con micelas cargadas con PTX se relaciona con una apoptosis celular mediada por mitocondrias. Encontraron que el mecanismo del efecto inductor de apoptosis estuvo relacionado con la colocación de las nanomicelas con las mitocondrias; la activación de la proteína proapoptótica Bax, el citocromo C y las enzimas apoptóticas caspasa 9 y 3 y la inhibición de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 (Bernabeu y col., 2016; Moretton y col., 2017; Dian y col., 2018). En relación con los resultados obtenidos, el efecto radiosensibilizador de la histamina también se asocia a un aumento de la apoptosis y la senescencia celular inducido por la RI en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 (Martinel Lamas y col., 2015b).

También se han desarrollado nanoformulaciones micelares compuestas por los polímeros Soluplus® y TPGS, cargadas con PTX y decoradas de residuos de glucosa con el fin de aprovechar la sobreexpresión de los transportadores de glucosa (GLUT1) para su absorción en los tumores. Éstas fueron comparadas contra la acción del Genexol demostrándose que, en experimentos *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, el sistema de *delivery* de la droga tuvo mayor actividad antitumoral que el Genexol (Bernabeu y col., 2016, 2017). A su vez, en otros experimentos, se desarrollaron nanopartículas poliméricas de PCL y TPGS cargadas con PTX, y se las comparó con las formulaciones comerciales Taxol® y Abraxane®. Los resultados *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MCF-7 demostraron una citotoxicidad mayor cuando se trataban con las nanopartículas que con las formulaciones comerciales. Mientras que, en experimentos *in vivo*, se elevó la concentración plasmática de la droga y se redujo su eliminación. Al mismo tiempo, las nanoformulaciones demostraron liberar el PTX de forma lenta y continuada (Bernabeu y col., 2014).

En base a estos antecedentes, se desarrollaron experimentos *in vivo*, con el fin de comparar los beneficios otorgados por las micelas en la terapia con PTX y su combinación con HA respecto de las drogas en estado libre. El modelo tumoral desarrollado con las células 4T1 se asemeja al CMTN humano en el sentido de que es capaz de generar metástasis en pulmón y otros tejidos y, comúnmente se lo usa para la evaluación preclínica del efecto de terapias citotóxicas en el desarrollo de tumores y en la modulación del sistema inmune (Dexter y col.,

1978; Pulaski y col., 2001; Tao y col., 2015). Es importante mencionar, que, a partir de este momento, se continuó utilizando únicamente las micelas decoradas con residuos de glucosa para los ensayos, ya que presentaron mejores resultados en experimentos *in vitro* cuando se utilizaba la micela SG-PTX-HA en lugar de su contraparte no glicosilada. Además, a pesar de que ambos grupos de nanoformulaciones (con y sin glucosa) demostraron acumulación en el tumor, el modelo de CMTN desarrollado con células 4T1 utilizado presenta con gran frecuencia metástasis pulmonares, y las micelas glicosiladas demostraron una mayor captación en el tejido pulmonar en comparación a las micelas no glicosiladas. De esta manera, resultó interesante comenzar a dilucidar los efectos *in vivo* de los sistemas glicosilados.

Los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* descriptos en este trabajo, demostraron que los tumores se observan de menor tamaño en los grupos tratados con las micelas SG-HA, SG-PTX y SG-PTX-HA, con respecto a las micelas libres (SG) por vía endovenosa. Sin embargo, al analizar los datos estos no obtuvieron diferencia significativa, probablemente por el número reducido de animales empleados en este primer estudio (n=5 para cada grupo). Por otro lado, pudimos observar que cuando se trataron los animales con las nanoformulaciones micelares a través de la vía endovenosa todos los tumores resultaron ser menores en comparación con aquellos de animales tratados por vía intraperitoneal en las mismas dosis. Hipotetizamos que esto puede deberse a que la administración directamente al torrente sanguíneo favorece una mayor permanencia de las drogas en sangre y se incrementa la capacidad de acumulación en los tumores vía efecto EPR (permeabilidad y retención mejorada) (Golombek y col., 2018; Maeda y col., 2000; Nichols & Bae, 2014). En este sentido, a través de varios ensayos con nuevas tecnologías de *delivery* de drogas en cáncer de mama, se ha logrado aumentar la eficacia clínica de *lapatinib*, un inhibidor selectivo de tirosina quinasas. Dicho resultado, se logró aumentando la solubilidad en medios acuosos; disminuyendo la interacción con proteínas plasmáticas que promueven su acumulación, precipitación y, por ende, limitan su eficiencia terapéutica; y reduciendo la dosis necesaria para lograr una respuesta positiva al tratamiento, y así la toxicidad en otros órganos (Bonde y col., 2018).

En concordancia con los resultados obtenidos de la combinación de histamina y PTX en el modelo de CMTN 4T1, el tratamiento con histamina *in vivo* de tumores desarrollados con



las células de CMTN MDA-MB-231 potencia el efecto antitumoral de la RI al igual que del tratamiento con doxorubicina, reduciendo significativamente el crecimiento tumoral (Martinel Lamas y col. 2015b, 2015d).

El crecimiento de un tumor requiere de vascularización y de esta manera la angiogénesis (formación de nuevos vasos) es primordial para la progresión tumoral y es esencial para el desarrollo de metástasis. Luego del sacrificio se observó y contabilizó los vasos que rodeaban el tumor. Los resultados obtenidos indicaron que los animales tratados con SG-HA y SG-PTX-HA presentaban menor angiogénesis que aquellos tratados con SG y SG-PTX. De esta manera, se pudo reconocer el rol antiangiogénico de la histamina en este modelo de CMTN. En línea con estos resultados, en estudios previos del laboratorio se demostraron efectos similares en los modelos murino y humano de CMTN en los cuales la histamina como tratamiento único (5 mg/kg) redujo la neovascularización tumoral (Martinel Lamas y col., 2013; Nicoud y col., 2020a). También se demostró previamente, en un modelo de melanoma humano, que la administración de histamina disminuyó la angiogénesis (Massari y col., 2017). Otros estudios previos demuestran que la histamina está involucrada en el proceso de angiogénesis (Ohtsu y Watanabe, 2003). Varios trabajos han demostrado que la combinación de IL-2 con histamina logra reducir el tamaño tumoral y la angiogénesis en ciertos tipos de cáncer, como glioma maligno (Johansson y col., 2000). A su vez, el uso de cimetidina, un antagonista del RH2 demostró inhibir la formación de tubos vasculares por células endoteliales *in vitro* (Natori y col., 2005). Cimetidina y un segundo antagonista del RH2, roxatidina, demostraron inhibir el crecimiento de cáncer de colon a través de la supresión de la expresión de VEGF en el tejido tumoral (Tomita y col., 2003). La evidencia sugiere que la histamina puede ejercer efectos pro o antiangiogénicos dependiendo de la concentración, de la presencia de co-factores y/o del microambiente tumoral (Ghosh y col., 2001; Tomita y col., 2003; Francis y col., 2012).

La evasión del sistema inmune, así como la inflamación crónica en el microambiente tumoral, son factores importantes que promueven la progresión tumoral, la angiogénesis y las metástasis (Hannan & Wienberg, 2011). Previamente, se ha reportado que la histamina es capaz de regular el microambiente tumoral inmune, ejerciendo efectos duales. Por un lado, activa y recluta células del sistema inmune al sitio del tumor ejerciendo una actividad antitumoral,

mientras que, por otro lado, lo suprime, dando lugar a la progresión de la patología (Nicoud y col., 2020; Sarasola y col., 2021). Esta naturaleza de los efectos de la histamina en el microambiente tumoral se explica por la dependencia del subtipo de receptor de histamina activado (RH1; RH2; RH3; RH4) en las distintas células que lo componen (Bäumer y col., 2010; Sarasola y col., 2021). En este sentido, el estudio de la modulación de subpoblaciones de células inmunitarias en bazo y ganglios de ratones tratados con las nanoformulaciones mostró que el tratamiento con las micelas SG-PTX-HA modulan diferencialmente, dependiendo la vía de administración, las células T CD4+, CD8+ y NK lo cual está en relación con estudios previos hallados en nuestro laboratorio (Nicoud y col., 2020; 2021). Estos tipos celulares son reconocidos por ser los principales actores de la inmunidad antitumoral mediada por células. Por lo que su regulación y comportamiento diferencial tanto en el bazo como en el ganglio drenante del tumor tras el tratamiento con SG-PTX-HA denota el rol fundamental que cumple la histamina como mediador de la respuesta inmune. Además, se sabe que la presencia y acumulación de las células MDSCs están asociadas a un mayor crecimiento tumoral y peor pronóstico de la patología en general. Los experimentos *in vivo* desarrollados en este trabajo mostraron que el porcentaje de MDSCs en el bazo se ve disminuido en animales tratados con micelas cargadas con PTX y/o histamina en comparación con el grupo tratado con micelas libres. La histamina tiene la capacidad de inducir la maduración de dichas células, reduciendo su acumulación e inhibiendo su rol promotor del crecimiento tumoral (Sarasola y col., 2021). A su vez, experimentos que involucran el tratamiento de cáncer de mama con ranitidina, antagonista del RH2, han demostrado disminuir la población de MDSCs en bazo y médula ósea (Vila-Leahey y col., 2016). Por último, en experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio en modelos de CMTN desarrollados en ratones que no expresan el RH4 (*knockout*, KO) se ha visto una marcada reducción del tamaño y peso tumoral, disminución de las metástasis pulmonares y de los porcentajes de células T CD4+ y Tregs que infiltran el tumor y el ganglio drenante de tumor en comparación de lo observado en los animales de tipo salvaje. De esta manera, se demuestra el papel crítico que cumple la histamina endógena en la modulación de la inmunidad antitumoral del CMTN a través del RH4 (Sterle y col., 2019). En línea con estos resultados, datos obtenidos de los experimentos *in vivo* descriptos en este informe, han evidenciado la reducción de la subpoblación de células T CD4+ en ganglio drenante del tumor

en el grupo tratado de animales con SG-PTX-HA por vía intravenosa, a diferencia de los 3 grupos restantes.

Es importante destacar la selectividad de los efectos producidos por la histamina. Los resultados obtenidos de los ensayos de CTB desarrollados en el presente trabajo, han evidenciado que la viabilidad celular en la línea celular no tumorigénica derivada de la glándula mamaria HBL-100 no disminuye de manera significativa frente al tratamiento combinado de PTX e HA. En esta línea, los ensayos de apoptosis indican que la micela combinada SG-PTX-HA presenta un menor porcentaje de células apoptóticas que el tratamiento micelar que contenía únicamente PTX. Además, los experimentos realizados con el quimioterápico en estado libre confirman su toxicidad mediante un elevado porcentaje de células en proceso de apoptosis respecto del control. Por el contrario, la combinación de histamina y PTX no presenta un porcentaje de células apoptóticas que difiera significativamente del control.

En concordancia con estos resultados, la histamina aumenta la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias MDA-MB-231 y MCF-7 mientras que no modifica los parámetros de radiosensibilidad de las células no tumorigénicas HBL-100, demostrando la selectividad de los efectos observados (Medina y col., 2006; Martinel Lamas y col., 2015b). Además, en modelos animales *in vivo* de rata y ratón se demostró previamente que el tratamiento con histamina protege significativamente dos tejidos altamente radiosensibles, como lo son el intestino delgado y la médula ósea frente a la toxicidad producida por la RI, disminuyendo el daño tisular (Medina y col., 2007; 2010a; 2011b; Carabajal y col., 2012). Además, la histamina preserva las glándulas submandibulares de rata frente al daño estructural y funcional inducido por la RI (Medina y col., 2011b) El efecto radioprotector de la histamina también fue demostrado en el tejido premaligno en un modelo de precáncer bucal, reduciendo la mucositis inducida por la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) (Monti-Hughes y col., 2015). Es importante destacar que la histamina ejerce un efecto quimioprotector cuando se la utiliza de forma combinada con doxorrubicina en modelos *in vivo* de CMTN, revirtiendo los efectos adversos en hígado y corazón (Martinel Lamas y col., 2015c). A su vez, sistemas micelares compuestos, entre otras cosas por histamina, han demostrado disminuir la llegada de doxorrubicina al tejido cardíaco al mismo tiempo que facilitan la liberación de la droga en el

sitio tumoral (Yin y col., 2015; Zhang y col., 2015). Así es que, en este trabajo, se investigó el papel que desempeña la histamina en la protección de los tejidos sanos frente al tratamiento con PTX. Los experimentos realizados reafirman el rol quimioprotector de la histamina al conservar el peso del corazón de los animales tratados tanto con la droga en forma libre como integrada en el sistema micelar cuando es administrada por vía intraperitoneal. Se realizó la evaluación del daño generado por estrés oxidativo en corazón e hígado mediante el ensayo de TBARS en hígado y corazón, sin embargo, en ninguno de los órganos mencionados se obtuvieron diferencias significativas frente a los tratamientos.

*Los resultados presentados en este trabajo son muy alentadores, sin embargo, más estudios son aún necesarios para confirmar la eficacia antitumoral de esta nueva estrategia nanotecnológica basada en la terapia con PTX, representando un enfoque prometedor para el tratamiento del CMTN. Nos encontramos a la espera de datos obtenidos de estudios de enzimas plasmáticas y estudios histopatológicos de los tejidos sanos y tumorales de los experimentos in vivo desarrollados en este informe. Al mismo tiempo, actualmente se encuentran en curso ensayos tendientes a completar la caracterización de las nanoformulaciones, además de experimentos in vitro e in vivo, para confirmar y profundizar los resultados obtenidos.*

***En base a todos los resultados obtenidos y discutidos en este trabajo, podemos postular a la histamina como un agente potenciador de los efectos antitumorales del paclitaxel, entre los que se incluyen la reducción del crecimiento tumoral y de la angiogénesis, y la inducción de la apoptosis. Al mismo tiempo, los resultados sugieren que la histamina podría ejercer un efecto quimioprotector, revirtiendo efectos adversos severos derivados de la quimioterapia y modulando la respuesta inmune.***

***Podemos concluir que las nanoformulaciones micelares presentadas proponen una novedosa estrategia de terapia para el CMTN, aportando mejoras***

*en la eficiencia de la distribución sistémica del quimioterápico y en el efecto antitumoral.*

*Futuros estudios preclínicos y clínicos son necesarios para verificar la eficacia terapéutica de la combinación de paclitaxel con histamina en CMTN. El hecho de que la histamina, como dihidrocloruro, ya ha sido aprobada para ser utilizada en pacientes en numerosos ensayos clínicos como un adyuvante de la inmunoterapia con IL-2 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, reduce la gran brecha entre el trabajo experimental y la posible aplicación clínica.*

## 7. Bibliografía

Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789.

Adams, J.M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.

Alejandro Aranda-Gutierrez & Hector M. Diaz-Perez (2021). *Histology, Mammary Glands*, StatPearls Publishing LLC.

Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J. y col. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* 39, 503–512.

Azim HA, Ghosn M, Oualla K, Kassem L. Personalized treatment in metastatic triplenegative kimbrest cancer: The outlook in 2020. *Breast J.* 2019;00:1–12.

Baeriswyl, V., y Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19, 329–337.

Baluk, P., Hashizume, H., y McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 102–111.

Bangham A, Standish M, Weissmann G y col. (1965) The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology* 13, 253-259

Bao A, Boins B, Klipper R, y col. (2003). A novel liposome radiolabeling method using <sup>99m</sup>Tc-"SNS/S" complexes: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences* 92(9):1893-904.

Barenholz Y. Doxil-the First FDA-approved Nano-Drug: From an Idea to A Product. In: *Handbook of Harnessing Biomaterials in Nanomedicine: Preparation, Toxicity and Applications*; Dan Peer, Ed.; Pan Standford Publishing Pte. Ltd.: Singapore, 2012, Chap.12, pp. 335-398

Bartholeyns, J.; Bouclier, M. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: Antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res.* 1984, 44, 639–645.

Barzaman F, Karami J, Zarei Z, y col. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International immunopharmacology* 84:106535

Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari E., Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535.

Basile L, Pignatello R, Passirani C (2012). Active targeting strategies for anticancer drug nanocarriers. *Current Drug Delivery*, 9, 255-268

Bäumer W1, Rossbach K. Histamine as an immunomodulator. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010;8(7):495-504.

Bergers, G., y Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.

Bernabeu E, Gonzalez L, Cagel M, Gergic EP, Moreton MA, Chiappetta DA. Novel Soluplus(®)-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016 Apr 1;140:403-411.

Bernabeu E, González L, Cagel M, y col. (2016). Novel Soluplus®—TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140 (2016) 403–411

Bernabeu E, Helguera G, Legaspi LJ, y col. (2014). Paclitaxel-loaded PCL–TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113 (2014) 43– 50.

Bertrand N, Wub J, Xu X. y col. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25

Berx, G., y van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129.

Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., y Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.

Bladé J, Sonneveld P, San Miguel JF, y col (2011). Efficacy and safety of pegylated liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for multiple myeloma: effects of adverse prognostic factors on outcome. *Clinical, lymphoma Myeloma & Leukemia* 11, 44-49

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.

Blaya, B., Nicolau-Galmes, F., Jangi, S., Ortega-Martinez, I., Alonso-Tejerina, E., Burgos-Bretones, J., Boyano, M y col. (2010). Histamine and Histamine Receptor Antagonists in Cancer Biology. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 9(3), 146–157.

Blume G, Cevc G (1993). Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1146: 157-164

Bonde, G. V., Yadav, S. K., Chauhan, S., Mittal, P., Ajmal, G., Thokala, S., & Mishra, B. (2018). Lapatinib nano-delivery systems: a promising future for breast cancer treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(5), 495–507.

Branco, A.; Yoshikawa, F.S.Y.; Pietrobon, A.J.; Sato, M.N. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediat. Inflamm.* 2018, 2018, 9524075.

Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. In press.

Bristow, M.R.; Sageman, W.S.; Scott, R.H.; Billingham, M.E.; Bowden, R.E.; Kernoff, R.S.; Snidow, G.H.; Daniels, J.R. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: The cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1980, 2, 487–515.

Burkhardt, D.L., y Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682.



Cabrita, M.A., y Christofori, G. (2008). Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis* 11, 53–62.

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 1978. 14(11):911– 915.

Carabajal E, Massari N, Croci M, y col. Radioprotective potential of histamine on rat small intestine and uterus. *Eur J Histochem* 2012;56(4): e48.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 (Suppl 3), 4–10.

Cavallaro, U., y Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.

Chae, Y. K., Arya, A., Iams, W., Cruz, M. R., Chandra, S., Choi, J., & Giles, F. (2018). Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1).

Chaturvedi VK, Singh A, Singh VK y col. (2019). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy *Current Drug Metabolism*, 2019, 20, 416-429

Chaudhary, L. N., Wilkinson, K. H., & Kong, A. (2018). Triple-Negative Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 141–153.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*, 2010. 32(12):35–48.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., y Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma

Ciccia, A., y Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.

Couvreur, P. & Vauthier, C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23, 1417–1450 (2006).

Cricco, G. P., Davio, C. A., Bergoc, R. M., & Rivera, E. S. (1993). Inhibition of tumor growth induced by histamine: In vivo and in vitro studies. *Agents and Actions*, 38(3-4), C175–C177.

Cukierman E y Khan DR (2010). The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy *Biochemical Pharmacology* 80 762–770

Damascelli B, Gantù G, Mattavelli F y col. (2001). Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007). Clinical trial. *Cancer* 92, 2592–2602

Darby S, McGale P, Correa C, y col.; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9804):1707-1716

Davio, C. A., Cricco, G. P., Bergoc, R. M., & Rivera, E. S. (1995). H1 and H2 histamine receptors in n-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 91–96.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., y Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20.

DeNardo, D.G., Andreu, P., y Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.

Derakhshani, A., Vahidian, F., Alihasanzadeh, M., Mokhtarzadeh, A., Nezhad, P. L., & Baradaran, B. (2019). Mast Cells: A Double-Edged Sword in Cancer. *Immunology Letters*

Desai N. (2016) Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxane®). In: Otagiri M., Chuang V. (eds) *Albumin in Medicine*. Springer, Singapore.

Deshpande, A., Sicinski, P., y Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909–2915.

Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, y col. (1978) Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res* 38, 3174–3181.

Dian LH, Ying-Jie Hu YJ, Lin JY y col. (2018). Fabrication of paclitaxel hybrid nanomicelles to treat resistant breast cancer via oral administration. *International Journal of Nanomedicine* 2;13:719-731.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659.

Emens, L. A. (2017). Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*, 24(3), 511–520.

Evan, G., y Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317–1322

Falus, A.; Hegyesi, H.; Lázár-Molnár, E.; Pós, Z.; László, V.; Darvas, Z. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: Histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol.* 2001, 22, 648–652.

Fernández-Nogueira, P., Noguera-Castells, A., Fuster, G., Recalde-Percaz, L., Moragas, N., López-Plana, A., Mancino, M. (2018). Histamine receptor 1 inhibition enhances antitumor therapeutic responses through extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation in breast cancer. *Cancer Letters*, 424, 70–83.

Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789–791.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458

Fisher B, Anderson S, Bryant J, y col. (2002) Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16): 1233-1241.

Francis H, DeMorrow S, Venter J, y col. Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. *Gut.* 2012;61(5):753-764.

Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., y Wood, R.D. (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst.)* 5, 986–996

Fujimoto, M., & Kimata, H. (1994). Histamine Inhibits Immunoglobulin Production via Histamine H<sub>2</sub> Receptors without Affecting Cell Growth in Human B Cells. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 73(1), 96–102.

Gaffney EV (1982). A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell and Tissue Research* 1982;227(3):563-8.

Galarza, T. E., Mohamad, N. A., Táquez Delgado, M. A., Vedoya, G. M., Crescenti, E. J., Bergoc, R. M., Cricco, G. P. (2016). Histamine prevents radiation-induced mesenchymal changes in breast cancer cells. *Pharmacological Research*, 111, 731–739.

Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 28(6), 690–714.

García-Martín, E., Ayuso, P., Martínez, C., Blanca, M., & Agúndez, J. A. (2009). Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 10(5), 867–883.

Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. *Br J Pharmacol* 2001;134(7):1419-1428.

Golombek SK, May JN, Theek B y col. (2018). Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced drug delivery reviews*. 130:17-38

Gómez-Fabre, P. M., de Pedro, E., Medina, M. A., de Castro, I. N., & Márquez, J. (1997). Polyamine contents of human breast cancer cells treated with the cytotoxic agents chlorpheniramine and dehydrodidemnin B. *Cancer Letters*, 113(1-2), 141–144.

Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, y col. (1994). Biodegradable long circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263: 1600-1603

Grimm, M., Krimmel, M., Alexander, D., Munz, A., Kluba, S., Keutel, C., Hoefert, S. (2012). Prognostic value of histamine H<sub>1</sub> receptor expression in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 17(3), 949–955.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., y Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.

Gullotti E., Yeo Y. (2009) Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Molecular Pharmacology*, 6, 1041–1051

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Harper, J.W., y Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: Ten years after. *Mol. Cell* 28, 739–745.

Hausmann, J., Corradini, S., Nestle-Kraemling, C., Bölke, E., Njanang, F. J. D., Tamaskovics, B., Orth, K., Ruckhaeberle, E., Fehm, T., Mohrmann, S., Simiantonakis, I., Budach, W., Matuschek, C. (2020). Recent advances in radiotherapy of breast cancer. *Radiation Oncology*, 15(1).

He G-H, Lin J-J, Cai W-K, Xu W-M, Yu Z-P, y col. (2014) Associations of Polymorphisms in Histidine Decarboxylase, Histamine N-Methyltransferase and Histamine Receptor H3 Genes with Breast Cancer. *PLoS ONE* 9(5): e97728

He, G.-H., Lu, J., Shi, P.-P., Xia, W., Yin, S.-J., Jin, T.-B., Xu, G.-L. (2013). Polymorphisms of human histamine receptor H4 gene are associated with breast cancer in Chinese Han population. *Gene*, 519(2), 260–265.

He, M. Y., Rancoule, C., Rehailia-Blanchard, A., Espenel, S., Trone, J.-C., Bernichon, E., Guillaume, E., Vallard, A., Magné, N. (2018). Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 131, 96–101.

Hellstrand, K. (2002). Histamine in cancer immunotherapy: A preclinical background. *Seminars in Oncology*, 29(3), 35–40.

Hobbs, S. K. y col. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 4607–4612 (1998)

Hofstra, C. L. (2003). Histamine H4 Receptor Mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 1212–1221.

Hsu, P.P., y Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707.

Ibrahim, N.K.; Samuels, B.; Page, R.; Doval, D.; Patel, K.M.; Rao, S.C.; Nair, M.K.; Bhar, P.; Desai, N.; Hortobagyi, G.N. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 6019–6026.

Jackson, S.P., y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.

Jakhar, R., Paul, S., Bhardwaj, M., & Kang, S. C. (2016). Astemizole–Histamine induces Beclin-1-independent autophagy by targeting p53-dependent crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cancer Letters*, 372(1), 89–100.

Johansson, M., Henriksson, R., Bergenheim, A. T., & Koskinen, L.-O. D. (2000). Interleukin-2 and histamine in combination inhibit tumour growth and angiogenesis in malignant glioma. *British Journal of Cancer*, 83(6), 826–832.

Jones, R.G., y Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23, 537–548

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2006–2007). Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26, 75–85.

Kastan, M.B. (2008). DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol. Cancer Res.* 6, 517–524.

Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, y col. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the huriveraman disease. *BMC Cancer.* 2012 Mar 27; 12():120.

Kayl, A. E., & Meyers, C. A. (2006). Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(1), 24–28.

Kazerounian, S., Yee, K.O., y Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 700–712.

Kim TY, Kim DW, Chung JY, y col. (2004). Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 10:3708–3716

Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Navin, N. E. y col. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell*, 173(4), 879–893.e13.

Kim, R., Emi, M., y Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1–14.

Krzynzaniak JF, Alvarez Nunez FA, Raymond DM, Yalkowsky SH. 1997. Lysis of human red blood cells 4: Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *J Pharm Sci* 86:1215–1217.

Kundranda ML y Niu J (2015). Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future direction. *Drug design, development and treatment* 9:3767-3777.

Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, y col. (2016) Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE* 11(6): e0157368

Lensen D, Gelderblom DE, Vriezema DM y col. (2011). Biodegradable polymeric microcapsules for selective ultrasound-triggered drug release, *Soft Matter* 7 5417–5422

Leonhard V. (2013) Caracterización de la interacción de moléculas hidrofóbicas con drogas oncológicas como una estrategia de vehiculización de fármacos en medios acuosos. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Lieberman, P. (2011). The basics of histamine biology. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 106(2), S2–S5.

Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. (2003). PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat*, 2003. 79(1):63-74.

Lowe, S.W., Cepero, E., y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307–315.

Lyons, T. G. (2019). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(11).

Ma, P.; Mumper, R.J. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2013, 4, 1000164.

Mac Gabhann, F., y Popel, A.S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 15, 715–738.

Maeda H, Wu J, Sawa t, y col. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release* 65(1-2):271-84.

Mahmoud, S. M. A., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H. S., Green, A. R. (2011). Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1949–1955.

Martin, R. K., Saleem, S. J., Folgosa, L., Zellner, H. B., Damle, S. R., Nguyen, G.-K. T., Conrad, D. H. (2014). Mast cell histamine promotes the immunoregulatory activity of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(1), 151–159.

Martinel Lamas DJ (2015a). Histamine H4 receptor insights into a potential therapeutic target in breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 7(1), 1–9. doi:10.2741/s420

Martinel Lamas DJ, Croci M, Carabajal E, y col. Therapeutic potential of histamine H4 receptor agonists in triple-negative human breast cancer experimental model. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 188–199.

Martinel Lamas, D. J., Cortina, J. E., Ventura, C., Sterle, H. A., Valli, E., Balestrasse, K. B., Medina, V. A. (2015b). Enhancement of ionizing radiation response by histamine in vitro and in vivo in human breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 16(1), 137–148.

Martinel Lamas, D. J., Nicoud, M. B., Sterle, H. A., Cremaschi, G. A., & Medina, V. A. (2015c). Histamine: a potential cytoprotective agent to improve cancer therapy? *Cell Death and Disease*, 6(12), e2029.

Martinel Lamas, Dj., Nicoud, M., Sterle, H., Carabajal, E., Tesan, F., Perazzo, J., Medina, V. (2015d). Selective cytoprotective effect of histamine on doxorubicin-induced hepatic and cardiac toxicity in animal models. *Cell Death Discovery*, 1(1).



Maslinski, C., Kierska, D., Fogel, W. ., Kinnunen, A., & Panula, P. (1997). Histamine in Mammary Gland: Pregnancy and Lactation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 116(1), 57–64.

Massari NA, Medina VA, Cricco, GP, y col. (2013). Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. *J. Dermatol. Sci.* 2013; 72, 252–262.

Massari, N. A., Nicoud, M. B., & Medina, V. A. (2018). Histamine Receptors and Cancer Pharmacology: An Update. *British Journal of Pharmacology*.

Medina V, Cricco G, Nuñez M, y col. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5:1462-1471.

Medina, V. A., & Rivera, E. S. (2010a). Histamine receptors and cancer pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 161(4), 755–767.

Medina, V. A., Croci, M., Carabajal, E., Bergoc, R. M., & Rivera, E. S. (2010b). Histamine protects bone marrow against cellular damage induced by ionising radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 86(4), 283–290.

Medina, V. A., Croci, M., Mohamad, N. A., Massari, N., Garbarino, G., Cricco, G. P., Rivera, E. S. (2007). Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine.

Medina, V. A., Prestifilippo, J. P., Croci, M., Carabajal, E., Bergoc, R. M., Elverdin, J. C., & Rivera, E. S. (2011b). Histamine prevents functional and morphological alterations of submandibular glands induced by ionising radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 87(3), 284–292.

Medina, V.A.; Massari, N.A.; Cricco, G.P.; Martín, G.A.; Bergoc, R.M.; Rivera, E.S. Involvement of hydrogen peroxide in histamine-induced modulation of WM35 human malignant melanoma cell proliferation. *Free. Radic. Biol. Med.* 2009, 46, 1510–1515.

Medina, Vanina. (2011a). Role of histamine H4 receptor in breast cancer cell proliferation. *Frontiers in Bioscience*, E3(3), 1042–1060.

Mediratta, K., El-Sahli, S., D’Costa, V., & Wang, L. (2020). Current Progresses and Challenges of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 12(12), 3529.

Misra R, Acharya S, Sahoo S.K y col. (2010). Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* 15:842-50

Moghini SM, Patel HM (1993). *Liposome Technology*. G. Gregoriadis, 2nd Ed. (3), CRC Press, Boca Ratón, Florida

Montané X, Bajek A, Roszkowski K, y col. (2020). Encapsulation for Cancer Therapy. *Molecules*, 25(7):1605

Montemurro, F., Nuzzolese, I., & Ponzzone, R. (2020). Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 1–12.

Monti Hughes A, Pozzi E, Thorp SI, Curotto P, Medina VA, Martinel Lamas DJ, Rivera ES, Garabalino MA, Farías RO, Gonzalez SJ, Heber EM, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Histamine reduces boron neutron capture therapy-induced mucositis in an oral precancer model. *Oral Dis.* 2015 Sep;21(6):770-7.

Moreira JN, Almeida LM, Geraldes CF y col. (1996). Evaluation of in vitro stability of large unilamellar liposomes coated with modified polysaccharide (O-palmitoylpullulan). *J Materials Sci Materials Medicine*, 7: 301-306

Moretton M, Bernabeu E, Grotz E y col. (2017). A glucose-targeted mixed micellar formulation outperforms Genexol in breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 114 (2017) 305–316

Moretton MA, Glisoni MA, Chiappetta DA, Sosnik A, Molecular implications in the nanoencapsulation of the anti-tuberculosis drug rifampicin within flower-like polymeric micelles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79 (2010) 467–479.

Mosesson, Y., Mills, G.B., y Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850.

Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., y Johansson, C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* 107, 57–117.

Muggia FM (1997). Clinical efficacy and prospects for use of pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of ovarian and breast cancers. *Drugs*, 54, 22-29

Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., y Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 36, 321–331.

Natori, T., Sata, M., Nagai, R., & Makuuchi, M. (2005). Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(1-2), 56–60.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., y Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 220–228.

Nichols JW y Bae YH. EPR: Evidence and fallacy (2014). *Journal of controlled release* 190:451-64

Nicoud M, Sterle H, Massari N, y col. (2020) Study of the antitumour effects and the modulation of immune response by histamine in breast cancer. *British Journal of Cancer* 70(1):233-244

Nicoud MB, Formoso K y Medina VA (2019) Pathophysiological Role of Histamine H4 Receptor in Cancer: Therapeutic Implications. *Front. Pharmacol.* 10:556. f

Nicoud, Melisa Beatriz; Táquez Delgado, Mónica Alejandra; Sarasola, María de la Paz; Vidal, Maria Agustina; Speisky, Daniela Lorena, y col.; Impact of histamine H4 receptor deficiency on the modulation of T cells in a murine breast cancer model; Springer; *Cancer Immunology Immunotherapy*; 70; 1; 7-2020; 233-244

Okeke, E.B.; Uzonna, J.E. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front. Immunol.* 2019, 10, 680.

Oldford, S. A., & Marshall, J. S. (2015). Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Molecular Immunology*, 63(1), 113–124.

Ostrand-Rosenberg, S., y Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 182, 4499–4506.

Palleschi M, Maltoni R, Sarti S, Melegari E, Bravaccini S, Rocca A. Immunotherapy: The end of the "dark age" for metastatic triple-negative breast cancer? *Breast J.* 2019;00:1–4.

Parsons, M. E., & Ganellin, C. R. (2006). Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S127–S135.

Peer D, Karp JM, Hong S, y col. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2(12):751-60

Pereira MA, Mosqueira VCF, Carmo VAS, y col. (2009). Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with (99m)Tc-HMPAO. *Nuclear Medicine Commun.* 30(9):749-55

Perz, J.B.; Ho, A.D. Histamine dihydrochloride for the treatment of acute myeloid leukemia, malignant melanoma and renal cell carcinoma. *Future Oncol.* 2008, 4, 169–177.

Pós Z, Hegyesi H, Rivera E (2004). Histamine and cell proliferation. In: Falus A (ed). *Histamine Biology and Medical Aspects.* Spring Med Publishing: Hungary, pp. 199–217.

Pós Z, Sáfrány G, Müller K, Tóth S, Falus A, Hegyesi H (2005). Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res* 65: 4458–4466.

Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S.-F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*, 13(3), 325–338.

Pulaski BA y Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology.* 2001; Chapter 20:Unit 20.2.

Qian, B.Z., y Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.

Qiu L, Qiao M, Chen Q, y col. (2014). Cheng, L. Cheng, H. Hu, X. Zhao, D. Chen, Enhanced effect of pH-sensitive mixed copolymer micelles for overcoming multidrug resistance of doxorubicin, *Biomaterials* 35 (2014) 9877–9887,

Ravelli, A., Roviello, G., Cretella, D., Cavazzoni, A., Biondi, A., Cappelletti, M. R., Generali, D. (2017). Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumor Biology*, 39(4), 101042831769502.

Reynolds, J.L.; Akhter, J.; Adams, W.J.; Morris, D.L. Histamine content in colorectal cancer. Are there sufficient levels of histamine to affect lymphocyte function? *Eur. J. Surg. Oncol.* 1997, 23, 224–227.

Reynolds, J.L.; Akhter, J.; Morris, D.L. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 1996, 6, 95–99.

Rivera, E.S.; Cricco, G.P.; Engel, N.I.; Fitzsimons, C.P.; Martín, G.A.; Bergoc, R.M. Histamine as an autocrine growth factor: An unusual role for a widespread mediator. *Semin. Cancer Biol.* 2000, 10, 15–23.

Rogers D, Vila-Leahey A, Pessôa AC, Oldford S, Marignani PA y Marshall JS (2018) Ranitidine Inhibition of Breast Tumor Growth Is B Cell Dependent and Associated With an Enhanced Antitumor Antibody Response. *Front. Immunol.* 9:1894

Rowinsky, E.K.; McGuire, W.P.; Guarnieri, T.; Fisherman, J.S.; Christian, M.C.; Donehower, R.C. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1991, 9, 1704–1712.

S. Tanaka, M. Sakaguchi, H. Yoneyama, Y. Usami, S. Harusawa, Histamine H3 receptor antagonist OUP-186 attenuates the proliferation of cultured human breast cancer cell lines, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016)

Schneider, E., Rolli-Derkinderen, M., Arock, M., & Dy, M. (2002). Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends in Immunology*, 23(5), 255–263.

Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56.

Shah, C., Bauer-Nilsen, K., McNulty, R. H., & Vicini, F. (2020). Novel radiation therapy approaches for breast cancer treatment. *Seminars in Oncology*.

Sharma A y Straubinger RM (1994) Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes, *Pharmaceutical research* 11 889–896.

Shay, J.W., y Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.

Sherr, C.J., y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Sieja K, Stanosz S, Von Mach-Szczypinski J, y col. Concentration of histamine in serum and tissues of the primary ductal breast cancer in women. *Breast*. 2005; 14:236-241.

Sigal, A., y Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 60, 6788–6793.

Singla AK, Garg A, Aggarwal D (2002). Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm*, 235 (1-2) 179-92.

Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajduch M, Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer* (2018)

Sterle, H. A., Nicoud, M. B., Massari, N. A., Táquez Delgado, M. A., Herrero Ducloux, M. V., Cremaschi, G. A., & Medina, V. A. (2018). Immunomodulatory role of histamine H4 receptor in breast cancer. *British Journal of Cancer*.

Straubinger RM, Sharma A, Murray M y col. (1993) E. Mayhew, Novel taxol formulation: taxol-containing liposomes, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*. 15 (1993) 69–78

Suffredini, G., East, J. E., & Levy, L. M. (2013). New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, 35(7), 1246–1253.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.

Taguchi T. [Side effects of cancer chemotherapy and steps to deal with them]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1995 Dec;22(14):2017-28. Japanese. PMID: 8607610.

Talmadge, J.E., y Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 70, 5649–5669.

Tao H, Lu L, Xia Y, y col. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *Eur. J. Immunol*. 2015;45:999-1009.

Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., y Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol*. 84, 988–993.

Tesan F, Nicoud M, Nuñez M, y col. (2019). 99mTc radiolabeled TPGS nanomicelles outperform 99mTc-sestamibi as breast cancer imaging agent. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2019;2019:4087895

Tomita, K., Izumi, K., & Okabe, S. (2003). Roxatidine- and Cimetidine-Induced Angiogenesis Inhibition Suppresses Growth of Colon Cancer Implants in Syngeneic Mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 93(3), 321–330.

Torchilin VP (2007). Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 9(2):E128-47

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2019). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances In Anatomic Pathology*, 1.

Underwood C, Eps AWV, Ross MW, y col. (2012). Intravenous technetium-99m labelled PEG-liposomes in horses: a safety and biodistribution study. *Equine veterinary journal* 44(2):196-202

Untech M, Jackisch C, Schneeweiss A y col. (2019). NAB-Paclitaxel Improves Disease-Free Survival in Early Breast Cancer: GBG 69–GeparSepto. *Journal of clinical oncology* 37(25):2226-2234

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., y Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Vanina Medina, Máximo Croci, Ernesto Crescenti, Nora Mohamad, Francisca Sanchez-Jiménez, Noelia Massari, Mariel Nuñez, Graciela Cricco, Gabriela Martin, Rosa Bergoc & Elena S. Rivera (2008) The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment., *Cancer Biology & Therapy*, 7:1, 28-35,

Vila-Leahey, A., Oldford, S. A., Marignani, P. A., Wang, J., Haidl, I. D., & Marshall, J. S. (2016). Ranitidine modifies myeloid cell populations and inhibits breast tumor development and spread in mice. *OncoImmunology*, 5(7), e1151591.

Vishnu, P.; Roy, V. Safety and efficacy of Nab-Paclitaxel in the treatment of patients with breast cancer. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 2011, 5, 53–65.

von Mach-Szczypinski, J.; Stanosz, S.; Sieja, K.; Stanosz, M. Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer. *Metabolism* 2009, 58, 867–870.

Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465(1), 1–14.

Wagner W, Ichikawa A, Tanaka S, y col. Mouse mammary epithelial histamine system. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54:211-23.

Waks, A. G., y Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 316.

Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405–413.

Warburg, O. (1956a). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.

Warburg, O. (1956b). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.

Warburg, O.H. (1930). *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable).

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), 2677–2681.

Wertz, I.E., y Dixit, V.M. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ.* 17, 14–24.

Wu, J.; Hicks, C. Breast Cancer Type Classification Using Machine Learning. *J. Pers. Med.* 2021, 11, 61.

Xiaobin Z, Chengxiao L, Jie Y, Haoqiang W, Guoqing W, Yingpeng L, Chen N, Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications, *Pharmacological Research* (2020)

Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15(2): 212-216.

Yamamoto, Y.; Kawano, I. Iwase Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: Efficacy, safety, and approval. *Onco Targets Ther.* 2011, 4, 123–136.



Yeh, E. T. H., & Bickford, C. L. (2009). Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(24), 2231–2247.

Yeo, S. K., & Guan, J.-L. (2017). Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends in Cancer*, 3(11), 753–760.

Yin, Q., Shen, J., Yu, H., Huang, Y., Zhang, Z., & Li, Y. (2015). Bioreducible Micelles with Endosomal Buffering and Multidrug Resistance-Reversing Function Enhance Anti-Tumor Efficacy of Doxorubicin. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(10), 1764–1775.

Yu, D., Zhao, J., Wang, Y., Hu, J., Zhao, Q., Li, J., & Zhu, J. (2019). Upregulated histamine receptor H3 promotes tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 41, 3347-3354.

Yuan, F. et al. Vascular-permeability in a human tumor xenograft — Molecular-size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55, 3752–3756 (1995).

Yusuf S. Khan, Hussain Sajjad (2021), *Anatomy, Thorax, Mammary Gland*. StatPearls Publishing LLC.

Zhang, Y., Lundberg, P., Diether, M., Porsch, C., Janson, C., Lynd, N. A., Nyström, A. M. (2015). Histamine-functionalized copolymer micelles as a drug delivery system in 2D and 3D models of breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(12), 2472–2486.

Zhao, J., Hou, Y., Yin, C., Hu, J., Gao, T., Huang, X., Li, J. (2019). Upregulation of histamine receptor H1 promotes tumor progression and contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*.