

Tesis de Posgrado

Estudio de la angiogénesis en tumores experimentales

Miguez, Marta María

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Miguez, Marta María. (1988). Estudio de la angiogénesis en tumores experimentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2182_Miguez.pdf

Cita tipo Chicago:

Miguez, Marta María. "Estudio de la angiogénesis en tumores experimentales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2182_Miguez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

ESTUDIO DE LA ANGIOGENESIS EN TUMORES EXPERIMENTALES

AUTORA

MARTA MARIA MIGUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

LUGAR DE TRABAJO: DTO. DE INVESTIGACION
INSTITUTO DE ONCOLOGIA "ANGEL H. ROFFO"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1988

2 182
Ej: 2

A tí, Carlos, por brindarme amor y apoyo incondicional.

A Manuel, porque es nuestro futuro.

Agradezco

A la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar en un clima de libertad.

A la Dra. Lilia Davel, porque con su experiencia, colaboración y apoyo hizo posible la realización de este trabajo.

A las Dras. Madela Jasnís, Silvia Kohan, Ana María Eiján y Sara Oisgold-Dagá por colaborar en diversos trabajos que conforman esta Tesis.

A la Sra. Catalina Sasko, por enseñarme el manejo de cultivo de tejidos.

Al Dr. Lucas Colombo, por compartir con generosidad su modelo experimental.

Al personal de apoyo, porque con su esfuerzo posibilita la realización de cada proyecto.

A todos mis compañeros del Departamento de Investigación, por sus sugerencias y su estímulo a lo largo de estos años.

Abreviaturas

PM	: Peso Molecular
Da	: Dalton
kDa	: 10^3 Dalton
SFB	: suero fetal bovino
cDNA	: ADN complementario
s.c.	: subcutánea
i.p.	: intraperitoneal
PBS	: solución buffer fosfato
rpm	: revoluciones por minuto
g	: valor de aceleración de la gravedad
pI	: punto isoeléctrico
LIA	: angiogénesis inducida por linfocitos
SLIA	: angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos
GAGs	: glicosaminoglicanos
VEC	: células de endotelio vascular
MCA	: membrana corioalantoidea
GF	: factor de crecimiento
FGF	: factor de crecimiento fibroblástico
FGFa	: factor de crecimiento fibroblástico ácido
FGFb	: factor de crecimiento fibroblástico básico
EDFG	: factor de crecimiento aislado de tejidos del ojo
ECGF	: factor de crecimiento de células endoteliales
CDGF	: factor de crecimiento aislado de cartílago
CHDGF	: factor de crecimiento aislado de condrosarcoma

EGF : factor de crecimiento epidérmico
TGF : factor de crecimiento transformante
PDGF : factor de crecimiento aislado de plaquetas
TNF : factor necrótico tumoral
TAF : factor angiogénico tumoral
ESAF : factor estimulante de células endoteliales
NGF : factor de crecimiento nervioso
IL : interleuquina
IFN : interferón
PA : activador de plasminógeno
PG : prostaglandina
MEC : matriz extracelular
BDP : banda densa periférica
SCS : sobrenadante de células esplénicas

En este trabajo, los términos tumor y neoplasia fueron utilizados como sinónimos de malignidad en el sentido de una formación celular invasiva y metastatizante. El término transformación se empleó para designar el proceso por el cual las células han adquirido todas las características asociadas con la malignidad.

<u>INDICE</u>	Pág.
<u>CAPITULO I: ANGIOGENESIS</u>	1
1. Introducción	4
2. Objetivos y desarrollo del trabajo de Tesis	6
3. Sistema microvascular	9
4. El proceso angiogénico	24
5. Bibliografía	32
<u>CAPITULO II: MODULADORES DE LA ANGIOGENESIS</u>	43
1. Inductores de la actividad angiogénica	46
2. Inhibidores de la angiogénesis	69
3. Bibliografía	73
<u>CAPITULO III: ANGIOGENESIS NORMAL</u>	91
1. Angiogénesis en tejidos normales	93
2. Angiogénesis en tejidos en regeneración	94
3. Bibliografía	97
<u>CAPITULO IV : ANGIOGENESIS TUMORAL</u>	99
1. Fases avascular y vascular del crecimiento tumoral.	101
2. El sistema vascular de los tumores.	103
3. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis tumoral: actividad angiogénica en tumores primarios y sus metastásis.	107
4. Bibliografía	124

<u>CAPITULO V: ANGIOGENESIS INDUCIDA POR COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE</u>	126
1. Angiogénesis inducida por macrófagos	129
2. Angiogénesis inducida por mastocitos	130
3. Angiogénesis inducida por linfocitos	133
4. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis inducida por linfocitos.	135
5. Bibliografía	166
<u>CAPITULO VI : DISCUSION</u>	169
1. El proceso angiogénico	171
2. Aportes del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis.	178
3. Modelo propuesto para explicar las interacciones entre los distintos moduladores de la respuesta angiogénica.	184
4. Bibliografía.	185

CAPITULO I

ANGIOGENESIS

<u>INDICE</u>	Pág.
1. Introducción.	4
1.1. Perspectiva histórica.	4
1.2. Procesos normales y patológicos que involucran angiogénesis.	4
2. Objetivos y desarrollo del trabajo de Tesis.	6
2.1. Angiogénesis tumoral.	6
2.2. Angiogénesis inducida por linfocitos.	6
2.3. Actividad angiogénica en sobrenadantes de cultivo de linfocitos.	7
2.4. Mecanismo de SLIA.	8
3. Sistema microvascular.	9
3.1. Origen de los vasos sanguíneos.	9
3.2. La estructura de la red capilar.	9
3.2.1. Arteriolas.	10
3.2.2. Capilares.	10
3.2.2.1. Estructura de la pared capilar.	11
3.2.2.2. Histofisiología del intercambio a través de la pared capilar.	12
3.2.3. Sinusoides.	14
3.2.4. Vénulas.	15
3.2.5. Vasos colaterales.	15

3.3. Aspectos estructurales y funcionales del endotelio	16
3.3.1. Ultraestructura de la superficie celular.	16
3.3.2. Citoesqueleto de la célula endotelial.	17
3.3.3. Membrana basal.	18
3.3.4. Actividades metabólicas.	20
3.3.5. Actividad sintética.	21
3.3.6. Antígenos de superficie de las células endoteliales.	21
3.3.7. Marcadores de células endoteliales.	22
4. El proceso angiogénico.	24
4.1. Desarrollo secuencial de los capilares frente a un estímulo angiogénico.	24
4.2. Sistemas empleados para estudiar la angiogénesis.	
4.2.1. Cámaras transparentes.	25
4.2.2. Membrana coriolantoidea de embrión de pollo	26
4.2.3. Implantación de muestras en córneas.	28
4.2.4. Polímeros de liberación lenta.	29
4.2.5. Ensayos con células endoteliales.	30
4.2.6. Ensayos para la detección de angiogénesis inducida por linfocitos.	31
5. Bibliografía.	32

1. INTRODUCCION

1.1 Perspectiva histórica

Durante más de cien años los patólogos observaron que los tumores estaban irrigados por una rica red de vasos sanguíneos. Las primeras descripciones de la red vascular asociada con los tejidos tumorales fueron realizadas por Virchow en 1881. En 1907, Goldman sugirió: "en los tumores, el ímpetu que dá lugar a la proliferación de los vasos sanguíneos emana desde la célula invasora" (1).

Años más tarde Algire y Chalkley observaron que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un tumor transplantado se produce desde los tejidos del huésped que rodean al implanto y denominaron a este proceso "angiogénesis tumoral" (2).

Trabajos posteriores demostraron que la angiogénesis tumoral está mediada por factores solubles liberados desde las células neoplásicas (3-6).

1.2 Procesos normales y patológicos que involucran angiogénesis

Los procesos angiogénicos se producen desde los primeros momentos de la vida del embrión. La formación de la placenta requiere una activa proliferación vascular y durante el desarrollo embrionario el crecimiento continuo del lecho vascular implica no sólo el alargamiento de los vasos sanguíneos sino también un complejo proceso de remodelación (7).

Existe una amplia gama de procesos normales en los que está involucrada la angiogénesis. Entre los más notables se encuentran la maduración del cuerpo lúteo, los procesos inflamatorios, la reparación tisular en las heridas y las reacciones de hipersensibilidad retardada (8-10).

Una gran variedad de tejidos normales producen factores angiogénicos. Entre ellos podemos citar aquí: tiroides, retina, glándulas salivales, riñón, y tejido linfático (11-15).

La angiogénesis en condiciones patológicas se observa en tumores, respuestas inflamatorias crónicas, formación de queloides, procesos de neovascularización ocular y psoriasis (16).

Cualquiera sea el estímulo disparador del proceso angiogénico, las células del sistema inmune participan activamente en el desarrollo de la respuesta vascular. Se ha demostrado que factores solubles liberados desde linfocitos, macrófagos, mastocitos y neutrófilos tienen actividad angiogénica (17-19). Las plaquetas, por otra parte, constituyen una fuente abundante de factores de crecimiento que pueden modular la respuesta vascular (20).

Por otro lado existe una regulación autócrina del crecimiento de las células endoteliales, mediada por la liberación de factores solubles que promueven el desarrollo vascular (21).

2. OBJETIVOS Y DESARROLLO DEL TRABAJO DE TESIS

2.1 Angiogénesis tumoral

La vascularización en un tumor no sólo facilita su desarrollo sino que además acelera la diseminación celular hacia zonas distantes (metástasis).

Para establecer si existe una correlación entre la incidencia metastásica de un tumor y su capacidad angiogénica, se realizaron estudios en un modelo murino. En nuestro laboratorio contamos con un adenocarcinoma mamario murino en cepa BALB/c con mediana capacidad metastásica en pulmón (M3), desde el cual el Dr. Colombo obtuvo una variante experimental con alta incidencia de metástasis pulmonares (MM3), por transplantes sucesivos s.c. de las metástasis en ratones singeneicos (22).

En principio se empleó una técnica sencilla para determinar actividad angiogénica en el tumor primario y en las metástasis pulmonares respectivas.

A continuación se aisló la fracción responsable de dicha actividad, tanto desde extractos tumorales como desde células mantenidas en cultivo.

Por otro lado se desarrolló una nueva técnica de aislamiento y cultivo de células endoteliales, las que se emplearon para cuantificar la actividad angiogénica tumoral. Los resultados demostraron que el tumor con alta incidencia metastásica (MM3) induce mayor proliferación de células endoteliales que el tumor con mediana capacidad metastásica (M3).

2.2 Angiogénesis inducida por linfocitos

Cuando se inyectan intradérmicamente linfocitos normales en ratones alo o semialogeneicos, se produce una respuesta vascular compleja que incluye alteraciones en la histología capilar y generación de nuevos vasos sanguíneos. Dicha reacción no tiene lugar cuando se inoculan linfocitos normales singeneicos.

Dado que en este tipo de respuesta neovascular es bastante común hallar una masiva infiltración linfocitaria, se estudiaron los linfocitos de ratones singeneicos portadores de tumor para determinar si estos intervienen en la inducción de respuesta angiogénica.

En los estudios realizados in vivo en ratones BALB/c demostramos que los linfocitos estimulados por la presencia de un tumor producen una reacción vasoproliferativa cuando se inoculan intradérmicamente en la piel de ratones normales singeneicos; llamamos a esta reacción angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA).

A continuación estudiamos la reacción de SLIA en los tumores M3 y MM3 para determinar si existen diferencias en la respuesta angiogénica inducida por linfocitos estimulados por tumores con distinta capacidad metastásica.

2.3 Actividad angiogénica en sobrenadantes de cultivo de linfocitos.

En los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas aisladas desde ratones portadores de tumor, hay factores solubles con actividad exacerbadora del crecimiento tumoral, esta actividad puede ser transferida a ratones normales por inoculación i.p.

La actividad exacerbadora podría deberse, al menos en parte, a la presencia de factores solubles capaces de favorecer una respuesta vascular. Los estudios realizados para comprobar esta suposición demostraron que los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas de portadores de tumor contienen factores solubles capaces de inducir angiogénesis. Estos resultados sugieren que algún factor o factores, contenidos en los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas de portadores de tumor, son capaces de activar a los bazos de animales normales, tanto en la actividad exacerbadora del crecimiento tumoral como en la inducción de actividad angiogénica.

2.4 Mecanismo de SLIA

La angiogénesis inducida por linfocitos es resultado final de una cascada de eventos que comienzan con la activación de los linfocitos ante la presencia de un tumor. Para comprender cuál es el mecanismo que lleva a la aparición de una respuesta neovascular se estudió en primer lugar si la activación de los linfocitos se debe a la liberación de factores solubles desde las células tumorales o bien si se produce por componentes de la membrana de la célula tumoral. A continuación se realizaron distintos estudios con el fin de caracterizar la población de células esplénicas responsables de inducir angiogénesis.

Como se comentó en el punto anterior, una vez activados por el tumor, los linfocitos producen factores solubles capaces de promover una respuesta neovascular; estos factores podrían actuar directamente sobre las células endoteliales o bien ser mediadores del evento angiogénico al activar a otros tipos celulares. Se sabe que la activación de los macrófagos produce la liberación de prostaglandinas (PGs) desde estas células y que, por otro lado, los macrófagos activados son capaces de inducir angiogénesis.

En base a estos datos se quiso saber si los macrófagos intervienen en el SLIA y si lo hacen a través de la liberación de PGs.

Para realizar estos experimentos probamos:

- 1- el efecto de la eliminación de los macrófagos
- 2- el efecto de la inhibición de la síntesis de PGs

sobre la respuesta vascular inducida por linfocitos estimulados por células tumorales.

3. Sistema microvascular

3.1 Origen de los vasos sanguíneos

Durante la embriogénesis el desarrollo del endotelio vascular está fuertemente relacionado con la aparición de las células hematopoyéticas. Los primeros precursores de las células sanguíneas se encuentran en sitios extraembrionarios formando pequeños grupos o islotes, localizados en el mesodermo esplácnico del saco vitelino. En estos islotes las células periféricas se alargan y adelgazan, adoptando una morfología similar a la de las células endoteliales, mientras que las células centrales dan origen a las células hematopoyéticas. Los islotes sanguíneos primitivos se fusionan mediante anastomosis estableciendo así los primeros plexos capilares (23).

Después que el plexo capilar original se ha formado, el sistema vascular se extiende por brotación, crecimiento y migración del endotelio. El desarrollo de caminos vasculares mayores ocurre predominantemente a través de un proceso de alargamiento y diferenciación de los capilares en arterias y venas. Los factores que influyen sobre este proceso son: herencia, patrones de crecimiento de las células del parénquima, concentración de metabolitos y fuerzas físicas tales como el volumen de sangre, su relación de flujo y su presión.

3.2 La estructura de la red capilar

Visualizados los capilares por Malpighi en 1661, se tuvo de ellos una descripción simple: las arteriolas más pequeñas terminaban en un pincel de 4 ó 5 capilares que luego volvían a reunirse en una vénula.

En 1944 Chambers y Zweibach demuestran la complejidad de la red capilar y crean una entidad anatómica a la que llaman "unidad circulatoria", constituida por: arteriola, vénula, capilares y metaarteriola o canal preferencial, que une la arteriola con la vénula, siendo este canal el lugar de origen desde el cual nacen los capilares, que luego vuelven al mismo canal. La unidad se completa con el tejido conjuntivo y los capilares

linfáticos. A todos ellos les une un origen embriológico común, pues la célula primitiva es a la vez histioblástica y angioblástica.

Este esquema fue modificado mediante un enfoque que comprende una distribución vascular terminal en forma de red integrada por macro y micromallas donde las arteriolas, vénulas y capilares se reúnen en series de distribución. Del total de capilares que se ramifican en una arteriola, sólo algunos reingresan en la vénula de la propia unidad y los demás se unen a vénulas de otras unidades (24).

3.2.1. Arteriolas

Tienen un calibre aproximado de 500 micrones y están constituidas por un endotelio rodeado por una o dos capas de células musculares lisas; a medida que la arteriola disminuye su diámetro van escaseando las células musculares.

Las células endoteliales son delgadas y forman una lámina continua asentada sobre una membrana basal con ocasionales haces de fibrillas colágenas.

3.2.2. Capilares

El endotelio, componente principal de la pared del capilar, es la capa activa común a todas las partes del sistema vascular.

Las células endoteliales son alargadas en la dirección del eje de los capilares y sus extremos son aguzados. En los capilares más pequeños, una sola célula endotelial puede rodear toda la circunferencia del vaso, mientras que en los capilares de tamaño mediano 2 ó 3 células se extienden alrededor de la luz.

El calibre de los capilares varía en los distintos órganos dentro de límites relativamente estrechos y está en relación con el tamaño de los eritrocitos.

El microscopio electrónico ha demostrado que las células endoteliales se hallan en estrecha aposición, contactando unas con otras gracias a la presencia de desmosomas.

La lámina basal asegura la cohesión y aporta a los capilares su resistencia mecánica, jugando un rol muy importante como filtro. Está constituida por dos láminas, una de ellas próxima al tejido conectivo (lámina densa) y otra en íntima relación con la membrana celular de las células endoteliales.

Por regla general los capilares van acompañados por macrófagos fijos y células mesenquimáticas indiferenciadas y algunas células nerviosas dispersas. Se han descrito también otras células en muy estrecha asociación con el endotelio, a las que se llamó pericitos y que se encuentran englobadas por la membrana basal del capilar. Si bien la función de los pericitos no ha sido completamente determinada, estudios recientes sugieren que estas células podrían actuar en la regulación del crecimiento del endotelio capilar (25).

3.2.2.1. Estructura de la pared capilar

Se describen tres tipos de capilares: continuos, discontinuos y fenestrados.

Capilares continuos: El endotelio se presenta en forma ininterrumpida, con una lámina basal continua. Las células se hallan engrosadas en la región del núcleo, pero pueden ser muy delgadas en otras zonas. Uno de los rasgos más evidentes y característicos es la presencia de gran cantidad de vesículas intracitoplasmáticas que parecen originarse en un gran número de invaginaciones saculares (caveolas) de la membrana plasmática, que se abren ya sea en la superficie basal o en la superficie de la luz de las células endoteliales.

Las uniones entre las células endoteliales pueden ser interdigitadas o relativamente rectas. El borde de una o dos de las células puede prolongarse, por el lado de la luz capilar, en un estrecho pliegue o estructura a modo de solapa que sobresale dentro de la luz capilar.

Este tipo de capilares se encuentra en el músculo liso, esquelético y cardíaco y en diversos tejidos.

Capilares fenestrados: Se caracterizan por la presencia de zonas de endotelio sumamente adelgazado, con fenestraciones circulares que son sólo aparentes, puesto que se hallan cerradas por un diafragma muy delgado que presenta un engrosamiento central.

La membrana basal continúa a través de las fenestraciones, en la parte externa del capilar. Las zonas fenestradas sólo constituyen una parte de la circunferencia del vaso. Las uniones de las células se hallan generalmente en las zonas más gruesas del endotelio y no presentan diferencias significativas con las uniones observadas en los capilares continuos.

Los capilares fenestrados no son iguales en todas sus localizaciones; las fenestraciones varían de tamaño, cantidad y distribución.

Estos capilares se hallan en glomérulos renales, glándulas endócrinas, vellosidades intestinales, etc.

Capilares discontinuos: Presentan grandes orificios de hasta 2 μm de diámetro, que permiten el paso de grandes moléculas y aún de eritrocitos; carecen de pericitos. Se encuentran en médula ósea y en hígado.

3.2.2.2. Histofisiología del intercambio a través de la pared capilar.

El sistema vascular lleva las sustancias nutritivas, las hormonas y los metabolitos gaseosos que son necesarios para las células y recoge de ellas los productos primarios y secundarios de su metabolismo para su distribución o excreción. De ahí que el mecanismo del intercambio de sustancias a través de las paredes capilares (permeabilidad capilar) constituye uno de los campos de estudio fisiológico más importante.

Los capilares presentan una superficie extraordinariamente grande para el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos.

Las numerosas vesículas, situadas junto a la superficie endotelial y en el interior del endotelio, constituyen una forma submicroscópica de pinocitosis. Es ampliamente aceptado que el transporte vesicular juega un rol importante en el movimiento de macromoléculas a lo largo del endotelio capilar. Este concepto implica la existencia de vesículas libres dentro del citoplasma, que transfieren material de la superficie luminal a la superficie abluminal de la célula endotelial. Sin embargo, a pesar de la aparente separación entre las vesículas, éstas constituyen en realidad elementos de un sistema de invaginación permanente de la membrana de la célula endotelial (26).

Los estudios histoquímicos con peroxidasa como enzima marcadora han confirmado la rápida absorción y transporte transendotelial por las vesículas de micropinocitosis.

En los capilares fenestrados el intercambio se vé facilitado por la presencia de las fenestraciones, aún cuando ellas estén cerradas por un delgado diafragma. En estos capilares, el intercambio de macromoléculas hidrofílicas entre el fluído intersticial y el plasma sanguíneo se realiza a través de las fenestraciones (que poseen un solo diafragma), de canales transendoteliales (con dos diafragmas) y de las vesículas intracitoplasmáticas. Estas estructuras presentan variaciones en número en los distintos órganos, lo que explicaría en parte las diferencias en la permeabilidad vascular (27).

A lo largo de la red capilar, la estructura de los vasos cambia y las diferencias topográficas suelen ser bien evidentes. En el caso de la piel, donde se observan con facilidad, los vasos tienen forma de horquilla o asa, ordenadas paralelamente unas a otras; su pared es simplemente una capa de células endoteliales continuas que se han fenestrado en la proximidad venular.

Además de los capilares en ansa, se encuentran en la piel los glomus, formaciones epitelioides apelonadas y aisladas por una cápsula dentro de la cual se hallan las vénulas aferentes, circunvoluciones de las arteriolas preglómicas con paredes gruesas formadas por mieloblastos o

células mioepiteliales y un tejido conjuntivo rico en histiocitos. La función de los glomus es intervenir en la regulación de la temperatura cutánea y corporal.

Otro ejemplo interesante lo constituyen los capilares del pulmón, en los que el endotelio se encuentra casi en directo contacto con el epitelio respiratorio, ya que posee sólo una fina trama de fibras conectivas y elásticas, facilitando así el intercambio gaseoso.

3.2.3. Sinusoides

Son conductos vasculares de calibre grande y generalmente irregular, con una capa muy delgada de tejido conectivo entre la pared vascular y el parénquima del órgano. Se desarrollan embriológicamente por crecimiento del parénquima hacia adentro, en el interior de un seno venoso grande y de paredes finas.

Los sinusoides son característicos de la circulación del hígado, bazo, médula ósea y ciertas glándulas endócrinas, como suprarrenal e hipófisis.

Podemos diferenciar:

Sinusoides discontinuos las células de revestimiento se encuentran sobrepuestas como tejas en ciertas zonas, mientras que en otras pueden apreciarse grandes brechas entre las células. La membrana basal es discontinua o falta por completo.

Sinusoides fenestrados: no hay brechas intercelulares, la lámina basal es continua pero en el delgado endotelio hay poros cerrados por diafragmas.

En estos vasos no hay ninguna barrera a la salida de partículas menores, y la composición del líquido en el espacio perivascular es esencialmente la misma que en el plasma.

3.2.4. Vénulas

Cuando varios capilares se unen, forma primero un tubo de aproximadamente 20 μ m de diámetro, constituido por una capa de endotelio rodeada de una delgada capa de fibras colágenas longitudinales y fibroblastos.

A medida que el calibre del vaso aumenta aparecen, entre el endotelio y el tejido conjuntivo, células musculares lisas diferenciadas, que se disponen cada vez en forma más próxima entre sí.

Las células endoteliales se unen unas con otras dejando espacios intercelulares mayores que los observados en capilares; estos espacios pueden modificar su tamaño por la acción de histamina o serotonina.

El número de pericitos aumenta a medida que se incrementa el calibre de la vénula; posteriormente, en las venas mayores, serán reemplazados por células musculares lisas.

Hay razones para creer que no todo el intercambio se realiza en los capilares. Al parecer, en este proceso actúan también las vénulas, siendo particularmente importante su intervención en los cambios que acompañan la inflamación. Aparentemente existe un gradiente de filtración desde el lado arterial al venoso, el cual alcanza su máximo en las vénulas y luego disminuye bruscamente en los vasos de mayor calibre.

3.2.5. Vasos colaterales

Pueden definirse como vasos colaterales aquellos vasos que actúan como rutas de aporte sanguíneo a un tejido u órgano en respuesta a una injuria del sistema vascular.

Estas rutas alternativas se forman por dilatación de canales preexistentes o por neovascularización desde vasos colaterales.

Se ha sugerido que las fuerzas mecánicas que actúan sobre el endotelio proveen un estímulo para la formación de nuevos vasos. La separación física de las células endoteliales por vasodilatación puede sacarlas del

estado de inhibición por contacto, permitiendo que las células normales quiescentes comiencen a proliferar. Por otro lado participan factores bioquímicos liberados en la zona de la injuria, tales como productos de metabolismo anaerobio y factores angiogénicos.

La neovascularización asociada con retinopatía diabética, reparación tisular de heridas y crecimiento tumoral, está siempre precedida por el desarrollo de un tejido pobremente perfundido. También se han identificado factores mitogénicos para células endoteliales en los extractos de músculo cardíaco isquémico. Estos tejidos contienen mitógenos que estimulan la proliferación de células endoteliales in vitro, además de angiogénesis in vivo (28, 29).

3.3 Aspectos estructurales y funcionales del endotelio

Hasta el año 1970 aproximadamente, se pensó que las células endoteliales constituían una población prácticamente homogénea, cuya actividad principal era la de actuar como un filtro selectivo entre la sangre y el parénquima de los tejidos. En base a este concepto, la investigación ultraestructural se centró casi con exclusividad en encontrar una correlación entre la morfología celular y la permeabilidad vascular.

La introducción del cultivo de células endoteliales (30, 31), permitió el análisis de la biología de la célula endotelial en forma específica; se realizaron estudios sobre demandas metabólicas, actividades sintéticas y reacciones celulares frente a condiciones ambientales definidas (32-34).

3.3.1. Ultraestructura de la superficie celular

La superficie apical de la célula endotelial incrementa su área a través de varios niveles de organización: proyecciones endoteliales, caveolas y glicocáliz.

Las proyecciones endoteliales tienen dos funciones, por un lado incrementan el área superficial y por el otro limitan el acceso de células sanguíneas a la

superficie, permitiendo así la existencia de una capa de plasma libre de células, en la que se encuentran los sustratos que percolan sobre las enzimas asociadas a la superficie de la célula endotelial.

Las caveolas son pequeñas depresiones de la membrana celular, en donde se encuentran distintas enzimas; actúan creando un microambiente apto para el procesamiento de los sustratos circulantes.

El glicocálix está involucrado en interacciones con proteínas plasmáticas y, bajo ciertas condiciones, con células sanguíneas. Actúa como un filtro molecular, controlando el acceso de los sustratos; además regula la interacción de la célula con su ambiente, enmascarando receptores latentes sobre la superficie de la célula endotelial.

3.3.2. Citoesqueleto de la célula endotelial

Los elementos más importantes del citoesqueleto son: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermediarios. Estas proteínas fibrosas constituyen un sistema altamente dinámico, regulado por proteínas asociadas que controlan el entrecruzamiento y la polimerización. Aunque se los denomina en forma colectiva con el nombre de "citoesqueleto celular", constituyen en realidad entidades diferenciables desde el punto de vista de su estructura bioquímica, propiedades inmunológicas y función (35).

Microfilamentos de actina: se los conoce en general como "fibras de stress" ya que se les atribuye función contráctil en condiciones de esfuerzo mecánico; proveen la fuerza de contracción para la migración (36).

En algunos sistemas los microfilamentos no parecen ser necesarios para la locomoción y se hacen aún más prominentes cuando las células están adheridas al sustrato (37).

Los microfilamentos de actina están localizados en la periferia celular y también dentro de la célula. Los estudios de tinción in situ con inmunofluorescencia han mostrado que contienen miosina, alfa-actinina y F-actina.

Microtúbulos y centrosomas: las células endoteliales contienen centrosomas formados por centriolos apareados alrededor de los cuales aparece un material amorfo. El centrosoma actúa como centro de organización de los microtúbulos, los que emanan desde el área centrosomal, disminuyendo su densidad hacia la periferia de la célula.

Filamentos intermedios: no se sabe en realidad si estos filamentos tienen algún rol en la motilidad de las células endoteliales. Por ejemplo los anticuerpos anti-filamentos intermediarios inyectados en fibroblastos, inducen el arrollamiento de los filamentos alrededor del núcleo, pero no alteran la morfología celular ni la locomoción. (38).

3.3.3. Membrana basal

La membrana basal de las células endoteliales tiene una composición compleja con variaciones en los diferentes órganos, lo que explica la diversidad de reacciones inmunológicas de la misma.

El desarrollo reciente de técnicas para mantener células endoteliales en cultivo brindó la posibilidad de investigar la producción de membrana basal bajo condiciones controladas.

Al microscopio óptico la membrana basal aparece como una zona PAS positiva de gran espesor y fácilmente visible. Cuando se la observa con microscopio electrónico la morfología cambia: la densidad no es homogénea y se diferencian dos zonas: la lámina rara, en contacto con las células y la lámina densa, de mayor espesor y en contacto con una zona de fibras reticulares.

En la composición de la membrana basal intervienen glicoproteínas colágenas (colágenos tipo IV y V), glicoproteínas no colágenas (laminina, fibronectina) y proteoglicanos (heparán sulfato).

El colágeno tipo IV es específico de membrana basal y constituye la proteína estructural más importante. Las células endoteliales sintetizan procolágeno tipo IV y lo depositan en la lámina densa de la matriz extracelular (39,40).

La laminina está localizada en la lámina rara; tiene estructura en forma de cruz, con un brazo largo y tres brazos cortos similares entre sí, unidos por puentes disulfuro. Estos brazos están interrumpidos por dominios globulares y en sus extremos hay también dominios globulares, con distinta sensibilidad al tratamiento enzimático con proteasas. Se ha demostrado que la laminina interviene en la unión de las células endoteliales con el substrato de colágeno, a través de los dominios globulares de los brazos cortos. La interacción con la célula es altamente específica e involucra a una proteína de PM 70.000 situada en la membrana plasmática. Un sitio de unión al heparán sulfato se encuentra en el dominio globular terminal del brazo largo, pero además existen otros sitios de unión de menor afinidad en otras zonas de la molécula. Las propiedades de la laminina sugieren que actuaría como molécula mediadora en la unión entre las células y los componentes de la membrana basal (41,42).

La fibronectina es un dímero unido por cuatro puentes disulfuro en la zona media, que es la zona de unión a la célula; sus extremos se unen al colágeno.

El heparán sulfato se encuentra en la lámina rara, pero cercana a la lámina densa; es responsable de los sitios aniónicos de la membrana basal, lo que le confiere importancia en la permeabilidad.

Las células endoteliales de la aorta producen tropoelastina cuando se las incuban con medio condicionado de células musculares lisas. La síntesis de elastina es de particular importancia en el pulmón y en la pared de los grandes vasos, donde actúa como componente dinámico importante de la elasticidad tisular. En las arterias, por ejemplo, la lámina elástica interna es adyacente a la membrana basal del endotelio, formando un puente común entre las células endoteliales de la íntima y las células musculares de la media. No se sabe aún con seguridad si la lámina media se origina desde las células endoteliales o desde las células musculares o bien desde ambas. La producción de elastina por las células endoteliales en presencia de medio condicionado por células de músculo liso, favorece la idea de una regulación a través de mediadores solubles, que actuaría tanto en la formación de la pared vascular como en la reparación de injurias (43).

La membrana basal brinda una estructura de sostén y anclaje para las células endoteliales. En el riñón actúa además como una barrera de filtración, ya que retiene las moléculas de alto peso molecular; esta función depende tanto de la porosidad de la membrana como de la carga eléctrica (dada por los sitios aniónicos). La membrana basal de las células endoteliales actúa además como reserva de factores de crecimiento con actividad angiogénica, esta propiedad es de gran importancia en los procesos de neovascularización (44).

3.3.4. Actividades metabólicas

Las células endoteliales son capaces de inactivar varias sustancias humorales, tales como adenosina y norepinefrina. Además poseen la enzima convertidora de angiotensina en la superficie apical; esta enzima degrada la bradiquinina (vasodilatadora) en productos inactivos y convierte la angiotensina I en angiotensina II, que se libera directamente a la circulación ejerciendo un efecto marcadamente hipertensivo; así el endotelio juega un rol importante en la regulación de la presión sanguínea (45,46).

Las angiotensinas II y III son producidas en la superficie de la célula endotelial y actúan como secretagogos potentes de la aldosterona, de allí que el endotelio tenga un papel importante en el balance de sales y agua del organismo.

En virtud de la capacidad de sintetizar y liberar prostaciclina (PGI₂) y a través de la enzima ADPasa que posee en su superficie, el endotelio es activamente antitrombogénico (47).

La bradiquinina se inactiva después del contacto con la enzima convertidora de angiotensina, pero el contacto con receptores de superficie de la célula endotelial provoca una amplificación de la liberación de PGI₂. Por lo tanto dependiendo del tipo de interacción con las células endoteliales, la bradiquinina afecta el tono vascular y el flujo sanguíneo (48).

En los pulmones el endotelio facilita la excreción de CO₂. Las células endoteliales poseen la enzima anhidrasa carbónica, que ayuda a mantener el pH sanguíneo controlando el equilibrio entre bicarbonatos y CO₂ plasmáticos.

3.3.5 Actividad sintética

Las células endoteliales sintetizan glicoproteínas de la membrana basal: colágeno, laminina y fibronectina.

Se ha dado gran atención al estudio de la síntesis de glicosaminoglicanos (GAGs), un grupo de sustancias complejas no sólo desde el punto de vista químico sino también en cuanto a la gran variedad de funciones que cumplen.

Los GAGs son componentes esenciales del glicocálix. Dado que éste se encuentra en la superficie apical y además cubre la superficie basal del endotelio, la variación en la concentración de ácido hialurónico que contiene, podría ser responsable de las variaciones en la adhesión de las células endoteliales a su substrato (49).

El heparán sulfato, otro constituyente del glicocálix, actúa como agente bloqueante de la proliferación de células musculares, impidiendo la invasión de células de la túnica media en la capa íntima en condiciones normales.

El factor de von Willebrand y el antígeno relacionado al factor VIII (FVIII-RAg) son glicoproteínas sintetizadas por las células endoteliales que forman parte también del glicocálix.

3.3.6. Antígenos de superficie de las células endoteliales

Cuando se comparan las células de endotelio capilar de órganos diferentes, se observa que éstas no son similares entre sí. Se ha demostrado que las células endoteliales expresan antígenos en su superficie, específicos del órgano en el que se encuentran (50).

Las células del endotelio vascular (VEC) son notablemente inmunogénicas y expresan antígenos únicos. Son capaces de actuar como presentadoras de antígenos, de manera similar a los monocitos de sangre periférica. Se demostró que las células endoteliales y los monocitos presentan un antígeno no HLA que puede funcionar como inmunógeno potente en el transplante de órganos.

Los estudios sobre rechazo de injertos demostraron que los anticuerpos pre-formados contra el sistema antigénico VEC-monocito del donante producen el rechazo del órgano transplantado aún en combinaciones HLA idénticas, sin embargo los anticuerpos dirigidos contra los monocitos del donante (antígenos específicos de monocito) parecen no tener efecto (51).

Los determinantes antigénicos asociados con la superficie de las células endoteliales juegan, por otro lado, un rol esencial en la adhesión selectiva de las células tumorales al permitir el reconocimiento diferencial del endotelio por parte de la célula metastásica (52).

3.3.7. Marcadores de células endoteliales

El criterio empleado en la identificación de células endoteliales se caracterizó por la búsqueda de aspectos morfológicos y fisiológicos únicos, tales como los cuerpos de Weibel-Palade, la presencia de enzima convertidora de angiotensina y la capacidad de sintetizar el factor VIII anti-hemofílico (FVIII) (53).

El FVIII-RAg fue considerado un marcador específico de células endoteliales, aunque estudios realizados en distintos tipos de vasos sanguíneos demostraron que no todas las células lo presentan y que por otro lado, los megacariocitos también reaccionan con el suero anti-FVIII RAg (54).

En base a estos resultados se recomendó el uso de lectinas derivadas de *Ulex europeans* (UEA I) como marcadores sensibles para células endoteliales humanas, especialmente para el estudio del endotelio capilar. Sin embargo, las lectinas no son específicas cuando se emplean como marcador en material no humano (55).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes localizados en antígenos específicos de células endoteliales permitió la detección de estas células con gran definición y exactitud (56).

4. El proceso angiogénico

4.1 Desarrollo secuencial de los capilares frente a un estímulo angiogénico.

Los estudios sobre neovascularización demostraron que el desarrollo capilar tiene lugar mediante una serie de pasos secuenciales, similares para cualquier tipo de estímulo angiogénico desencadenante. Los capilares se originan desde venas pequeñas (vénulas) o bien desde otros capilares, los vasos mayores en los que existen células musculares lisas, generalmente no dan origen a nuevos capilares.

1. Uno de los eventos iniciales es la degradación local de la membrana basal en el lado venoso cercano al estímulo angiogénico (57). Las células endoteliales estimuladas por sustancias angiogénicas segregan altas concentraciones de colagenasa y activador de plasminógeno (57, 58). Esto sugiere que la degradación local de la membrana basal es llevada a cabo directamente por las células endoteliales, una vez que éstas reciben el estímulo angiogénico.

2. A través de la zona de degradación de la membrana basal, las células endoteliales comienzan a migrar hacia la zona del estímulo.

3. Las células se alinean en una forma bipolar a medida que se forma el primer brote vascular. Esta alineación se observó tanto in vivo como in vitro (59).

4. A continuación se forma el lumen. En muchos ejemplos de angiogénesis post-embrionaria, el lumen parece originarse en una curvatura que se desarrolla en la célula endotelial, como si el citoesqueleto en sí mismo se hubiera reordenado para formar dicha curvatura (60). Sin embargo, en el desarrollo embrionario temprano, la formación del lumen se produce a través de la aparición de una vacuola en la célula endotelial.

5. Comienzan a dividirse las células ubicadas en la parte media del borde vascular. Las células apicales continúan migrando, pero generalmente no se dividen.

6. Los brotes vasculares se anastomosan entre sí formando rulos (loops), que a su vez pueden elongarse y dar origen a brotes adicionales. No se conoce el proceso por el cual los brotes se reconocen entre sí. Los loops continúan su desarrollo dirigiéndose hacia la zona en la que se encuentra el estímulo angiogénico.

7. Lentamente comienza el flujo sanguíneo en el interior de los loops.

8. Aparecen pericitos a lo largo de todo el capilar.

9. Se sintetiza la membrana basal.

Cuando se estudia in vitro el comportamiento de células endoteliales clonadas se observan los mismos eventos que se enumeraron aquí, con desarrollo de redes capilares en las placas de cultivo; la diferencia la establece la ausencia de pericitos (61,62). Estudiando el comportamiento de células endoteliales derivadas de vena umbilical se observó que los vasos transportan fluido en su interior.

Los estudios realizados in vivo e in vitro parecen indicar que la célula endotelial expresa un programa definido para generar redes vasculares. Los eventos son los mismos, independientemente de que el estímulo desencadenante provenga de un agente inflamatorio, de un estímulo inmunológico o de un tumor (63).

4.2 Sistemas empleados para estudiar la angiogénesis.

4.2.1. Cámaras transparentes

Los primeros estudios sobre angiogénesis fueron meramente descriptivos y se basaron en el empleo de cámaras transparentes implantadas en animales.

El primer modelo de cámaras fue diseñado por Sandison y Clark para el estudio dinámico de la inflamación. Las cámaras se insertaron en la oreja de

conejos, observándose la aparición de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a la herida causada por la implantación de la cámara (64, 65).

Algire y Chalkley modificaron la cámara de Sandison-Clark para insertarla en el dorso de ratones; con este sistema fue posible estudiar la vascularización de tumores murinos. Se observó que la respuesta vascular provocada por el implanto tumoral era más intensa que la vascularización inducida por un estímulo inflamatorio. Estos estudios llamaron la atención sobre el fenómeno de neovascularización tumoral y sin duda establecieron que los tumores incitan dicha respuesta. Sin embargo el sistema empleado adoleció a ciertas limitaciones importantes. En primer lugar no fue posible obtener una descripción morfológica de alta resolución debido a que la cámara era pequeña y sólo pudo implantarse en un espacio limitado. En segundo lugar con este sistema sólo pudieron estudiar tumores transplantables para que no se produjera el rechazo del implanto (66, 67).

En 1964 Sanders y Shubik diseñaron una nueva versión de la cámara transparente para implantarla en la bolsa de la boca del hámster Sirio. Este sistema brindó un sitio privilegiado inmunológicamente en el cual pudieron implantarse tumores de distintas especies sin que se produjera rechazo (68).

Por último Greenblat y Shubik usaron una cámara similar a la anterior y demostraron la proliferación de capilares sanguíneos inducida por un tumor separado del lecho vascular del huésped por un filtro que impedía el contacto directo entre el tejido normal y el implanto tumoral (69).

4.2.2. Membrana coriolantoidea de embrión de pollo

Un sistema universalmente empleado en el estudio de la angiogénesis es el de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (MCA), cuyos vasos proliferan rápidamente (70).

Para exponer la MCA es necesario crear una falsa cámara de aire entre ésta y la membrana lúcida. Luego se efectúa una pequeña abertura en la cáscara con ayuda de un

torno y se coloca sobre la MCA un trozo de filtro (Millipore, 0.22 μm) con la fracción a testear. Las fracciones de tumor implantadas en el día 9 inducen una respuesta vascular entre las 48 y 72 horas. Esta respuesta puede ser reconocida como una proliferación capilar con aspecto arborescente que converge hacia la zona del implanto (71).

Los embriones pueden desarrollarse además sin la cáscara, colocándolos dentro de cápsulas de Petri en estufa gaseada. Esta técnica permite visualizar continuamente el desarrollo vascular y brinda además una mayor superficie para implantar las muestras, lo que hace posible realizar comparaciones directas entre muestras diferentes y controles en la misma membrana (72).

Usualmente se emplean vehículos para conseguir la liberación de pequeñas cantidades de la sustancia a testear (1-50 μg). Uno de los vehículos más empleados es metilcelulosa al 0,5%. Un método alternativo consiste en disolver la muestra en 5-10 μl de agua destilada y colocarla sobre un cubreobjetos plástico dejándola secar, para luego implantar sobre la membrana.

La evaluación de la neovascularización se realiza de tres maneras: por observación estereomicroscópica (16X) que puede hacerse diariamente de los embriones cultivados sin la cubierta de la cáscara; por proyección fotográfica, que permite evaluaciones posteriores y comparación entre distintas experiencias, y por estudios histológicos (73).

La valoración de la respuesta angiogénica en la MCA es cualitativa; comúnmente se le asigna un valor positivo o negativo, o bien se dá una gradación a la respuesta positiva en función de la intensidad de la neovascularización (74). Algunos autores emplean la técnica de diluciones sucesivas de las muestras y asignan un valor positivo o negativo a la respuesta, con el fin de obtener el valor de punto final (75).

Los ensayos de actividad angiogénica en MCA son relativamente poco costosos y permiten el estudio a gran escala de sustancias promotoras e inhibitoras de la vascularización; por ello han sido ampliamente utilizados para estudiar la actividad angiogénica inducida por tumores, células transformadas por virus, adipocitos,

tejido linfoide, extractos de retina, placenta, fluído sinovial y riñón y además para determinar la actividad inhibidora de la angiogénesis en los extractos de humor vítreo, cartílago y córnea (76-87).

A pesar de las ventajas antes mencionadas, ésta técnica tiene varias limitaciones, tales como la subjetividad de la evaluación, la dificultad en cuantificar la respuesta vascular y el problema de diferenciar vasoproliferación de efectos causados por los mismos implantos sobre la distribución de los vasos sanguíneos en la superficie de la MCA. Se demostró que la implantación de diferentes materiales sobre la MCA provoca una reacción inflamatoria con proliferación de fibroblastos y capilares. La iniciación de esta reacción es independiente de la naturaleza del material empleado y es causada aún por los mismos materiales del huevo, tales como pequeños trozos de cáscara, albúmina coagulada y vitelo. Incluso los filtros Millipore pueden inducir proliferación de vasos sanguíneos, fibroblastos y células ectodérmicas. Esto llevó a concluir que el estímulo para la proliferación reside en parte en la misma MCA. Sin embargo, la reacción inflamatoria y la proliferación vascular inespecífica pueden prácticamente suprimirse embebiendo los filtros con hidrocortisona (0,5 mg/ml) antes de aplicarlos sobre la MCA (88, 89).

El ensayo sobre MCA puede ser modificado en muchos aspectos para los estudios a realizar, pero cuando se necesita comparar la actividad angiogénica de distintos tejidos o extractos, deben estandarizarse las condiciones para cada aplicación particular. Los factores que pueden influenciar la respuesta y su interpretación incluyen: edad del embrión, temperatura de incubación, infecciones y diferencias topográficas del patrón vascular en el sitio de implantación de la muestra. Los ensayos con extractos y sustancias difusibles son difíciles de evaluar cuando se compara con estudios de muestras sólidas.

4.2.3. Implantación de muestras en córneas.

La córnea provee un substrato transparente y avascular donde pueden estudiarse en forma continua los distintos pasos del proceso angiogénico, permitiendo la medición lineal del desarrollo capilar.

Para formar una cámara en la córnea, se efectúa una incisión superficial a una distancia de aproximadamente 1 a 2 mm del borde del ojo y con una pequeña espátula se atraviesa la córnea hacia abajo, en esta cámara se coloca la muestra (90). La implantación de la muestra a una cierta distancia de los vasos del limbus produce una separación anatómica que permite la observación secuencial de la neovascularización.

Los capilares crecen desde el borde de la córnea a una velocidad que puede llegar a 0,2 mm/día. Se los observa a través de una lámpara de hendidura y se mide el crecimiento con un micrómetro ocular.

Los primeros ensayos de neovascularización en córnea se llevaron a cabo en conejos, pero cuando se estudió la vascularización inducida por tumores murinos, este modelo tuvo como desventaja el rechazo inmunológico del implanto, una vez que los vasos sanguíneos alcanzaban al tumor (91). Este problema fue subsanado con el desarrollo de una técnica para el estudio de la actividad angiogénica en ratones, que permitió el empleo de cepas singeneicas evitando así el rechazo del tumor (92). Más tarde se desarrolló una técnica similar para el estudio de la angiogénesis en córnea de rata (93).

4.2.4. Polímeros de liberación lenta.

A partir del desarrollo de técnicas de muestreo en córnea de animales de experimentación, resultó interesante substituir los implantos tisulares por extractos libres de células. El problema era conseguir la liberación lenta del extracto, de tal forma que se estableciera un gradiente de concentración adecuado dentro de la córnea. Fue necesario cubrir dos requerimientos esenciales: el vehículo debía ser inerte para no causar por sí mismo inflamación y por otro lado debía ser capaz de liberar moléculas de alto peso molecular.

Después del estudio empírico de una gran variedad de polímeros, se encontraron dos que cubrieron las condiciones requeridas: poli-(2-hidroximetil-metacrilato) y etilen-vinil-acetato. Con estos polímeros se mantiene una tasa de liberación constante de proteínas y otras macromoléculas a una velocidad de microgramos/día y más

recientemente nanogramos/día. Los implantes tienen un tamaño pequeño (1 mm^2) y son bien tolerados en la córnea y otros tejidos, como la MCA (94).

4.2.5. Ensayos con células endoteliales

Como se mencionó anteriormente, el proceso de neovascularización se caracteriza por la migración y posterior proliferación de capilares en respuesta a un estímulo desencadenante. En base a esto y con el fin de obtener métodos reproducibles a gran escala para cuantificar la angiogénesis, se pusieron a punto técnicas de cultivo de células endoteliales, las cuales se aislaron desde grandes vasos y desde capilares; estos cultivos permitieron realizar distintos estudios de cuantificación (95 - 97).

La migración se estudia con la cámara de Boyden, el ensayo de Albrecht-Buehler y la técnica de gelatina agarosa. La cámara de Boyden consiste en dos compartimientos separados por una membrana porosa, en el compartimiento inferior se coloca una concentración conocida del extracto a ensayar y en el compartimiento superior se colocan las células endoteliales. Las células se adhieren a la membrana y migran a través de los poros, quedando adheridas a la superficie inferior de la misma. Menos del 5% de las células endoteliales se despegan desde esta superficie y por lo tanto el número de células adheridas a la cara inferior de la membrana refleja el total de células que migró a lo largo de los poros. La relación entre el número de células que migra y el gradiente de concentración del extracto a través de la membrana, provee una medición de la actividad quimiotáctica de la sustancia para las células endoteliales in vitro (98).

En el elegante sistema diseñado por Albrecht-Buehler para analizar migración, las células se plaquean sobre cubreobjetos tratados previamente con oro coloidal. Las células fagocitan el oro y a medida que migran dejan tras de sí una superficie desnuda. Con ayuda de un analizador de imágenes se determina el perímetro, diámetro máximo y área total. El patrón de movimientos es

altamente irregular y por lo tanto un incremento en el trazado fagocítico se detecta con mayor exactitud teniendo en cuenta el área total.

La técnica de gelatina-agarosa consiste en preparar placas de Petri con una capa delgada de gelatina al 1% sobre la cual se coloca agarosa al 1.8% formando una capa gruesa. En esta última se hacen tres perforaciones alineadas hasta llegar a la capa de gelatina. Las células endoteliales se siembran en la perforación central y en las otras dos se colocan la muestra y el control. En una cuarta perforación, alejada de las anteriores, se siembran células endoteliales con el fin de comprobar que éstas migran formando un halo uniforme cuando no se les aplica ningún tratamiento. Después de la incubación, se elimina la capa de agarosa y se colorean las células; la cuantificación de la migración se realiza determinando dos parámetros: distancia alcanzada y número de células que han migrado (99).

En el ensayo de proliferación de células endoteliales frente a extractos de diverso origen, se determina el incremento en el número celular, la incorporación de precursores marcados y el contenido en ADN (100 - 105).

4.2.6. Ensayos para la detección de angiogénesis inducida por linfocitos.

Los ensayos de la angiogénesis inducida por linfocitos (LIA), se realizan inoculando i.d. linfocitos inmunocompetentes en ratones alogeneicos o semialogeneicos previamente irradiados. La respuesta angiogénica se mide 5 días después, en función del número de divaricaciones vasculares que rodean al inóculo (106).

Para estudiar la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA), los linfocitos se inoculan i.d. en ratones normales no irradiados y la respuesta vascular se mide en base al aumento en la densidad de vasos de la zona que rodea al inóculo (107). El ensayo de SLIA será explicado en detalle en el capítulo V.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Goldman E.: The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2: 1236, 1907.
2. Algire G., Chalkley H.: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 6: 73, 1945.
3. Ausprunk D., Knighton D., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois: Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am. J. Pathol.* 79: 597, 1975.
4. Folkman J.: An understanding of angiogenesis: Search and discovery. *Perspect. Biol. Med.* 29: 10, 1985.
5. Folkman J.: Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 19: 331, 1974.
6. Ziche M., Gullino P.: Angiogenesis and neoplastic progression in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 483, 1982.
7. Zawicki D., Jain R., Schmidt-Schoenbein G., Chien S.: Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc. Res.* 21: 27, 1981.
8. Glaser B., D'Amore P.: Adult tissues contain chemoattractants for vascular endothelial cells. *Nature* 288: 483, 1980.
9. Thakral K., Goodson W., Hunt T.: Stimulation of normal blood vessel growth by wound macrophages. *J. Surg. Res.* 26: 430, 1979.
10. Gospodarowicz D., Thakral K.: Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 847, 1978.

11. Folkman J.: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?. *Cancer Res.* 46: 467, 1986.
12. Federman J., Brown G., Feldberg N., Felton S.: Experimental ocular angiogenesis. *Am.J.Ophthalmol.* 89: 231, 1980.
13. Hoffman H., McAuslan B., Robertson D., Burnett E.: An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. *Exp. Cell Res.* 102: 269, 1976.
14. Folkman J., Cotran R.: Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16: 207, 1976.
15. D'Amore P., Glaser B., Brurson S., Fenselau A: Angiogenic activity from bovine retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA.)* 78: 3068, 1981.
16. Folkman J., Klagsburn M.: Tumor angiogenesis: effect on tumor growth and immunity. En: *Fundamental aspects of neoplasia*, pág. 401, 1975. Editado por Glottieb, Plescia, Bishop. Springer-Verlag, New York Inc.
17. Auerbach R., Kubai L., Sidky Y.: Angiogenesis induction by tumors, embrionic tissues and lymphocytes. *Cancer Res.* 36: 3435, 1976.
18. Fromer C., Klintworth G.: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimental induced vascularization. Comparison of experimental models of corneal vascularization. *Am. J. Pathol.* 79: 537, 1975.
19. Polverini P., Cotran R., Gimbrone M., Unanue E.: Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804, 1977.
20. Di Corletto P., Bowen-Pope D.: Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 1919, 1983.

21. Gajdusek C., Di Corletto P., Ross R., Schwartz S.: An endothelial cell-derived growth factor. *J. Cell. Biol.* 85: 467, 1980.
22. Colombo L., Bonaparte G., Klein S., Stillitani-D'Elia J.: Selección in vivo de una línea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. *Medicina, Buenos Aires* 40: 827, 1980.
23. Dieterlen-Liévre F.: On the origin of the hematopoietic stem cells in the avian embryo. *J. Embriol. Exp. Morphol.* 33: 607, 1975.
24. Bloom W., Fawcett D.: *Tratado de Histología*, pág. 407, 1973, Editorial Labor Bs.As..
25. D'Amore, P., Orlidge S.: The role of the pericyte in microvascular growth control. En: *Angiogenesis, mechanisms and pathobiology*, pag. 125, 1987. Editado por D. Rifkin y M. Klagsburn; *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory.
26. Frakjaer-Jensen J: Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. *J. Ultrastruct. Res.* 73: 9, 1980.
27. Milici A., L'Hernault N., Palade G.: Surface densities of diaphragmed fenestrae and transendothelial channels in different murine capillary beds. *Circ. Res.* 56: 709, 1985.
28. Knighton D., Hunt T.: Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221: 1283, 1983.
29. D'Amore P., Thompson R.: Mechanisms of angiogenesis *Ann. Rev. Physiol.* 49: 453, 1987.
30. Jaffe E., Nachman R., Becker C., Minick C.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52: 2745, 1973.
31. Gimbrone M.: Culture of vascular endothelium. *Progr. Hemost. Thromb.* 3: 1, 1976.

32. Killacky J., Johnson M., Movat H.: Increased permeability of microcarrier-cultured endothelial monolayers in response to histamine and thrombin. *Am. J. Pathol.* 122: 50, 1986.
33. McCarroll D., Levin E., Montgomery R.: Endothelial cell synthesis of von Willebrand antigen II, von Willebrand factor and von Willebrand factor/von Willebrand antigen II complex. *J. Clin. Invest.* 75: 1089, 1985.
34. Olgemoler B., Schon J., Willared O.: Endothelial plasma membrane is a glucocorticoid-regulated barrier for the uptake of glucose into the cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 43: 165, 1985.
35. Kalnins V., Subrahmanyam L., Glotieb A.: The reorganization of cytoskeletal fibre systems in spreading porcine endothelial cells in culture. *Eur. J. Cell. Biol.* 24: 36, 1981.
36. Kreis T., Birchemier W.: Stress fiber sarcomeres of fibroblast are contractile. *Cell* 22: 555, 1980.
37. Singer J.: Association of fibronectin and vinculin with focal contacts and stress fibers in stationary hamster fibroblast. *J. Cell. Biol.* 92: 398, 1982.
38. Lin J., Feramisco J.: Disruption of the in vivo distribution of the intermediate filaments in fibroblast through the microinjection of a specific monoclonal antibody. *Cell* 24: 185, 1981.
39. Kramer R., Fuh G., Karasek M.: Type IV collagen synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into subendothelial basement membrane. *Biochem.* 24: 7423, 1984.
40. Mayne R.: The different types of collagen and collagenous peptides. En: *The role of extracellular matrix in development*, pág. 33, 1984. Editado por A. Liss, Inc., New York.
41. Timpl R., Engel J., Martin G.: Laminin, a multifunctional protein of basement membranes. *Trends Biochem. Sci.* 8: 207, 1983.

42. Gospodarowicz D., Greenburg G., Foidart J., Savion N.: The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 107: 171, 1981.
43. Mecham R., Madras J., Mc Donald J., Ryan V.: Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 116: 282, 1983.
44. Vlodawsky J., Folkman J., Klagsburn M: Heparin-binding endothelial cell growth factors are sequestered by the extracellular matrix. En: *Angiogenesis, Mechanisms and Pathobiology*, pág. 58, 1987. Editado por D. Rifkin y M. Klagsburn. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory.
45. Ryan U.: New uses for endothelial cell culture. *Bio. Ess.* 1: 114, 1985.
46. Ryan I., Ryan U.: Humoral role of arterial blood pressure: A role for the lung?. *Cardiovasc. Med.* 3: 351, 1978.
47. Crutchley D., Ryan U., Ryan J.: Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine disphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery. *J. Clin. Invest.* 66: 28, 1980.
48. Crutchley D., Ryan J., Ryan U., Fisher G: Bradykinin induced release of PGI₂ and thromboxanes from bovine pulmonary artery endothelial cells. Studies with lower homologs and calcium antagonist. *Biochim. Biophys. Acta* 751: 99, 1983.
49. Hammersen F., Hammersen E.: Some structural and functional aspects of endothelial cells. *Basic Res. Cardiol.* 80: 491, 1985.
50. Auerbach R., Alby L., Morrisey M., Joseph J.: Expression of organ specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc. Res.* 29: 401, 1985.

51. Cerilli J., Brasile L., Galouzi S., Lempert N., Clarke J.: The vascular endothelial cell antigen system. *Transplantation* 39: 286, 1985.
52. Alby L., Auerbach R.: Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 5739, 1984.
53. Weibel E., Palade G.: New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell. Biol.* 23: 101, 1964.
54. Mukai K., Rosai J.: Factor VIII-related antigen: An endothelial marker. En: *Advances in immunochemistry*, pág. 253, 1984. Editado por L. De Lellis. Year Book Medical Publishers Inc.
55. Miettinen M., Holthofer H., Lehto V., Virtanen J.: Ulex europaeus I Lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 79: 32, 1983.
56. Alles I., Bosslet K.: Immunochemical and immunohistochemical characterization of a new endothelial cell-specific antigen. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 209, 1986.
57. Ausprunk D., Folkman J.: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed vessels during tumor-angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14: 53, 1977.
58. Moscatelli D., Gross J., Rifkin D.: Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 91: 201, 1981.
59. Gross I., Moscatelli D., Rifkin D.: Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 80: 2623, 1983.
60. Nicosia R., T'choo R., Leighton J.: Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res.* 43: 2159, 1983.

61. Folkman J., Haudenschild C.: Angiogenesis "in vitro". Nature 288: 551, 1980.
62. Madri J., Williams S: Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. J. Cell Biol. 97: 153, 1983.
63. Zetter B., Azizkhan R.: Normal and tumor-derived factors that modulate endothelial cell migration and proliferation. En: Plasma and Cellular Modulatory Proteins, pag.59, 1981: Editado por D. Bing. Boston.
64. Sandison J.: A new method for microscopic study of living growing tissues by the introduction of transparent chamber in the rabbits's ear. Anat. Rec. 28: 281, 1924.
65. Clark E., Kirby-Smith H., Rex R., Williams R.: Recent modifications in the method of studying living cells and tissues in transparent chambers inserted in the rabbit's ear. Anat. Rec. 47: 187, 1930.
66. Algire G.: An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. J. Natl. Cancer Inst. 4: 1, 1943.
67. Algire G., Chalkley H.: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6: 73, 1945.
68. Sanders A., Shubik P.: A transparent window for use in the syrian hamster. Israel J. Exp. Med. 11: 118, 1964.
69. Greenblat M., Shubik P.: Tumor angiogenesis. Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J. Natl. Cancer Inst. 41: 111, 1968.
70. Ausprunk D., Knighton D., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois: role of host and preexisting graft blood vessels. Am. J. Pathol. 79: 597, 1975.

71. Auerbach R., Kubai L., Knighton D., Folkman J.: A simple procedure for the long term cultivation of chick embryos. *Dev. Biol.* 41: 391, 1974.
72. Knighton D., Ausprunk D., Tapper D., Folkman J.: Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *Br. J. Cancer* 35: 347, 1977.
73. Vu M., Smith C., Burger P., Klinworth G.: An evaluation of methods to quantitate the chick choriallantoic membrane in angiogenesis. *Lab. Invest.* 53: 499, 1985.
74. Folkman I.: Tumor angiogenesis. En: *Cancer*. Vol. 3, pág. 355, 1975. Editado por F. Becker, Plenum Press, New York.
75. Auerbach R.: Angiogenesis-inducing factors, a review. En: *Lymphokines* pág. 69, Vol.4, 1981. Editado por E. Pick y M. Laudry, Academic Press.
76. Barnhill R., Ryan T.: Biochemical modulation of angiogenesis in the choriallantoic membrane of the chick embryo. *J. Invest. Dermatol.* 81: 485, 1983.
77. Strum J.: Angiogenic responses elicited from choriallantoic membrane vessels by neoplastic, preneoplastic and normal mammary tissues from G.R. mice. *Am. J. Pathol.* 111: 282, 1983.
78. Tsukamoto K., Sugino G.: Tumor angiogenesis activity in clonal cells transformed by bovine adenovirus type 3. *Cancer Res.* 39: 1305, 1979.
79. Castellot I., Karnovsky M., Spiegelman B.: Differentiation dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 5597, 1982.
80. Pliskin M., Ginsberg S., Carp N.: Induction of neovascularization by mitogen-activated spleen cells and their supernatants. *Transplantation* 29: 255, 1980.

81. Glaser B., D'Amore P., Michels R., Patz A., Fenselau A.: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J. Cell. Biol.* 84: 298, 1980.
82. Burgos H.: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 289, 1983.
83. Brown R., Weiss I., Tomkinson I., Phillips P., Kumar S.: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors. *Lancet* 1: 682, 1980.
84. Sariola H., Ekblom P., Lehtonen E., Saxen L.: Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 96: 427, 1983.
85. Luty G., Thompson D., Gallup J., Mello R., Patz A., Fenselau A.: Vitreous an inhibitor of retinal extract induced neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24: 52, 1983.
86. Brem H. Folkman J.: Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141: 427, 1975.
87. Vu M., Burger P., Klinworth G.: Angiogenic activity in injured rat corneas as assayed in the chick chorioallantoic membrane. *Lab. Invest.* 53: 311, 1985.
88. Jakob W., Jentzsch K., Maversberg G., Heder G.: The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. *Exp. Path.* 15: 241, 1978.
89. Einsenstein R., Sorgente N., Soble L., Miller A., Kuettner K.: The resistance of certain tissues to invasion: Penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme. *Am. J. Pathol.* 73: 765, 1973.
90. Gimbrone M., Cotran R., Leapman S., Folkman J.: Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 413, 1974.

91. Chandury T., Lerner M., Nordquist R.: Angiogenesis by human melanoma and breast cancer cells. *Cancer Lett.* 11: 43, 1980.
92. Muthukkaruppan U., Auerbach R.: Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205: 1416, 1976.
93. Fournier G., Luty G., Watt S., Fenselau A., Patz A: A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21: 351, 1981.
94. Langer R., Folkman J.: Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263: 797, 1976.
95. Murray J., Brown L., Langer R., Klagsburn M.: A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro* 19: 743, 1983.
96. Johnson A.: Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells from arteries and cells from veins. *J. Clin. Invest.* 65: 841, 1980.
97. Ryan U., Mortara M., Whitaker C.: Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. *Tiss. Cell* 12: 619, 1980.
98. Zetter B.: Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor-derived factors. *Nature* 285: 41, 1980.
99. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Mobilization of capillary endothelial cells in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 43: 1790, 1983.
100. Ness S., Gerbes A., Gerlach E.: Isolation, identification and continuous culture of coronary endothelial cells from ginea pig hearts. *Eur. J. Cell. Biol.* 24: 287, 1981.

101. Rosen E., Mueller S., Noveral J. Levine E.: Proliferative characteristics of clonal endothelial cells strains. *J. Cell. Physiol.* 107: 123, 1981.
102. Bowman P., Betz A., Ar D., Wolinsky J., Penney J., Shivers R., Goldstein G.: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 17: 353, 1981.
103. Davison P., Beusch K., Karasek M.: Isolation and long term cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In Vitro* 19: 937, 1983.
104. Folkman J., Haudenschild C., Zetter B.: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 5217, 1979.
105. Olander J., Marasa J., Kimes R., Jhonston G., Feder J.: An assay measuring the stimulation of several types of bovine endothelial cells by growth factor(s) derived from cultured human tumor cells. *In Vitro* 18: 99, 1982.
106. Auerbach R., Sidky Y.: Nature of the stimulus leading to lymphocyte-induced angiogenesis. *J. Immunol.* 123: 751, 1979.
107. Davel L. Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Angiogenesis induction by lymphocytes from tumor-bearing mice in a syngeneic combination. *Transplantation* 37: 327, 1984.

CAPITULO II

MODULADORES DE LA ANGIOGENESIS

<u>INDICE</u>	Pág.
1. Inductores de la actividad angiogénica.	46
1.1. Factores de crecimiento.	46
1.1.1. Características generales.	46
1.1.2. Factores de crecimiento fibroblás- tico: una familia de mitógenos pa- ra células endoteliales con afini- dad por la heparina.	48
1.1.2.1. Factores de crecimiento fibroblástico.	50
1.1.2.2. Factores de crecimiento aislados desde tejidos del ojo.	53
1.1.2.3. Factores de crecimiento de células endoteliales.	54
1.1.2.4. Factores de crecimiento aislados desde cartílago.	55
1.1.3. Factor de crecimiento epidérmico.	55
1.1.4. Factores de crecimiento transfor- mantes.	56
1.1.4.1. TGF alfa	57
1.1.4.2. TGF beta	57
1.1.5. Factor de crecimiento aislado desde plaquetas.	58
1.1.6. Factor necrótico tumoral.	59
1.1.7. Factor angiogénico tumoral y fac- tor estimulante de las células endoteliales.	61
1.1.8. Angiogenina.	62

1.1.9. Otros factores de crecimiento con actividad angiogénica.	62
1.2. El ácido hialurónico y sus productos de degradación modulan la angiogénesis.	64
1.3. Activador de plasminógeno.	65
1.4. Prostaglandinas.	66
1.5. Rol del cobre en la angiogénesis.	66
1.6. Fibronectina.	67
1.7. Fibrina.	68
2. Inhibidores de la angiogénesis.	69
2.1. Inhibidores angiostáticos.	69
2.2. Factor de crecimiento transformante-beta.	71
2.3. Interferón.	72
3. Bibliografía.	73

1. Inductores de la actividad angiogénica

Si bien en un principio se pensó que la angiogénesis era resultado de la acción de un factor soluble sobre un tipo celular específico (endotelio), hoy se sabe que en la iniciación del proceso de neovascularización intervienen múltiples factores que actúan en diferentes niveles y desencadenan la proliferación de los vasos sanguíneos.

En este capítulo haremos mención de los factores mejor estudiados, dejando en claro que día tras día se amplía el conocimiento de este complejo mecanismo.

1.1. Factores de crecimiento

1.1.1. Características Generales

La regulación del crecimiento celular es un proceso complejo, que requiere la acción coordinada de diferentes factores, tales como hormonas, elementos del sistema nervioso central, contacto directo intercelular, etc. En todos los casos la transferencia de información hacia la célula está mediada por mensajeros químicos (1).

Entre los agentes que funcionan como mensajeros se destacan los factores estimulantes del crecimiento (growth factors, GF) liberados por diferentes tipos celulares y transportados hacia su destino por diversas rutas, desde la difusión local hasta la vía sistémica.

En general estos factores polipeptídicos inducen tanto respuestas hipertróficas como hiperplásicas en los tejidos "blanco". En su mayoría son mitógenos potentes y estimulan la síntesis de ADN en concentraciones del orden de nanogramos.

Según el momento del ciclo celular en el que actúan han sido agrupados en dos categorías:

- 1- factores que actúan sobre células quiescentes (G_0) y las estimulan a entrar en un estado de competencia.

2- factores que actúan sobre células competentes (G1) para que entren en fase S del ciclo celular y luego en mitosis (2).

Algunos de estos factores cumplen también un rol en la diferenciación celular. La mayor parte ejerce además otras funciones no inherentes a la estimulación del crecimiento celular, actuando como factores de regulación en el organismo adulto. Por ejemplo, los anticuerpos anti-factor de crecimiento nervioso pueden producir atrofia de neuronas de los sistemas sensorial y simpático (3).

Mientras algunos GF actúan sobre células específicas, otros lo hacen sobre un amplio espectro de tipos celulares.

Las células tumorales también son capaces de producir y secretar GF, cuya función se relaciona directamente con la capacidad de las mismas de crecer en forma autónoma.

Aunque los GF son semejantes a las hormonas por su mecanismo de acción, raramente se los ha clasificado como tales. Esencialmente transfieren información desde el exterior hacia el interior de la célula. Se podría definir a los GF como hormonas secundarias, ya que se caracterizan por producir una respuesta temprana seguida por efectos de larga duración, evidentes aún cuando ya no se puede demostrar la interacción ligando-receptor.

Los GF se unen a receptores de la superficie de las células blanco, esta unión es altamente específica y selectiva. Después de la formación del complejo ligando-receptor se estimula el metabolismo anabólico, activándose algunas funciones celulares tales como el transporte de glucosa y aminoácidos. Es probable que estos efectos estén regulados directamente por la interacción con el receptor (4). Por otra parte los factores de crecimiento actúan regulando otras funciones celulares a través de la producción de nucleótidos cíclicos y de la alteración en los niveles intracelulares de Ca^{++} (5).

Los complejos ligando-receptor se agrupan en áreas especializadas de la superficie celular que consisten en pequeñas depresiones recubiertas por clatrina, una proteína vinculada funcionalmente con el citoesqueleto, que forma

celdillas pentagonales y hexagonales alrededor de la excavación. El complejo es endocitado incorporándose a vesículas no recubiertas por clatrina, llamadas receptosomas; estos receptosomas transportan al complejo ligando-receptor y los transfieren a los lisosomas. Este proceso se conoce como endocitosis mediado por receptor y es empleado por una gran variedad de macromoléculas que penetran en la célula: lipoproteínas de baja densidad implicadas en el transporte de colesterol, transferrina, anticuerpos, etc. El receptor puede ser reutilizado o degradado; en este último caso es necesaria la síntesis de nuevos receptores para que ocupen la superficie celular.

La internalización del complejo ligando-receptor juega funciones importantes en la acción de los GF, ya sea a través de la interacción con receptores intracelulares, del procesamiento del factor o del receptor para generar un segundo mensajero, de la acción directa del receptor con organoides intracelulares o de la regulación de la sensibilidad de la célula a la acción de GF por una disminución del número de receptores en la membrana.

En conclusión los GF, al igual que las hormonas, desencadenan eventos en la superficie celular y requieren su incorporación y unión a estructuras intracelulares para ejercer una acción completa (6).

1.1.2. Factores de crecimiento fibroblástico: una familia de mitógenos para células endoteliales con afinidad por la heparina.

La estrategia seguida en la purificación de factores angiogénicos fue la de aislar GF con actividad sobre la movilidad y la proliferación de las células endoteliales in vitro, basándose en la idea de que aquellos factores que estimularan estas funciones celulares debían ser angiogénicos in vivo.

Un gran avance en la purificación de factores angiogénicos se produjo al demostrar que muchos poseen una marcada afinidad por la heparina, lo que permitió el empleo de columnas de afinidad para purificarlos (7).

El análisis de los distintos mitógenos para células endoteliales mediante el estudio de los perfiles de elución desde columnas de afinidad con heparina, secuenciación de aminoácidos, reacciones inmunológicas y unión a receptores celulares específicos, clarificó la interrelación entre estos GF. Ahora se sabe que no existen tantos factores diferentes como se había pensado en un primer momento; de hecho muchos pueden ser incluidos dentro de 2 clases, aquellos relacionados estructuralmente con el FGF ácido (FGFa) y los que están relacionados con el FGF básico (FGFb). Dentro de cada una de estas dos clases, los GF son idénticos o bien representan variaciones de un mismo polipéptido, que se diferencian en su PM (8-9).

La clase de los FGFa está constituida por polipéptidos aniónicos que eluyen de columnas de afinidad de Sefarosa-heparina con 1M ClNa; tienen un pI entre 5 y 7 y su PM es de 15 a 19 kDa. Se los aísla desde tejido neural e incluyen: ECGF aislado de hipotálamo, GF aislado de ojo tipo II, GF aislado de retina, GF aislado de astroglía tipo I y GF aislado de médula (10-12).

La otra clase de mitógenos con afinidad por la heparina incluye polipéptidos catiónicos que eluyen desde las columnas de afinidad con 1.5M ClNa, tienen un pI entre 8 y 10 y un PM entre 16 y 19 kDa. Son polipéptidos similares al FGFb que presentan diferencias en cuanto a su PM. Se distribuyen en forma muy amplia entre distintos tipos celulares, habiéndose logrado aislarlos desde cerebro, pituitaria, hipotálamo, ojo, cartílago, riñón, placenta, cuerpo lúteo, macrófagos, células endoteliales y algunas células tumorales (13-16).

Las células endoteliales poseen numerosos sitios de unión para la heparina distribuidos en la superficie de la membrana celular. La afinidad existente entre los GF con actividad angiogénica y la heparina favorece entonces la concentración de estos factores alrededor de la célula endotelial.

1.1.2.1. Factores de crecimiento fibroblástico.

La actividad de los factores de crecimiento fibroblástico (fibroblast growth factors, FGF) se conoce desde 1940, cuando se demostró que los homogenatos crudos de cerebro contienen sustancias capaces de estimular el crecimiento de fibroblastos en cultivo. Desde estos extractos se identificaron los dos tipos de FGF: ácido (FGFa) y básico (FGFb); se trata de dos proteínas fuertemente relacionadas, que poseen un rango similar de actividades biológicas; difieren sin embargo en algunas propiedades físicas y químicas y en su distribución en los tejidos (17-19).

La actividad de los FGFs se identificó en base a la inducción de la síntesis de DNA en células BALB/c 3T3, en presencia de bajas concentraciones de suero. Los FGFs son mitogénicos in vitro para un rango amplio de células de origen mesodérmico; los tipos celulares sensibles a la acción de los FGFs incluyen fibroblastos, músculo liso vascular, osteoblastos, condrocitos y células endoteliales. Además son quimiotácticos y poseen actividad neurotrópica in vitro; son angiogénicos in vivo ya que estimulan la proliferación de nuevos capilares en córnea de conejo y en MCA (20).

FGFa: tiene capacidad angiogénica in vivo, esta actividad aumenta en un 400% cuando se adiciona heparina. Al estudiar la capacidad del FGFa para actuar en la reparación de las heridas, se observa que este factor acelera en forma significativa la velocidad de cicatrización.

FGFb: como se explicó en el capítulo precedente, durante el proceso angiogénico, las células endoteliales son estimuladas a migrar y proliferar, formando así una nueva red de capilares; esta actividad se correlaciona con tres respuestas de las células endoteliales en cultivo, frente a la acción de factores angiogénicos: estimulación de la producción de proteasas (colagenasa y activador de plasminógeno) aumento en la quimiotaxis y en la velocidad de proliferación. (21-31)

Se identificaron dos tipos de sitios de unión celular para el FGFb: uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (27).

La unión del FGFb al sitio de alta afinidad es sensible a variaciones de pH, lo que indica que este sitio corresponde al receptor celular para el FGFb.

La heparina compite con el FGFb por la unión al sitio de baja afinidad, pero no compite por la unión al sitio de alta afinidad. El heparán sulfato compite aproximadamente unas 30 veces más que la heparina por la unión al sitio de baja afinidad, mientras que el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y el queratán sulfato no tienen efecto en la unión al sitio de baja afinidad. Todo esto sugiere que la unión al sitio de baja afinidad representa la unión a moléculas tipo heparina asociadas con la célula. La unión del FGFb a los sitios de baja afinidad actúa como reservorio de FGFb alrededor de la célula.

Tanto el sitio de unión de alta afinidad como el de baja afinidad están presentes en una gran variedad de tipos celulares: fibroblastos, células endoteliales, sarcoma, melanoma, etc.

Aunque el FGFb parece ser entre 30 y 100 veces más activo que el FGFa, ésta diferencia puede deberse a una inactivación parcial del FGFa durante el proceso de purificación. En presencia de heparina, que estabiliza la conformación del FGFa y disminuye el Kd aparente de unión a su receptor, la actividad del mitógeno aumenta entre 3 y 100 veces. La heparina tiene poco o ningún efecto sobre la actividad del FGFb; por lo tanto, en presencia de heparina ambos FGFs son mitógenos igualmente activos.

Se sabe muy poco acerca de la actividad normal de los FGFs; dado que actúan sobre un rango muy amplio de células en cultivo, se puede pensar que la actividad de inducir angiogénesis no es la única función que cumplen in vivo. En condiciones normales podrían actuar como GF con un espectro amplio de acción, estimulando y coordinando la multiplicación de varios tipos celulares (28).

Los FGFs, e incluso los mitógenos con ellos relacionados, podrían estar involucrados en varias patologías proliferativas. Si uno de los FGF o un oncogen equivalente de estos mitógenos se expresara en forma anormal en células transformadas, podría inducir la

hiperplasia observada a menudo en los tejidos normales que rodean al tumor, la estimulación autócrina del crecimiento tumoral y la angiogénesis.

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de los FGFs permitió clonar el gen del FGFa y el gen del FGFb. El estudio del gen del FGFb demostró la presencia de codones para 155 aminoácidos que codifican para la cadena polipeptídica de 146 aminoácidos más una extensión amino-terminal de 9 codones; la secuencia que sigue al codón de iniciación es muy rica en G-C, lo que indicaría que corresponde a una zona no codificante. Otra evidencia que apoya la idea de que el producto de translación primaria del FGF contiene 155 aminoácidos proviene de la comparación con las secuencias amino-terminales del FGFa bovino, el cual tiene una extensión amino-terminal de 15 codones, y un producto de translación primario de 155 aminoácidos. Las extensiones amino-terminales de los 2 factores son altamente homólogas, aunque las secuencias de las regiones no transcritas divergen completamente. La estructura de los genes para FGFa y FGFb es similar, con dos intrones localizados en posiciones idénticas. El gen para FGFa está en el cromosoma humano 5 y el gen para FGFb está en el cromosoma 4 (29-31).

Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de los FGFs a y b, se observa que existe un 55% de identidad entre ambas. Por otro lado, se detecta una identidad menor entre los FGFs y la interleuquina 1 (IL-1), observándose que las regiones homólogas corresponden a los sitios activos y que la estructura tridimensional es la misma para los dos polipéptidos. Aunque la IL-1 tiene actividad mitogénica sobre fibroblastos, los FGFs no poseen actividad mitogénica sobre timocitos. Los FGFs y las ILs constituyen así un conjunto de GF homólogos, que posiblemente se originaron por divergencia desde una proteína ancestral común (32).

Los FGF a y b interactúan con receptores asociados con la membrana celular, por lo tanto se esperaría que estos factores fueran proteínas secretadas al medio extracelular; sin embargo, el estudio de las secuencias amino-terminales no mostró la existencia de un péptido señal. El mecanismo por el cual los FGFs dejan la célula en la que fueron sintetizados es aún desconocido; los posibles mecanismos de liberación incluyen lisis celular o

transporte a lo largo de la membrana en asociación con un componente de la matriz extracelular, tal como heparán sulfato.

Debe definirse aún si los FGFs forman algún tipo de complejo intra o extracelular con el heparán sulfato y si permanecen asociados con fragmentos de heparán sulfato después de ser liberados desde la MEC. La liberación de FGFs asociados con el heparán sulfato, mediante tratamiento con heparinasa, indica que la actividad heparinasa hallada en ciertas células tumorales e inflamatorias podría estar involucrada en la angiogénesis.

1.1.2.2. Factores de crecimiento aislados desde tejidos del ojo

Los estudios sobre el control del crecimiento y diferenciación del cristalino embrionario y adulto, demostraron que la retina bovina contiene un potente GF, capaz de estimular la proliferación de las células epiteliales del cristalino in vitro (33).

Posteriormente se comprobó la presencia de factores mitogénicos similares en otros tejidos del ojo, tales como iris o humor vítreo; debido a su amplia distribución, estos factores fueron denominados GF derivados del ojo, (Eye derived growth factors, EDGF) (34). Se han identificado dos tipos de EDGF: tipo I, análogo al FGFb y tipo II, análogo al FGFa (35).

Los EDGFs estimulan la proliferación de varios tipos celulares in vitro, entre los cuales se encuentran las células endoteliales. Por otro lado las experiencias realizadas in vivo demostraron que son angiogénicos en córnea de conejo. Por lo tanto los EDGF podrían jugar varios roles en la fisiología y patología oculares, involucrándolos en funciones tan variadas como control del desarrollo del cristalino, reparación de daños en la córnea o neovascularización de la retina; en este último proceso también intervendría el GF derivado de retina (RDGF) (36-38).

Tanto el EDGFI como el II se unen a todas las membranas basales del ojo, incluyendo la membrana basal de los vasos sanguíneos. Esta unión sólo puede ser desplazada

cuando se adiciona un exceso de EDGF o bien cuando se realiza un tratamiento enzimático con heparinasa. Se propuso que la interacción entre la membrana basal y el EDGF controlaría el movimiento y la actividad de este GF durante el desarrollo y en los procesos patológicos. La naturaleza de esta interacción está relacionada con alta afinidad del EDGF por la heparina, habiéndose demostrado que la heparina es capaz de estimular o inhibir la actividad mitogénica del EDGFII, en función de la presencia o no de suero bovino en el medio de cultivo (39). Así, la unión de los GF a la membrana basal está mediada por heparina o por compuestos similares que regulan positiva o negativamente la actividad mitogénica del EDGF.

Aunque los roles específicos aún no fueron establecidos con exactitud, se piensa que los EDGF tienen una función importante en la regulación de la fisiología normal de la retina; la actividad angiogénica encontrada en extractos de retina se libera como resultado de la disrupción de la organización normal del tejido, debido a una injuria o a una situación patológica.

1.1.2.3. Factor de crecimiento de células endoteliales.

El factor de crecimiento de células endoteliales (endothelial cell growth factor), aislado desde tejido neural, se separa en dos componentes de acuerdo al tiempo de retención en cromatografía líquida en fase reversa de alta presión (RP-HPLC): tipo alfa (ECGF- α) y tipo beta (ECGF- β).

La secuenciación de aminoácidos demostró que el ECGF- β es el polipéptido precursor del ECGF- α y además su estructura es homóloga en un 55% a la del FGFb y homóloga en un 30% a la IL-1. La comparación de las secuencias del ECGF- β y del FGFa demostró que el FGFa es la forma des 1-14 del ECGF- β , sugiriendo que ambos GF son producto de las condiciones de extracción empleados durante el proceso de purificación (41).

La unión del ECGF- α a células endoteliales y fibroblásticas demostró que éstas poseen receptores específicos en su superficie. El polipéptido receptor tiene un PM de 150 kDa; la unión del ligando dispara una señal mitogénica a través de la activación de una tirosina

kinasa que fosforila un polipéptido de PM 150 kDa; involucrado en la transducción de la señal iniciada por el ECGF (42-43).

La heparina no sólo tiene afinidad por el ECGF, sino que también modula sus actividades biológicas, al potenciar la actividad mitogénica y la actividad quimiotáctica sobre células endoteliales (44-46).

1.1.2.4. Factores de crecimiento aislados de cartílago

El factor de crecimiento aislado de cartílago (cartilage derived growth factor, CDGF) es un polipéptido de 19 kDa que estimula la proliferación de células endoteliales y BALB/c 3T3 in vitro y tiene además actividad quimioattractante sobre células mononucleares y fibroblásticas (47).

El factor de crecimiento aislado de condrosarcoma (chondrosarcoma derived growth factor, ChDGF) es similar al CDGF tanto en su estructura como en su actividad; su PM es de 18 kDa y es angiogénico in vivo.

La rápida estimulación de la angiogénesis por estos factores se debe al aumento en la velocidad de proliferación y de migración de las células endoteliales (48).

1.1.3. Factor de crecimiento epidérmico

El factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF), fue descrito en 1962 como un polipéptido capaz de estimular la apertura precoz de los párpados y la erupción de los dientes en ratones recién nacidos; años más tarde se reconoció su capacidad de estimular el crecimiento de varios tipos celulares en cultivo.

Aunque originalmente se lo aisló desde glándula submaxilar de ratón y desde orina humana, los estudios de hibridización in situ demostraron que el RNA complementario del EGF probe (lazo) clonado, está presente en una gran variedad de tejidos (49).

Este GF está constituido por 35 aminoácidos que forman una cadena polipeptídica simple, con tres puentes disulfuro internos (50,51).

El receptor para EGF se encuentra en varios tipos celulares; es una proteína integral de membrana de 170 kDa con un dominio intracelular con función tirosina-quinasa. En respuesta a la unión con el EGF el receptor es capaz de autofosforilarse en los residuos de tirosina. El oncogen v-erb B codifica para un producto homólogo al receptor para EGF pero que carece de dominio extracelular; ésta delección llevaría a una activación constitutiva del receptor, sin necesidad de que se produzca la unión con el ligando (52-54).

El EGF tiene actividad mitogénica en células mesenquimáticas y epitelioideas; esta actividad está potenciada fuertemente por la insulina. El tratamiento con EGF favorece la diferenciación celular tanto in vivo como in vitro (55-58).

1.1.4. Factores de crecimiento transformantes

Los factores de crecimiento transformantes (transforming growth factors, TGFs) son polipéptidos con capacidad de conferir un fenotipo transformado a células normales. Esta definición llevó al aislamiento de entidades moleculares que difieren en su composición, en el tipo de receptor al que se unen y en la respuesta biológica que inducen (59).

Aunque los TGFs más estudiados son los TGF alfa (TGF- α) y TGF beta (TGF- β), se han descrito otros factores transformantes, tales como el TGF-2 que estimula el crecimiento en agar blando de células BALB/c 3T3 y el factor aislado desde tejido epitelial, que estimula el crecimiento en agar blando de una línea de carcinoma humano y posiblemente actúe como un regulador autócrino (60, 61).

1.1.4.1. TGF-alfa

Se sintetiza en tejidos embrionarios durante el desarrollo temprano, en células transformadas por virus y en gran variedad de células tumorales. Juega un rol importante en la patogenia neoplásica a través de un mecanismo regulatorio autócrino (62, 63).

Las secuencias de aminoácidos del TGF- α y del EGF poseen un 53% de homología, con una notable conservación de los seis residuos de cisteína. La capacidad de ambos factores de unirse a un mismo receptor se debería a la similitud en la conformación de los puentes disulfuro (64-66). El EGF es la forma adulta del TGF- α embrionario y las moléculas tipo-EGF aisladas desde distintas líneas son en realidad TGF- α . Ambos GF parecen ser mitógenos igualmente potentes para células endoteliales in vitro. Sin embargo, cuando se compara la actividad angiogénica in vivo, se demuestra que el TGF induce angiogénesis a dosis menores (0,3-1,0 mg) que el EGF (10 mg). Esta discrepancia en los resultados puede explicarse suponiendo que el TGF actúa en forma cooperativa con otros factores en la inducción de la respuesta angiogénica (67-69).

1.1.4.2. TGF-beta

Se lo aisló desde distintos tejidos: riñón, placenta, y células transformadas por virus (70-73). Aunque en un primer momento se lo purificó en base a su capacidad de inducir transformación, se sabe ahora que puede activar distintas funciones biológicas en un amplio espectro de tipos celulares (74-75).

La secuencia de aminoácidos del TGF- β corresponde a un dímero cuyas cadenas, de 112 aminoácidos, están unidas por dos puentes disulfuro (76).

El gen para TGF- β se transcribe en 2 RNAm de 2.5 kb que están presentes tanto en células normales como en células transformadas (77-79). Por otro lado se demostró que un gran número de células en cultivo producen TGF- β y contienen receptores celulares específicos para este GF, aunque no exhiban un fenotipo transformado; esto se

explica en parte por que el TGF- β liberado al medio extracelular por las células en cultivo, se encuentra en una forma inactiva de mayor PM (80-81).

El TGF- β es mitogénico para una gran variedad de células fibroblásticas en cultivo y en algunas este efecto se produce a través de una interacción con el GF derivado de plaquetas (platelet derived growth factor, PDGF) (83, 84).

La adición exógena de TGF- β mediante inyecciones s.c. provoca la formación de tejido de granulación; esta respuesta es similar a la que se produce durante el proceso de reparación y ocurre entre los 2 y 3 días de inoculado el factor (85).

Cuando se implanta TGF- β en la córnea de conejos, se observa el desarrollo de vasos sanguíneos, pero una característica diferencial de este factor es la aparición de una zona de opacidad alrededor del implanto. El examen histológico muestra engrosamiento del estroma, deposición de colágeno y aparición de infiltrados mononucleares.

In vitro, sin embargo, el TGF- β inhibe el crecimiento de células endoteliales y antagoniza con el FGF en su capacidad mitogénica sobre células de endotelio de aorta y de capilares (87).

La ausencia de una estimulación directa de las células endoteliales in vitro, junto con la actividad quimiotáctica para monocitos y con la capacidad de estimularlos a que secreten factores mitogénicos, sugiere que la actividad angiogénica del TGF- β está mediada a través de la activación del sistema monocito-macrófago.

1.1.5. Factor de crecimiento aislado desde plaquetas

Generalmente los GF difunden en el medio circundante a través de los espacios intercelulares y actúan en forma local. El plasma contiene pocos GF y aquellos que se encuentran en el suero derivan de las plaquetas y se liberan durante la coagulación. La presencia de GF en las plaquetas facilita su liberación hacia la zona en donde se produjo una injuria tisular (88-89). El factor de crecimiento derivado de plaquetas, (PDGF) es el mitógeno más importante de los que se

encuentran en el suero; posee además actividad quimiotáctica sobre fibroblastos y células de músculo liso (90). Aunque originalmente se lo aisló desde plaquetas, en donde se almacena en los gránulos alfa, también se demostró su síntesis en células endoteliales de grandes vasos y en células de músculo liso de aorta (91-93).

Es un dímero compuesto por una cadena A de 14 a 18 kDa unido por puentes disulfuro con una cadena B de 16 kDa.

La cadena B (o PDGF-2) es codificada por el protooncogen c-sis cuyo transcripto celular aparece como un RNAm de 4.2 kb. Parte del locus genómico c-sis fue clonado, demostrando la existencia de 7 exones en el cromosoma 22, que comprenden 23 kb de DNA.

Los receptores para PDGF se encuentran en una gran variedad de células mesenquimáticas y en las células del trofoblasto. Su estimulación a través de la unión con el ligando induce la autofosforilación de una proteína de 185 kDa (94-96).

La producción de PDGF por parte de las células endoteliales puede ser modulada por varios factores exógenos. Ciertos productos que dañan el endotelio, tales como dosis letales de endotoxina bacteriana y ésteres de forbol, estimulan la síntesis de PDGF (97). La incubación de células endoteliales con concentraciones fisiológicas de alfa-trombina, una proteasa que está presente generalmente en los sitios de inflamación, produce una estimulación de la síntesis de PDGF en 24 hs. Por otro lado, la organización de las células endoteliales en estructuras tubulares está acompañada por una disminución en la expresión del RNAm de cadena B del PDGF. La composición del sustrato también puede influenciar la producción de PDGF, el colágeno tipo I disminuye la síntesis de este GF cuando se lo compara con sustratos de fibronectina o plástico (98).

1.1.6. Factor necrótico tumoral

La estimulación de leucocitos con mitógenos induce la secreción de proteínas inmunomoduladoras, llamadas citoquinas: IL-2, IFN y otros varios factores entre los que se encuentra el factor necrótico tumoral (tumor

necrosis factor, TNF). Este factor fue identificado originalmente en el suero de ratones tratados con Mycobacterium bovis (cepa Bacillus Calmette-Guerin) y endotoxina, por su actividad de inducir necrosis hemorrágica en sarcomas e inhibición del crecimiento de células tumorales in vivo e in vitro (99).

Los leucocitos producen al menos dos tipos de factores citotóxicos; los macrófagos activados liberan TNF-alfa (TNF- α) mientras que los linfocitos liberan TNF-beta (TNF- β).

Los genes que codifican para ambos factores fueron aislados y clonados; las proteínas correspondientes se clonaron desde Escherichia Coli determinándose que las secuencias tienen un 50% de homología (100).

In vivo, el TNF- α induce la formación de capilares a muy bajas dosis. In vitro estimula la quimiotaxis de las células de endotelio capilar y la formación de estructuras tubulares cuando se las siembra sobre un substrato de colágeno tipo I.

En el proceso inflamatorio, el TNF- α promueve la reparación al estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos; en los tumores actuaría en dos niveles diferentes: por un lado favoreciendo el crecimiento neoplásico a través de la activación del proceso angiogénico, mientras que por el otro lado participaría en la destrucción celular a través de un efecto citotóxico sobre las células neoplásicas.

La respuesta vascular desencadenada por el TNF- α está acompañada por la aparición de inflamación cuando se ensayan dosis altas; sin embargo a dosis menores la respuesta es sólo angiogénica, sin infiltración leucocitaria.

El TNF tiene varios efectos sobre las células endoteliales: induce la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, promueve la actividad procoagulante y, la síntesis de IL-1 y aumenta la adhesión a leucocitos polimorfonucleares (101, 102).

1.1.7. Factor angiogénico tumoral y factor estimulante de las células endoteliales.

Los tumores sólidos tienen la capacidad de favorecer el desarrollo de una red vascular desde los tejidos circundantes, gracias a la liberación de factores solubles con actividad angiogénica (103).

En 1971 Folkman demostró que los extractos tumorales solubles son capaces de inducir la proliferación capilar. Desde estos extractos aisló el factor angiogénico tumoral (tumor angiogenic factor, TAF), un compuesto de alto PM (90-100 kDa), cuya naturaleza es aún poco conocida (104).

El empleo de un anticuerpo anti-TAF permitió demostrar que los factores angiogénicos aislados a partir de extractos y sobrenadantes de cultivo de tumores murinos y humanos poseen determinantes antigénicos comunes (105, 106).

Este anticuerpo sirvió además para desarrollar dos ensayos cuantitativos de la actividad angiogénica en extractos tumorales: radioinmunoensayo (RIA) y ensayo radioinmunométrico (RIMA). Con el empleo de estas dos técnicas se encontró una correlación directa entre la capacidad de un tumor de inducir angiogénesis in vivo y el grado de unión al antisuero detectado in vitro (107).

La preparación de columnas de afinidad con anticuerpo anti-TAF sirvió para demostrar que la fracción activa del TAF corresponde a una molécula de bajo PM (200 - 300 Da), capaz de producir neovascularización en MCA y proliferación de células de endotelio capilar cuando se las cultiva sobre un substrato de colágeno (108).

Este factor angiogénico de bajo PM fue aislado también desde fuentes no tumorales, tales como retina y fluido sinovial (109, 110); por esta razón y para diferenciarlo del TAF, se lo denominó factor angiogénico estimulante de las células endoteliales (endothelial cell stimulating angiogenesis factor, ESAF). El ESAF es capaz de activar la procolagenasa presente en el medio condicionado de fibroblastos de piel, promoviendo la degradación de colágeno tipo I y en menor medida, del colágeno tipo III (111-112).

1.1.8. Angiogenina

La angiogenina fue la primera proteína angiogénica aislada desde células tumorales humanas. Se la obtuvo desde el sobrenadante de cultivo de una línea establecida de adenocarcinoma mamario (HT-29). Su actividad biológica fue monitoreada a lo largo del proceso de purificación con el ensayo de MCA, siendo suficientes 0,5 mg de angiogenina para desencadenar una respuesta neovascular (113).

Los estudios de secuenciación demostraron que la angiogenina está constituida por una sola cadena proteica de 123 aminoácidos con 3 puentes disulfuro. Su PM aproximado es de 14 kDa y su pI es 9.5; esta secuencia es homóloga en un 35% con la ribonucleasa pancreática; la similitud es más importante alrededor del sitio activo de la enzima. Trabajos posteriores confirmaron la actividad ribonucleasa de la angiogenina (114, 115).

Desde una biblioteca de ADNc preparada con poli-ARNm de hígado humano, se aislaron los ADNc codificantes de la angiogenina. Se demostró una secuencia 5' no codificante, seguida por una secuencia para un péptido señal de 22 aminoácidos y por 369 nucleótidos que codifican la proteína madura; a continuación se encuentra el codón de terminación y luego una secuencia no codificante de 173 nucleótidos y una cola de poli-A. El gen de la angiogenina está libre de intrones y contiene un TATA box en el extremo 5', además de dos secuencias repetitivas Alu flanqueando los dos extremos 5' y 3'. Una tercera secuencia Alu se encuentra a una distancia aproximada de 500 nucleótidos de la secuencia Alu del extremo terminal 3' (116).

1.1.9. Otros factores de crecimiento con actividad angiogénica.

Se han aislado factores angiogénicos desde distintos tejidos normales, de los cuales mencionaremos aquí solo los más interesantes, sin pretender abarcar totalmente la extensa bibliografía existente.

Las glándulas submaxilares y parotídeas normales contienen varios GF: EGF, factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF), factor estimulante del mesénquima, factor de diferenciación muscular, etc. Desde estas glándulas se aisló además un factor con capacidad angiogénica en MCA, con un PM aproximado de 80 kDa, que provoca alargamiento del lecho vascular, con capilares delgados y células endoteliales moderadamente hipertróficas (117).

El trasplante de mesenterio en la superficie del cerebro induce el desarrollo de numerosas conexiones vasculares entre ambos tejidos. En los extractos tisulares se detectó un factor lipídico con actividad angiogénica en córnea de conejo (118).

Las células BALB/c-3T3 inducen proliferación de células endoteliales in vitro. La purificación del factor responsable de esta actividad permitió caracterizar una molécula de PM aproximada a 120 kDa, de naturaleza proteica y resistente a la inactivación con B-mercaptoetanol, lo que la diferencia del FGF (118).

Por otro lado la línea celular BALB/c-3T3 F442A, que sufre diferenciación adiposa in vitro, libera un factor angiogénico capaz de estimular la proliferación endotelial in vitro. Este mitógeno no es sensible al tratamiento con proteasas y atraviesa los filtros con un corte de PM de 10 kDa; su actividad no es eliminada por calentamiento a 60°C durante 30' o a 90°C durante 5' (120).

Los cambios en la vascularización del ovario son rápidos y profundos. En el cuerpo lúteo tiene lugar un proceso de neovascularización notable y los datos morfológicos sugieren que también se produce neovascularización en el folículo ovárico no luteal en desarrollo. Los extractos de folículo entero, o de la teca (pared folicular), poseen capacidad mitogénica y quimiocinética sobre células endoteliales in vitro, además de promover angiogénesis in vivo. La caracterización bioquímica del factor responsable de estas actividades revela la presencia de un polipéptido catiónico sensible al tratamiento con calor y estable a la acción de agentes reductores, soluble en 40% de sulfato de amonio (121).

Por otra parte el fluido folicular posee actividad angiogénica in vivo y capacidad quimiocinética y mitogénica sobre células endoteliales in vitro. Las fracciones activas se encuentran en dos en dos rangos de PM: entre 40 y 60 kDa y en la fracción menor a 1,5 kDa, lo que sugiere que la molécula activa podría ser una especie de bajo PM ligado a una molécula transportadora de mayor PM. Durante la fase folicular del ciclo menstrual generalmente un solo folículo madura y ovula en respuesta al aumento de gonadotrofinas. Este folículo tiene una densidad de vasos muy superior a la del resto de los folículos del ovario; el aumento en la vascularización perifolicular favorece la llegada de gonadotrofinas, lo que resulta en la selección y mantenimiento del folículo dominante (122).

Desde la placenta y la membrana amniótica se aislaron factores mitogénicos con características similares al EGF y al FGF, además de otros GF activos sobre distintos tipos celulares. Entre ellos un factor con actividad angiogénica de bajo PM, capaz de inducir neovascularización in vivo y migración de células endoteliales in vitro (123).

1.2. El ácido hialurónico y sus productos de degradación modulan la angiogénesis

La MEC influencia la geometría, el metabolismo y la expresión génica a través de receptores de transmembrana y del citoesqueleto. El ácido hialurónico (HA) es el componente principal de la MEC; es un GAG de alto PM, con carga negativa constituido por unidades repetitivas del disacárido N-acetil-glucosamina y glucuronato. Se diferencia de otros GAGs en que no está sulfatado ni unido covalentemente a una proteína.

El HA tiene un rol importante en la embriogénesis, en la regeneración tisular y en numerosos estados patológicos. Por ejemplo durante la diferenciación que tiene lugar en la embriogénesis y en la reparación tisular, los niveles de HA son inicialmente altos y luego disminuyen rápidamente en respuesta al aumento en la actividad de HAasa. Además, el tamaño de los fragmentos de HA puede variar en el curso de la embriogénesis.

Por otra parte el HA y sus productos de degradación tienen notables efectos sobre las células endoteliales tanto in vivo como in vitro. Los pacientes con cáncer, psoriasis y artritis reumatoidea poseen niveles elevados de HA en suero y los fibroblastos sinoviales activados de estos últimos sintetizan mayores cantidades de HA de bajo PM que el producido por células normales.

Los fragmentos de HA de 4 a 16 disacáridos inducen angiogénesis in vivo y estimulan la proliferación y la migración de células endoteliales in vitro, mientras que una elevada concentración de HA nativo inhibe la proliferación de células endoteliales. Se demostró que los fragmentos de HA se unen a las células endoteliales y aumentan la fluidez de la membrana celular (124).

El desarrollo vascular está entonces asociado con un aumento en la actividad hialuronidasa y una disminución en la concentración de ácido hialurónico.

1.3. Activador de plasminógeno

El activador de plasminógeno (plasminogen activator, PA) es una serina proteasa que cataliza la síntesis de plasmina desde el plasminógeno (precursor inactivo). Por su parte la plasmina convierte la procollagenasa (inactiva) en collagenasa (activa). El PA está involucrado en varios procesos fisiológicos que incluyen ovulación, migración celular, diferenciación y regulación de la fibrinólisis (125).

Las células endoteliales producen PA tisular (PA_t), pero en el medio condicionado por estas células el PA_t forma un complejo inactivo: PA_t-inhibidor (PAI) (126). Se ha detectado la actividad PAI en extractos celulares de distintos orígenes, en suero y en plasma (127).

La síntesis de PA desde células de endotelio capilar aumenta notablemente cuando éstas crecen en presencia de promotores tumorales; este incremento en la síntesis de PA no se observa cuando se estudia la respuesta de las células de endotelio vascular al estímulo con TPA, lo que refleja una de las varias diferencias bioquímicas entre ambos tipos celulares.

1.4. Prostaglandinas

Los niveles de prostaglandina son elevados en los tumores, en macrófagos activados, en exudados inflamatorios y en las heridas (128).

Las PGs de la serie E, E1 (PGE1) y E2 (PGE2) estimulan la angiogénesis. La PGE1 tiene actividad angiogénica en dosis de 1 mg, mientras que la PGE2 es angiogénica en dosis menores: 0.2 a 2 ng. Las PGs de otras series no son activas en la inducción de una respuesta vascular.

1.5. Rol del cobre en la angiogénesis

La observación de que el cobre promueve la neovascularización, llevó a pensar que uno de los pasos iniciales de la formación de nuevos capilares podría consistir en la migración de las células endoteliales a lo largo de un gradiente de concentración de iones libres o complejados.

Para estudiar esta posibilidad, se analizó la capacidad de los iones cúpricos (Cu^{++}) para movilizar las células endoteliales in vitro, demostrándose que el Cl_2Cu y el SO_4Cu incrementan la actividad migratoria de las células cuando se agregan al medio de cultivo. Se observó además que al menos el 95% de las células responden a la presencia de iones, migrando en diferentes direcciones. Otros iones con capacidad inductora de la migración, aunque en menor medida que el Cu, son Ni y Sn; sin embargo éstos no tienen capacidad mitogénica sobre células endoteliales (129).

El análisis de distintos factores angiogénicos, con espectrometría de absorción atómica demostró que las fracciones activas contienen Cu^{++} ; la eliminación de estos iones por pretratamiento con EDTA conduce a la desaparición de la actividad angiogénica, la cual se reestablece por adición de Cu^{++} exógeno. Por otro lado, se demostró que la unión de Cu^{++} a la molécula de heparina o al polipéptido glicil-L-histidil-L-lisina, hace que éstos adquieran capacidad angiogénica (130).

La ceruloplasmina, proteína circulante transportadora de cobre, no sólo tiene actividad quimioattractante, sino también mitogénica sobre células endoteliales en cultivo y capacidad angiogénica in vivo. Si se prueba su acción en animales previamente tratados con indometacina, conocido inhibidor de la síntesis de PGs, la ceruloplasmina no induce neovascularización (131, 132). Cuando la córnea de conejo se trata con PGE u otro efector de la angiogénesis, se observa un incremento en los niveles de Cu^{++} y adquisición de actividad quimiotáctica para células endoteliales, previo a la aparición de capilares. Sin embargo, en los animales mantenidos con dieta deplecionada en Cu^{++} , la PGE no tiene actividad angiogénica.

1.6. Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína de alto PM (200 kDa) presente en el plasma y en la MEC. En cultivo actúa aparentemente como una proteína adhesiva, participando en la unión de las células con su substrato. Sin embargo, contraponiéndose a su función de proteína de anclaje, la fibronectina también estimula la locomoción al azar en algunas líneas celulares y tiene una fuerte actividad quimiotáctica sobre células endoteliales (133-136).

La capacidad metastásica de las células tumorales murinas se correlaciona en forma directa con su contenido en ácido siálico, un gangliósido que intervendría en la unión de la fibronectina con la superficie celular.

La interacción entre gangliósidos y fibronectina tiene un rol determinante en la capacidad de migración de las células endoteliales. Se ha sugerido que la redistribución de la fibronectina en la superficie celular en respuesta a la presencia de Cu^{++} y el aumento en el contenido en gangliósidos estarían relacionados con el incremento en la movilidad del endotelio (137), 139).

1.7. Fibrina

La fibrina actúa como un activador de la producción de GF y GF con actividad angiogénica por parte de los leucocitos, habiéndose demostrado que tanto la

fibrina como sus productos de degradación producen migración de leucocitos en la córnea de conejo frente a un estímulo angiogénico.

Este influjo de células inflamatorias está seguido por una intensa neovascularización y proliferación de fibroblastos.

La deposición de fibrina se observa en la inflamación crónica y alrededor de los tumores invasivos. Las células neoplásicas poseen tanto actividad procoagulante como fibrinolítica y hay evidencia de que estas propiedades son importantes en la invasión y en el proceso metastásico.

Dado que los productos de degradación de la fibrina tienen efecto en la permeabilidad vascular, en la contractilidad de las células musculares y en la quimiotaxis, es posible que también participen en la angiogénesis (140-144).

2. Inhibidores de la angiogénesis

Gran parte de los tejidos normales contienen factores que promueven la proliferación vascular. Sin embargo, las células del endotelio capilar se encuentran en un estado generalmente quiescente, con la excepción de los esporádicos eventos neovasculares que ocurren en condiciones fisiológicas (ovulación, reparación del útero durante el período menstrual y formación de la placenta) (145).

Cómo mantienen estas células una baja velocidad de proliferación en presencia de tantos y tan abundantes GF? Se puede postular la existencia de mecanismos que prevengan la proliferación vascular en condiciones normales, pero que puedan ser saltados o inhibidos cuando se requiera la formación de vasos sanguíneos, como por ejemplo durante la regeneración tisular.

Recientemente se descubrieron esteroides angiostáticos que circulan en el plasma y que podrían restringir el crecimiento de las células endoteliales; por otra parte en ciertos tejidos se producen inhibidores de la proliferación endotelial. La acción conjunta de todos estos factores regula el desarrollo vascular en condiciones normales (146).

2.1. Inhibidores angiostáticos

La función de los esteroides angiostáticos fue descubierta al realizar estudios sobre el rol de la heparina en la angiogénesis.

La heparina estimula la locomoción de las células endoteliales in vitro e incrementa la angiogénesis tumoral in vivo (147, 148). En base a estos conocimientos se empleó heparina para potenciar la respuesta neovascular inducida por distintas sustancias en MCA (149).

En este ensayo la respuesta angiogénica queda muchas veces enmascarada por una reacción inflamatoria, iniciada por pequeños fragmentos de la cáscara del huevo que caen sobre la MCA. La aplicación de cortisona o hidrocortisona previene la reacción inflamatoria pero no interfieren con la angiogénesis inducida por la muestra.

Cuando se aplica en forma conjunta heparina e hidrocortisona se observa inhibición de la angiogénesis tumoral y regresión de los capilares de la MCA (150).

Este sinergismo es independiente de la actividad anticoagulante de la heparina; de hecho fragmentos de hexasacáridos sin actividad anticoagulante producidos por clivaje enzimático o pentasacáridos sintéticos de heparina son más potentes que la heparina nativa.

La actividad antiangiogénica de la mezcla heparina-esteroide no está relacionada con las propiedades anti-inflamatorias (glucocorticoides) o de retención de sales (mineralocorticoides) de los corticoesteroides, ya que un estereoisómero biológicamente inactivo de la hidrocortisona (el 11-hidrocortisona o epicortisol) es igualmente efectivo para provocar la regresión capilar en presencia de heparina.

La actividad angiostática parece estar determinada por distintas configuraciones estructurales del núcleo pregnano. Los grupos hidroxilo 11 y 21 pueden ser eliminados sin pérdida significativa de la actividad angiostática, pero la remoción del grupo hidroxilo-17 reduce la actividad antiangiogénica en un 76%. La reducción del anillo A (por remoción del doble enlace 4,5) aumenta la actividad antiangiogénica al doble de la hidrocortisona.

Las MCA tratadas con una combinación de heparina y esteroides angiostáticos muestran fragmentación de la membrana basal de los capilares sanguíneos, con pérdida de laminina y fibronectina; la degeneración de la membrana basal está asociada con la retracción y regresión capilar y con el redondeamiento de las células endoteliales. La membrana basal de los vasos mayores, del epitelio y de los capilares que no están en una etapa de crecimiento no son afectadas por el tratamiento (151).

Aún no está claro el mecanismo por el cual sólo la membrana basal de los capilares en desarrollo sufre alteraciones, mientras que las membranas basales del epitelio vecino y de los grandes vasos se mantienen intactas. En la MCA normal el lecho capilar subcutodérmico sufre un rápido crecimiento, asociado con acumulación continua de membrana basal. Varios factores angiogénicos

estimulan la producción de proteasas y colagenasas por parte de las células endoteliales (152). También el crecimiento y la migración de las células endoteliales in vitro está asociada con la degradación y la deposición de componentes de la membrana basal (153). Esto sugiere que el crecimiento de los capilares sanguíneos requiere un recambio continuo de los componentes de la membrana basal; por el contrario los tejidos adyacentes son relativamente más estáticos.

Los esteroides angiostáticos no producen regresión en los capilares que finalizaron su etapa de crecimiento; estos están rodeados por una membrana basal más gruesa que contiene mayor concentración de laminina y colágeno tipo IV. La primera acción bioquímica identificada para los esteroides angiostáticos es la disolución de la membrana; las alteraciones inducidas regulan el crecimiento y la viabilidad de las células endoteliales (154).

Los esteroides con actividad y sin actividad glucocorticoide combinados con heparina previenen la angiogénesis tumoral en MCA cuando se los administra después de la inoculación de las células. Por otro lado el tratamiento con una sola dosis de esteroides con actividad glucocorticoide antes de la implantación del tumor aumenta el número de colonias pulmonares, mientras que el tratamiento con esteroides sin actividad glucocorticoide no aumenta el número de metástasis. Ambos tipos de esteroides actúan sobre el crecimiento metastásico, aunque los esteroides con actividad glucocorticoide afectan los pasos de la cascada metastásica que ocurren después de la liberación de las células tumorales en el torrente sanguíneo y antes que se produzca el proceso de neovascularización en el foco secundario, promoviendo la aparición de metástasis.

2.2. Factor de crecimiento transformante tipo beta

Aunque en principio se lo caracterizó como una proteína con capacidad mitogénica, los datos actuales indican que tiene también un fuerte efecto inhibitor del crecimiento celular (155).

El TGF- β inhibe la proliferación de células de endotelio de aorta bovina in vitro y antagoniza la actividad mitogénica del FGFb en forma no competitiva. La inhibición del TGF- β es reversible ya que después de la remoción del factor las células comienzan a proliferar con la misma velocidad que los controles sin tratamiento (156, 157).

2.3. Interferón

Los distintos tipos de interferón (IFN) recombinantes, son inhibidores de la proliferación de las células endoteliales en cultivo. La acción inhibitoria es proporcional a la dosis empleada y no se debe a un efecto citotóxico.

El IFN-gamma es el inhibidor más potente; notablemente el efecto inhibitorio de los IFNs es mayor para células estimuladas por FGFb que para células que crecen sólo en presencia de suero. Por otro lado los IFN-alfa 1 y beta 2 tienen una pequeña actividad estimuladora sobre células endoteliales que crecen en presencia de suero.

3. BIBLIOGRAFIA

1. Barnes D., Sato G.: Serum-free culture: a unifying approach. *Cell* 22.: 649, 1980.
2. Leof E., Wharton W., Van Wick Y., Pledger W.: Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp. Cell. Res.* 141: 107, 1982.
3. Fabricant R., De Larco J., Todaro G.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74: 565, 1977.
4. Pledger W., Stiles C., Antoniades H., Scher C.: An ordered sequence of events is required before BALB/c 3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 2839, 1978.
5. Goldfine I.: Interaction of insuline polypeptide hormones and growth factors with intracellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 650: 53, 1980.
6. Moses H., Robinson R.: Growth factors, growth factors receptors and cell cycle mechanisms in chemically transformed cells. *Federation Proc.* 41: 3008, 1982.
7. Lobb R., Lasse J., Sullivan R., Shing J., D'Amore P., Jacobs I., Klagsburn M.: Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.* 261: 1924, 1986.
8. Thomas K., Gimenez Gallego G.: Fibroblast growth factor; broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends Biochem. Sci.* 11: 81, 1986.
9. Thomas K., Rios Candelore M., Fitzpatrick S.: Purification and characterization of acidic fibroblast growth factors from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 357, 1984.

10. Gimenez-Gallego G., Conn G., Hatcher V., Thomas K.: Human brain-derived acidic fibroblast growth factors amino-terminal sequences and specific mitogenic activities. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 135: 541, 1986.
11. Gimenez-Gallego G., Hatcher V., Thomas K.: The complete aminoacid sequence of human brain-derived acidic fibroblast growth factor. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 138: 611, 1986.
12. Gimenez-Gallego G., Rodkey I., Bennett C., Rios-Candelore M., Di Salvo I., Thomas K.: Brain derived acidic fibroblast growth factor: complete aminoacid sequence and homologies. *Science* 230: 1385, 1985.
13. Baird A., Esch F., Bohlen P., Ling N., Gospodarowicz D.: Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Regul. Pept.* 12: 201, 1985.
14. Gospodarowicz D., Baird A., Cheng I., Lui G., Esch F., Bohlen P.: Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland: physicochemical and biological characteristics. *Endocrinology* 118: 82, 1986.
15. Gospodarowicz D., Cheng I., Lui G., Baird A., Esch F., Bohlen P.: Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 117: 2383, 1985.
16. Klagsburn M., Sasse J., Sullivan R., Smith J.: Human tumor cells synthesize and endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 2448.
17. Gospodarowicz D., Bialecki H., Greenberg G.: Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 253: 3736, 1978.

18. Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill F., Denoroy L., Klepper D., Gospodarowicz D., Bohlen P., Gilleman R.: Primary structure of bovine pituitary fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 6507, 1985.
19. Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L.: Fibroblast growth factor: Complete sequence and homologies. Science 230: 1385, 1985.
20. Moscatelli D., Presta M., Rifkin D.: Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 2091, 1986.
21. Lobb R., Alderman E. J., Fett. J.: Induction of angiogenesis by bovine brain-derived class 1 heparin-binding growth factor. Biochemistry 24: 4969, 1985.
22. Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J., Fiddes J., Gospodarowicz D.: Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor. Nature 325: 257, 1987.
23. Abraham J., Whang J., Tumolo A., Mergia A., Friedman J., Gospodarowicz D., Fiddes J.: Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J. 5: 2523, 1986.
24. Schweigerer L., Neufeld G., Mergia A., Abraham J., Fiddes J., Gospodarowicz D.: Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: Implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84: 842, 1987.
25. Presta M., Moscatelli D., Joseph-Silverstein J., Rifkin D.: Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. Mol. Cell. Biol. 6: 4060, 1986.

26. Gross J., Moscatelli D., Rifkin D.: Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 2623, 1983.
27. Neufeld G., Gospodarowicz D.: The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. J. Biol. Chem. 260: 13860, 1985.
28. Schreiber A., Kenney I., Kowalski W., Friessel R., Mehlman T, Maciag T.: Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: characterization by receptor antibody recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 6138, 1985.
29. Abraham J., Mergia A., Whang L., Tumolo A., Friedman J., Hjerril K., Gospodarowicz D., Fiddes J.: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein basic fibroblast growth factor. Science 233: 545, 1986.
30. Jaye M., Howk R., Burgess W., Ricca G., Chui I., Ravera M., O'Brien S., Modi W., Maciag T., Drohan W.: Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence and chromosome localization. Science 233: 541, 1986.
31. Mergia A., Eddy R., Abraham J., Fiddes J., Shows T.: The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 644, 1986.
32. Thomas K., Rios Candelore M., Gimenez-Gallego G., Di Salvo J., Bennett C., Rodkey J., Fitzpatrick S.: Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin-1. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 6409, 1985.
33. Arruti C., Courtois Y.: Morphological changes and growth stimulation of bovine epithelial lens cells by a retinal extract in vitro. Exp. Cell. Res. 117: 283, 1978.

34. Barritault D., Arruti C., Courtois Y.: Is there a ubiquitous growth factor in the eye?. *Differentiation* 18: 29, 1981.
 35. Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L.: Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell. Differ.* 19: 1, 1986.
 36. D'Amore P., Glaser B., Brunson S., Fenselau A.: Angiogenic activity from bovine retina: partial purification and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 3068, 1984.
 37. Pettman B., Labourdette G., Weibel M., Sensenbrenner M.: The brain fibroblast growth factor (FGF) is localised in neurons. *Neurosci. Lett.* 68: 125, 1986.
- Flouet J., Mascarelli F., Lagente O., Dorey C., Lorans G., Faure J., Courtois Y.: Eye derived growth factor: a component of rod outer segment implicated in phototransduction *En: Retinal signal systems, degeneration and transplant.* Editado por E. Agardh y B. Ehinger, pag. 311, 1986. Elsevier Science.
39. Uhlrich S., Lagente O., Lenfant M., Courtois Y.: Effect of heparin on the stimulation of nonvascular cells by human acidic and basic FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 1205, 1986.
 40. Burgess W., Mehlman T., Friesel R., Johnson W., Maciag T.: Multiple forms of endothelial cell growth factor. *J. Biol. Chem.* 260: 11389, 1986.
 41. Burgess W., Mehlman T., Marshak D., Fraser B., Maciag T.: Structural evidence that endothelial cell growth factor B is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 7216, 1986.

42. Friesel R., Burgess W., Mehlman T., Maciag T.: The characterization of the receptor for endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J. Biol. Chem.* 261: 7581, 1986.
43. Huang S., Huang F.: Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 261: 9568, 1986.
44. Thornton S., Mueller S., Levine E.: Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222: 623, 1984.
45. Terranova V., Di Florio R., Lyall R., Hic S., Friesel R., Maciag T.: Human endothelial cells are chemotactic to endothelial-cell growth factor and heparin. *J. Cell Biol.* 101: 2330, 1985.
46. Schreiber A., Kenney J., Kowalski J., Thomas K., Gimenez-Gallego G., Rios-Candelore M., Di Salvo J., Barriault D., Courty I., Courtois Y., Moenner M., Loret C., Burgess W., Mehlman T., Friesel R., Lohson W., Maciag T.: A unique family of endothelial cell polipeptide mitogens: The antigenic and receptor cross-reactivity of bovine endothelial cell growth factor, brain-derived acidic fibroblast growth factor, and eye-derived growth factor -II. *J. Cell. Biol.* 101: 1623, 1985.
47. Davidson J., Klagsburn M., Hill E., Buckley A., Sullivan R., Brewer P., Woodward S.: Biological activities of cartilage derived growth factor. *J. Cell Biol.* 100: 1219, 1985.
48. Shing S., Folkman J., Haudenschild C., Lund D., Crum R., Klagsburn M.: Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J. Cell. Biochem.* 29: 275, 1985.
49. Rall L., Scott J., Bell G.: Mouse pre-proepidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313: 228, 1985.

50. Taylor J., Mitchell W., Cohen S.: Epidermal growth factor: Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 247: 5928, 1972.
51. Gray A., Dull T., Ullrich A.: Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128.000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303: 722, 1983.
52. Cohen S., Ushino H., Stoscheck C., Chinkers M.: A native 170.000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257: 1523, 1982.
53. Ushino H., Cohen S.: Identification of phosphotyrosin as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A 431 cell membranes. *J. Biol. Chem* 255: 8363, 1980.
54. Weber W., Gill G., Spiess J.: Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science* 224: 294, 1984.
55. Rose S., Pruss R., Herschman H.: Initiation of 3T3 fibroblast cell division by epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol.* 86: 593, 1975.
56. Shipley G., Childs C., Volkenant M., Moses H.: Differential effects of epidermal growth factor, transforming growth factor, and insulin on DNA and protein synthesis and morphology in serum-free cultures of AKR-2B cells. *Cancer Res.* 44: 710, 1984.
57. Oka Y., Gishan F., Greene H., Orth D.: Effect of mouse epidermal growth factor/urogastone on the functional maturation of rat intestine. *Endocrinology* 112: 940, 1983.
58. Weissman B., Aaronson S.: BALB and Kirsten murine sarcoma viruses alter growth and differentiation of EGF-dependent BALB/c mouse epidermal keratinocyte lines. *Cell* 32: 599, 1983.

59. Hirai R., Yamaoka K., Mitsui H.: Isolation and partial purification of a new class of transforming growth factors from an avian sarcoma virus-transformed cell line. *Cancer Res.* 43: 5742, 1983.
60. Salmon W., Daughaday W.: A hormonally controlled serum factor which stimulated sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 825, 1957.
61. Yamahoka K., Hirai R., Tsugita A., Mitsui H.: The purification of an acid heat-labile transforming growth factor from an avian sarcoma virus-transformed rat cell line. *J. Cell Physiol.* 119: 307, 1984.
62. Lee D., Rochford R., Todaro G., Villareal L.: Developmental expression of rat transforming growth factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3644, 1985.
63. Sporn M., Todaro G.: Autocrine secretion and malignant transformation. *N. Engl. J. Med.* 303: 879, 1980.
64. Derynck R., Roberts A., Winkler M., Chen E, Goeddl D.: Human transforming growth factor-alpha: Precursor structure and expression in *E. Coli*. *Cell* 38: 287, 1984.
65. Massagué J.: Epidermal growth factor-like transforming growth factor. I. Isolation, chemical characterization and potentiation by other transforming growth factors from feline sarcoma virus transformed rat cells. *J. Biol. Chem.* 258: 13606, 1983.
66. Marquardt H., Hunkapiller M., Hood L., Todaro G.: Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223: 1079, 1984.
67. Derynck R., Goeddl D., Ullrich A., Gutterman I., Williams R., Bringman T., Berger W.: Synthesis of mRNAs for transforming growth factors alpha and B and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47: 707, 1987.

68. Schreiber A., Winkler M., Derynck R.: Transforming growth factor alpha: A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232: 1250, 1986.
69. Winkler M., Bringman T., Marks B.: The purification of fully active recombinant transforming growth factor alpha produced in *E. Coli*. *J. Biol. Chem.* 261: 13838, 1986.
70. Roberts A., Anzano M., Meyers C., Widerman I., Blacher R., Pan Y., Stein S., Lehrman S., Smith L., Lamb L, Sporn M.: Purification and properties of a type-B transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22: 5692, 1983.
71. Frolik C., Dart L., Meyers C., Smith D., Sporn M.: Purification and initial characterization of a type -B transforming growth factor from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 3676, 1983.
72. Assoian R., Komoriya A., Meyers C., Miller D., Sporn M.: Transforming growth factor -B in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 7155, 1983.
73. Stromberg K., Pigott D., Ranchajis I., Twardick D.: Human term placenta contains transforming growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 354, 1982.
74. Roberts A., Sporn M.: Transforming growth factors *Cancer Surv.* 4: 683, 1985.
75. Sporn M., Roberts A.: Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer. *J. Clin. Invest.* 78: 329, 1986.
76. Derynck R., Jarrett J., Chen E., Eaton D., Bell J., Assoian R., Roberts K., Sporn M., Goeddel D.: Human transforming growth factor -B cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316: 701, 1985.

77. Roberts A., Anzano M., Lamb M., Smith I., Sporn M.: Epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 5339, 1981.
78. Propper I., Bjornson C., Moses H.: Mouse embryos contain polipeptide growth factor(s) capable of inducing a reversible neoplastic phenotype in non transformed cells in culture. J. Cell. Physiol. 110: 169, 1982.
79. Mickell K., Halper I., Moses H.: Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms. Cancer Res. 43: 1966, 1983.
80. Pircher R., Lawrence D., Jullien P.: Latent transforming growth factor-b in nontransformed and Kistern sarcoma virus-transformed normal rat kidney cells clone 9F. Cancer Res. 44: 5538, 1984.
81. Roberts A., Anzano M., Wakefield M., Roche L., Stern N., Sporn M.: Type B transforming growth factor a bifunctional regulator of cellular growth. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 119, 1985.
82. Sporn M., Roberts A., Wakefield L., Assoian R.: Transforming growth factor beta: Biological function and chemical structure. Science 532, 1986.
83. Roberts A., Anzano M., Lamb L., Smith I., Frolik C., Marquardt H., Todaro G., Sporn M.: Isolation from murine sarcoma cells of a new class of transforming growth factor potentiated by epidermal growth factor. Nature, 295: 417, 1982.
84. Shipley G., Tucker R., Moses H.: Type B-transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 4147, 1985.
85. Roberts A., Sporn M., Assoian R., Smith J., Roche N., Walurfield L., Heine U., Liotta L., Falagno V., Kehrl J., Fauci A.: Transforming growth factor beta: Rapid

- induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4167, 1986.
86. Ignota R., Massagué J.: Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol. Chem. 261: 4337, 1986.
 87. Fráter-Schoder M., Muller G., Binchmeir W., Bohlen P.: Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137: 295, 1986.
 88. Childs C., Proper J., Tucker R., Moses H.: Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5312, 1982.
 89. Oka Y., Ort D.: Human plasma epidermal growth factor B/urogastrone is associated with blood platelets. J.Clin. Invest. 72: 249, 1983.
 90. Seppa H., Grotendorst G., Seppa S., Schiffmann E., Martin G.: The platelet-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblast. J. Cell. Biol. 92: 584, 1982.
 91. Watterfield M., Scrace G., Whittle N., Stroabant P., Johnson A., Wattersen A., Westermack B., Heldin C., Huan I., Deuel T.: Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p 28 sis of simian sarcoma virus. Nature 304: 35, 1983.
 92. Niman H., Houghton R., Bowen-Pope D.: Detection of high molecular weight forms of platelet-derived growth factor by sequence-specific antisera. Science 225: 701, 1984.
 93. Johnson A., Heldin C., Wattersen A., Westermack B., Deuel T., Huang I., Suburg P., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stroabant P., Waterfield M.: The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet derived growth factor. EMBO J. 3: 921, 1984.

94. Bowen-Pope D., Ross R.: Platelet-derived growth factor II. Specific binding to cultured cells. *J. Biol. Chem.* 257: 5161, 1982.
95. Heldin C., Westermarck B., Wasteson A.: Specific receptor for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 3664, 1981.
96. Ek B., Heldin C.: Characterization of a tyrosine-specific kinase activity in human fibroblast membranes stimulated by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 257: 10486, 1982.
97. Fox P., Di Corletto P.: Regulation of production of a platelet-derived growth factor-like protein by cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4774, 1984.
98. Di Corletto P., Chilsom G.: Participation of the endothelium in the development of the atherosclerotic plaque. *Prog. Lipid Res.* 12: 152, 1986.
99. Stolpen A., Guinan E., Fiers W., Pober I.: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. *Am. J. Pathol.* 123: 16, 1986.
100. Sugarman B., Aggarwal B., Has P., Figari I., Palladino M., Sheppard H.: Recombinant human tumor necrosis factor -alpha: Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943, 1987.
101. Sato N., Goto T., Haranka K., Satommi N., Nariuchi H., Mano-Hirano Y., Sawasaki Y.: Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: Morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 1113, 1986.
102. Leibovich S., Polverini P., Shepard H., Wisemar D., Shively V., Nuseir N.: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor alpha. *Nature* 329: 630, 1987.

103. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E.: Actividad angiogénica y tumor. *Medicina* 41: 369, 1981.
104. Folkman I., Merlen E., Abernathy C., Williams G.: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133: 275, 1971.
105. Klagsburn M., Knighton D., Folkman J.: Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* 36: 110, 1976.
106. Phillips P., Kumar S.: Tumor angiogenesis factor (TAF) and its neutralization by a xenogeneic antiserum. *Int. J. Cancer* 23: 82, 1979.
107. Schor A., Kumar S., Philips P.: Quantitation of extracts containing tumor angiogenesis factor (TAF) by radioimmunoassay and radioimmunoassay. *Int. J. Cancer* 25: 773, 1980.
108. Weiss J., Brown R., Kumar S., Philips P.: An angiogenic factor isolated from tumors: a potent low molecular weight compound. *Br. J. Cancer* 40: 493, 1979.
109. Weiss I.: Studies on a low molecular weight angiogenic factor. *Br. J. Ophthalmol.* 66: 165, 1982.
110. Brown R., Weiss I., Tomkinson I., Philips P., Kumar S.: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors. *Lancet* 682, 1980.
111. Weiss I., Hill C., Davis R., Mc Laughlin B., Sedowofia K., Brown R.: Activation of a procollagenase by low-molecular weight angiogenesis factor. *Biosci. Rep.* 3: 171, 1983.
112. Weiss I., Hill C., Mc Laughlin B., Elstow S.: Potentiating effect of heparin in the activation of procollagenase by a low -Mr angiogenesis factor. *FEBS Lett.* 163: 62, 1983.

113. Fett J., Strydom D., Lobb R., Alderman E., Lemuel-Bethune J., Riordan J., Vallee B.: Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480, 1985.
114. Strydom D., Fett J., Lobb R., Alderman E., Lemuel-Bethune I., Riordan I., Vallee B.: Aminoacid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry* 24: 5486, 1985.
115. Strydom D., Riordan I., Lobb R.: Characteristic ribonucleotyc activity of angiogenin. *Biochemistry* 25: 3527, 1986.
116. Kurachi K., Davie E., Strydom D., Riordan I., Vallee B.: Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry* 24: 5494, 1985.
117. Hoffman H., Mc Auslan B., Robertson D., Burnett E.: An endothelial growth stimulating factor from salivary glands. *Exp. Cell Res.* 102: 269, 1976.
118. Goldsmith H., Griffith A., Kupferman A., Castimpoalas N.: Lipid angiogenic factor from omentum. *J. Am. Med. Assoc.* 252: 2034, 1984.
119. Mc Auslan B., Hannan G., Reilly W.: Characterization of an endothelial cell proliferation factor from cultured 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 128: 95, 1980.
120. Castellot J., Karnovsky M., Spiegleman B.: Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 77, 6007, 1980.
121. Makris A., Ryan K., Yasumizu T., Hill C., Zetter B.: The non-luteal porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinol* 115: 1672, 1984.
122. Frederick J., Hoa N., Preston D., Frederick J., Campeau J., Ono T., Dizerga G.: Initiation of angiogenesis by porcine follicular fluid. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* 152: 1073, 1985.

123. Burgos H.: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 289, 1983.
124. West D., Hampson I., Arnold F., Kumar S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyalouronic acid. *Science* 228: 1324, 1985.
125. Gross J., Moscatelli D., Jaffe E., Rifkin D.: Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95: 974, 1982.
126. Emeis I., Vanhinsbergh V., Verheijen I., Wijnaardsg: Inhibition of tissue-type plasminogen activator by conditioned medium from cultured human and porcine vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 392, 1983.
127. Hekman C., Loskutoff D.: Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activator that can be activated by denaturants. *J. Biol. Chem.* 260: 11581, 1985.
128. Ben Ezra D.: Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am. J. Ophthalmol.* 86: 455, 1978.
129. Mc Auslan B., Reilly W.: Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions. *Exp. Cell Res.* 130: 147, 1980.
130. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Angiogenesis in vivo and selective mobilization of capillary endothelium in vitro by heparin-copper complex. *Microcirc. Endoth. Lymphat.* 1: 329, 1984.
131. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 43: 1790, 1983.
132. Raju K., Alessandi G., Ziche M., Gullino P.: Ceruloplasmin, copper ions and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 1183, 1982.

133. Ali I., Hunes R.: Effects of LETS glycoprotein on cell motility. *Cell* 14: 439, 1978.
134. Gauss-Muller V., Kleinman H., Martin G., Schiffmann E.: Role of attachment factors and attractants of fibroblast chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.* 96: 1071, 1980.
135. Postlethwaite A., Keski-Oja I., Balian G., Kang A.: Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. *J. Exp. Med.* 153: 494, 1981.
136. Ginell F.: Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int. Rev. Cytol.* 53: 65, 1978.
137. Bowerson J., Sorgente N.: Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin. *Cancer Res.* 42: 2547, 1982.
138. Homandberg G., Williams J., Grant D., Schumacher B., Einsenstein R.: Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am. J. Pathol.* 120: 327, 1985.
139. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Interaction of gangliosides with fibronectin in the mobilization of capillary endothelium. *Inv. Met.* 6: 145, 1986.
140. Vasalli P., Simon G., Rouiller C.: Electron microscopic study of glomerular lesions resulting from intravascular fibrin formation. *Am. J. Pathol.* 43: 579, 1963.
141. Kadish I., Butterfield K., Folkman I.: The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tiss. Cell.* 11: 99, 1979.
142. Knighton D., Hunt T., Thakral K., Goodson W.: Role of platelets and fibrin in the healing sequence. An in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann. Surg.* 196: 379, 1982.
143. Rutherford R., Ross R.: Platelet factors stimulate fibroblast and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J. Cell. Biol.* 69: 196, 1976.

144. Thompson W., Campbell R., Evans T.: Fibrin degradation and angiogenesis: Quantitative analysis of the angiogenic response in the CAM. *J. Pathol.* 145: 27, 1985.
145. Denekamp J.: Vasculature as a target for tumor therapy. En: *Progress in applied microcirculation.* pág. 28, 1984. Editado por F. Hammersen y O. Hudlicka; Karger, Basilea.
146. Crum R., Szabo S., Folkman I.: A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 230: 1375, 1985.
147. Azizkhan R., Azizkhan J., Zetter B., Folkman I.: Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J. Exp. Med.* 152: 931, 1980.
148. Taylor S., Folkman I.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297: 307, 1982.
149. Shing Y., Folkman I., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsburn M.: Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223: 1296.
150. Folkman I., Langer R., Lindhart R., Haudenschild C., Taylor S.: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221: 719, 1983.
151. Ingber D., Madri I., Folkman I.: A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: Induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 119: 1768, 1986.
152. Kalebic, T., Garbisa S., Glaser B., Liotta L.: Basement membrane collagen: Degradation by migrating endothelial cells. *Science* 221: 281, 1983.
153. Madri I., Stenn K.: Aortic endothelial cell migration I. Matrix requirements and composition. *Am. J. Pathol.* 106: 180, 1982.

154. Hayman E., Pierschenbacher M., Ruoslathi E.: Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J. Cell Biol.* 100: 1948, 1985.
155. Moses H., Branum E., Proper J., Robinson R.: Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* 41: 2842, 1981.
156. Ozanne B., Wheeler T., Kaplan P.: Cells transformed by RNA and DNA tumor viruses produce transforming factors. *Federation Proc.* 41: 3004, 1982.
157. Todaro G., De Larco I., Fryling C.: Sarcoma growth factor and other transforming peptides produced by human cells: Interactions with membrane receptor. *Federation Proc.* 41: 2996, 1982.

CAPITULO III

ANGIOGENESIS NORMAL

<u>INDICE</u>	Pág.
1. Angiogénesis en tejidos normales.	93
2. Angiogénesis en tejidos en regeneración.	94
2.1. Reparación del endotelio in vivo.	94
2.2. Estudios in vitro sobre la reparación del endotelio.	94
2.3. Reestructuración de la red vascular.	95
3. Bibliografía.	97

1. Angiogénesis en tejidos normales

Nuestro conocimiento sobre la angiogénesis en tejidos normales se basa mayormente en los experimentos realizados con transplantes tisulares.

La MCA ha sido usada ampliamente para realizar ensayos sobre la capacidad angiogénica de distintos tejidos. Entre los tejidos normales que inducen neovascularización en MCA, podemos mencionar aquí: glándulas salivales, glándula tiroides, cuerpo lúteo, retina, epidermis, nódulos linfáticos, cuerpo vítreo, testículo y útero en gestación (1-8). Los tejidos embrionarios no siempre evocan una respuesta angiogénica en MCA, lo que llevó a pensar que estos tejidos se vascularizarían mediante anastomosis entre los vasos del implanto y los del huésped (9).

2. Angiogénesis en tejidos en regeneración

2.1. Reparación del endotelio in vivo

Al producirse un daño vascular, las células endoteliales pierden la inhibición del crecimiento debido al contacto intercelular, se alargan rápidamente, desarrollan lamelipodios y comienzan a migrar hacia la zona de la herida. Esta migración la realizan las células en forma de una lámina continua, lo que sugiere que los contactos intercelulares se mantienen durante el proceso de reparación. Seguidamente tiene lugar la proliferación celular para cubrir el área dañada (10).

Se ha observado que las células endoteliales, al migrar hacia la zona de la herida, redistribuyen sus centrosomas ubicándolos entre el núcleo y el borde del lamelipodio. La redistribución ocurre en forma muy rápida y requiere la presencia de microtúbulos intactos (11).

El mecanismo por el cual se desplazan los microtúbulos durante la migración es aún desconocido. Posiblemente existan conexiones directas o indirectas entre los microtúbulos que emergen del centrosoma y aquellos que se encuentran en la periferia formando la "banda densa periférica" (BDP), de tal manera que la banda actúe como zona de anclaje de los microtúbulos mientras se redistribuyen los centrosomas.

2.2. Estudios in vitro sobre la reparación del endotelio

Para estudiar la locomoción de las células endoteliales se han empleado modelos in vitro; en éstos se hace crecer a las células sobre cubreobjetos y una vez que forman una monocapa se eliminan algunas células con la punta de una delgada fibra de teflon para simular el efecto de una injuria leve in vivo.

Se pueden diferenciar en la monocapa cuatro zonas con características netas. La zona de borde, constituida por una banda de células con lamelipodios prominentes, en cuyo interior se encuentran microfilamentos distribuidos en forma paralela y perpendicular con respecto a su eje. Por detrás se encuentra la zona de células endoteliales elongadas, sin BDP pero con microfilamentos paralelos al

eje celular. Detrás se define la zona de transición que contiene células endoteliales con aspecto algo elongado, pero que retienen su morfología poligonal; estas células contienen microfilamentos distribuidos uniformemente. Por último se encuentra la monocapa confluyente con BDP prominentes. Las células de las dos primeras zonas migran, mientras que en las dos zonas restantes las células están ancladas al sustrato sin evidencias de migración; por lo tanto la presencia de BDP está asociada con una inhibición marcada de la migración celular (12).

En resumen, podemos decir que la reparación del endotelio vascular ocurre en tres pasos. En el primero las células intentan reparar la zona de injuria mediante la extensión de lamelipodios, lo que requiere la existencia de un sistema de microfilamentos intacto. El segundo paso incluye la elongación de las células endoteliales y la redistribución de los centrosomas hacia el frente celular, como preparación para la locomoción. Las lesiones mayores requieren un tercer paso, que consiste en la proliferación de las células endoteliales como medio para reestablecer el número de células de la monocapa.

2.3. Reestructuración de la red vascular

Después de producirse una injuria traumática aparecen exudados que contienen leucocitos, eritrocitos y fibrina; esto está seguido por dilatación de los vasos sanguíneos adyacentes y proliferación de capilares dentro de la zona de la herida. En pocos días gran parte de estos capilares comienzan a regresionar y desaparecen, mientras que otros se diferencian en arteriolas y vénulas.

Los factores que gobiernan la neovascularización y el crecimiento en un tejido de granulación son varios. Para que las células epiteliales se multipliquen, es esencial que posean un adecuado aporte de nutrientes y oxígeno; existe una gran variedad de sustancias que estimulan el crecimiento tisular tales como el PDGF (13, 14), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (15), factores humorales y somatomedinas (16). Por otra parte el crecimiento puede ser inhibido por productos del metabolismo celular, tales como CO₂, ácido láctico, AMPc, etc (17).

Los nuevos vasos se forman sólo si existe una masa compacta de restos celulares (glóbulos rojos) y lo hacen desde los vasos adyacentes a la zona de la herida. Las dimensiones de estos nuevos vasos no son uniformes. Si los restos celulares forman una masa compacta, los vasos son delgados; en cambio si los restos celulares se encuentran laxamente agregados, los vasos son amplios. La geometría de la nueva red vascular depende entonces de las propiedades mecánicas de los restos celulares (existencia de gaps, densidad, etc.) (18).

En un área dada de tejido aparecen primero los vasos pequeños (10 - 20 μm) en gran número y a una distancia de aproximadamente 100 μm entre sí. A medida que el tejido se desarrolla se incrementa la distancia entre los vasos, el número de vasos disminuye y el diámetro promedio de éstos aumenta; aparecen luego grandes vasos que actúan brindando un drenaje venoso. Luego la distancia entre los vasos se estabiliza en aproximadamente 300 μm y el número de vasos totales, incluyendo los vasos de drenaje venoso, disminuye.

El rápido aumento y subsiguiente disminución en el volumen, superficie y largo de los vasos sanguíneos por mm^3 de tejido, debe ser considerado como una evidencia estructural apoyada por una evidencia funcional. Existe también un aumento y posterior disminución en la pO_2 , esta variación es una manifestación de la capacidad funcional de la red vascular.

3. BIBLIOGRAFIA

1. Hoffman H., Mc Auslan B., Robertson D., Burnett E.: An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. *Exp. Cell. Res.* 102: 269, 1976.
2. Chen C., Chen S: Angiogenic activity of vitreous and retinal extract. *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.*19: 596, 1980.
3. Huseby R., Currie C., Langenborg V., Garb.S: Angiogenesis about and within grafts of normal testicular tissue. *Microvasc. Res.*10: 396, 1975.
4. Goldsmith H., Griffith A., Kupferman A., Castimpolas M.: Lipid angiogenic factor from omentum. *J. Am. Med. Ass.* 252: 2034, 1984.
5. Maleris A., Fyan K., Yasumizu T., Hill C., Zetter B.: The nonluteal porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinology* 115: 1155, 1984.
6. Burgos H.: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 289, 1983.
7. Wolf J., Harrison R.: Demonstration and characterization of an epidermal angiogenic factor. *J. Invest. Dermatol.* 61: 130, 1973.
8. Fromer C., Klinworth G.: An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 79: 537, 1979.
9. Auerbach R., Kubai L., Sidky Y.: Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer Res.* 36: 3435, 1976.
10. Wong M., Gotlieb A.: Control of reendothelialization: the importance of endothelial microfilaments, microtubules and centrosomes in endothelial locomotion. *En: Survey and Synthesis of Pathology Research* 4: 341, 1985. Editor: I.M.Cruse. Publicado por S. Karger A.G., Basilea, Suiza.

11. Gotlieb A., Subrahmanyam L., Kalmis V.: Microtubule organizing centers and cell migration. Effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial culture. *J. Cell. Biol.* 96: 1266, 1983.
12. Gotlieb A., Spector W., Wong M., Lacey C.: In vitro reendothelialization: microfilament bundle reorganization in migrating porcine endothelial cells. *Arteriosclerosis* 4: 91, 1984.
13. Di Corletto P., Bowen - Pope D.: Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80: 1919, 1983.
14. Ross R., Vogel A.: The platelet-derived growth factor. *Cell* 14: 203, 1978.
15. Thomas K., Gimenez-Gallego G.: Fibroblast-growth factors, broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends. Biochem. Sci.* 11: 81, 1986.
16. Van Wide I., Underwood L., Hintz R., Clemmons D., Voira S., Weaver R.: The somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Rec. Prog. Horm. Res.* 30: 259, 1974.
17. Cho-Chung G., Gullino P.: In vivo inhibition of growth of two hormone dependent mammary tumors by dibutyryl cyclic AMP. *Science* 183: 87, 1973.
18. Zawicki D., Lain R., Schmid-Schoeinbeing O., Chien S.: Dynamics of neovascularization in normal tissues. *Microvascular Res.* 21: 27, 1981.

CAPITULO IV

ANGIOGENESIS TUMORAL

<u>INDICE</u>	Pág.
1. Fases avascular y vascular del crecimiento tumoral.	101
2. El sistema vascular de los tumores.	103
3. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis tumoral: Actividad angiogénica en tumores primarios y en sus metástasis.	107
3.1. Ensayos de actividad angiogénica en explantos tumorales sobre MCA.	107
3.2. Aislamiento del factor responsable de la actividad angiogénica.	109
3.3. Estudio de la actividad angiogénica de células tumorales que crecen en cultivo.	113
4. Bibliografía.	124

1. Fases avascular y vascular del crecimiento tumoral

La capacidad de producir un factor angiogénico disocia el crecimiento tumoral en dos fases: avascular y vascular, cada una de las cuales posee propiedades únicas (1).

La fase avascular se caracteriza por el crecimiento lento de la masa tumoral, seguida por un período de latencia cuando se alcanza un diámetro de aproximadamente 1 mm. En condiciones normales la fase avascular es imperceptible, debido a que muchos tumores se vascularizan rápidamente después de ser implantados.

Cuando se colocan piezas tumorales en la MCA de embriones de pollo, los vasos penetran al tumor en aproximadamente 72 hs. Para estudiar detalladamente la fase avascular se puede retrasar la vascularización colocando el tumor en el humor acuoso de la cámara anterior del ojo; aquí se observa que el esferoide tumoral permanece avascular y no crece más allá de 1 mm de diámetro (2).

Existen algunas situaciones clínicas en las que la fase avascular se prolonga durante un tiempo considerable: el carcinoma "in situ" de cérvix, ciertos carcinomas de vejiga, melanomas superficiales y metástasis de retinoblastoma en humor vítreo son algunos ejemplos.

Por lo tanto una de las características principales de la fase avascular es que el crecimiento tumoral está limitado a un diámetro pequeño y que el tumor permanece en estado de latencia.

En contraste, la característica más típica de la fase vascular es el rápido crecimiento tumoral una vez que el implanto es penetrado por nuevos capilares. Un esferoide tumoral implantado entre los vasos del iris es penetrado por capilares dentro de los 5 ó 6 días y a continuación se produce el crecimiento exponencial de la masa tumoral.

Para estudiar por qué el crecimiento tumoral se detiene cuando el estadio avascular se prolonga, se hicieron crecer células tumorales en agar blando, con el fin de simular el microambiente de un tumor avascular (3).

Las células cultivadas en este sistema crecen formando esferoides que detienen su desarrollo cuando alcanzan un diámetro de pocos milímetros, independientemente de la frecuencia con que se realicen los cambios del medio de cultivo. Las células de la periferia continúan proliferando, mientras que las células de la zona central mueren y se lisan, con lo cual su desaparición balancea la proliferación de las células periféricas. La explicación más plausible es que, a medida que se expande el volumen de células, se alcanza un diámetro crítico en el que el área superficial del esferoide comienza a ser insuficiente para la absorción de nutrientes y eliminación de metabolitos. Posiblemente el mismo mecanismo tenga lugar en un nódulo tumoral avascular "in vivo"; aún cuando dicho nódulo pueda estar rodeado por vasos sanguíneos, su área superficial es limitante para el intercambio de sustancias con el medio.

Tanto en el esferoide tumoral suspendido en la cámara anterior del ojo, como en la fase avascular del crecimiento tumoral en la MCA, se observa el mismo patrón histológico. Sólo las células periféricas se multiplican, mientras que las células centrales forman un foco de necrosis.

2. El sistema vascular en los tumores

Los tumores experimentales aparecen en forma espontánea o inducida y se transplantan de un animal a otro en forma generalmente subcutánea, aunque dependiendo de los requerimientos de cada tipo de investigación, se los pueden implantar en casi cualquier sitio en el animal huésped, incluyendo cerebro, músculo, peritoneo e hígado.

El método de transplante consiste en la inyección de suspensiones celulares o simplemente en la implantación de una pequeña pieza tumoral con el empleo de un trócar. La forma en que se efectúa el transplante es de gran importancia para el desarrollo del tumor. Las suspensiones celulares obtenidas desde el tejido tumoral por tratamiento enzimático fueron empleadas para estandarizar y cuantificar las condiciones de transplante. Sin embargo, se brindó poca atención a la contaminación de las suspensiones con otros tipos celulares tales como fibroblastos, fagocitos y células endoteliales que, eventualmente, pueden llegar a jugar un rol en la formación de la red vascular del tumor.

Cuando una pieza tumoral se implanta en un lecho vascular, el tejido inicialmente translúcido deviene opaco como resultado de procesos de degeneración celular (4). Después de uno o dos días, los vasos sanguíneos vecinos (vénuclas) envían brotes vasculares que penetran el tumor; esto es lógico si se piensa que el tejido tumoral produce un factor angiogénico transportado a través del tejido extracelular que drena por las vénuclas; por lo tanto éstos son los vasos que primero se ponen en contacto con el factor angiogénico y responden con dilatación y vasoproliferación. La conexión arterial se establece poco después y el tejido que rodea a los vasos se hace nuevamente translúcido. A continuación tiene lugar el crecimiento del tumor.

En el período de crecimiento casi todos los tumores parecen desarrollar redes caóticas que se conectan con la red arterial y con la red venosa. Las venas están generalmente dilatadas y por ello son los vasos más conspicuos; las arteriolas en cambio forman canales finos lo cual hace difícil su visualización.

El crecimiento del sistema vascular se produce por brotación desde los vasos del huésped; estos brotes vasculares se desarrollan tanto alrededor del tumor como en su periferia. La vascularización tumoral constituye un proceso dinámico en el cual los patrones de crecimiento parecen no tener sentido: pueden aparecer nuevos vasos en forma súbita, mientras que otros vasos se dilatan o comprimen a medida que se produce su alargamiento.

Los trabajos realizados con tumores implantados en cámaras transparentes, demostraron que la forma de los vasos queda determinada en gran medida por el patrón de crecimiento de las células tumorales (5).

Los melanomas se vascularizan rápidamente entre los 3 y 4 días posteriores al trasplante. Los primeros vasos en aparecer son capilares delgados y extremadamente tortuosos. Los capilares, precapilares y postcapilares se extienden a través de distancias relativamente largas sin que se bifurquen y las uniones se producen casi siempre en ángulos agudos. El patrón vascular básico es radial.

Los carcinomas crecen en forma lobulada y tienden a formar túbulos; los vasos adquieren un patrón reticular, siendo común encontrar amplios sinusoides. Los capilares de los tumores mamarios de roedores no penetran el parénquima y la vascularización se produce predominantemente en el perímetro del tumor (6).

El carcinoma de células escamosas tiene gran tendencia a formar una "superficie invertida"; la queratina se libera en el centro del tumor, formando un área central que contiene restos celulares. Las células tumorales forman cordones entre los cuales se dirigen los capilares que conectan con vasos mayores ubicados en la periferia del tumor; estos capilares adoptan la forma de un bucle que frecuentemente está dilatado en su zona más extrema, debido a la disminución de la presión tisular en el centro necrótico del tumor.

Los sarcomas, por su parte, forman en general masas celulares entrelazadas; muchas veces se observan áreas homogéneas de células indiferenciadas. Los capilares son alargados y se comprimen por el crecimiento de la masa tumoral, lo que origina un centro tumoral isquémico que luego deviene necrótico.

La microcirculación tumoral posee una serie de propiedades distintivas. Un hallazgo notable es la forma aparentemente azarosa en la que el flujo sanguíneo se dirige a lo largo del tumor. Puede haber un flujo rápido en algunos vasos de la periferia, dependiendo de la distancia a la cual las arteriolas penetran en el tumor; sin embargo esta sangre con frecuencia drena directamente en sinusoides. Algunos tumores, como los carcinomas mamarios de ratón y rata, muestran excesiva proporción de sinusoides; en éstos el flujo sanguíneo es de solo 100 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (7). En contraste con los sinusoides amplios y bien visibles están las delgadas arteriolas, en las que el flujo sanguíneo tiene una velocidad de aproximadamente 650 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (8). Debido al flujo laminar, la orientación de los eritrocitos es tal que la absorción óptica está muy disminuída y por ello estos vasos se observan con gran dificultad. Lo mismo se aplica a aquellos capilares tumorales muy delgados cuyo contenido es principalmente plasma.

En los tumores ocurren una serie de hechos casi al mismo tiempo. Mientras que en la periferia tiene lugar el proceso de neovascularización, otros factores disminuyen la densidad vascular y el flujo sanguíneo: a causa de una proliferación celular continúa la presión tisular aumenta, lo que lleva a la compresión de los vasos sanguíneos en la zona central del tumor. Por otra parte se produce un alargamiento de los vasos aparentemente no compensado por mitosis, lo cual produce el adelgazamiento de las paredes vasculares (9).

El alargamiento de los vasos implica que la sangre debe recorrer un camino más largo para llegar a las áreas centrales del tumor. La compresión de los vasos, en combinación con el alargamiento de éstos, dá como resultado una disminución en el flujo sanguíneo y eventualmente el desarrollo de isquemia en el centro del tumor; esto va seguido inevitablemente por la formación de un foco de necrosis. Una vez que la necrosis se ha desarrollado, la presión tisular disminuye en esa zona y los vasos sanguíneos que rodean el área necrótica pueden expandirse nuevamente; como resultado de una presión sanguínea mayor en el lado aferente que en lado eferente de los vasos, se forman los lagos sanguíneos que se observan con frecuencia en los tumores (10). El estímulo angiogénico en la zona

central de los tumores probablemente no sea lo suficientemente potente como para que las células tengan un adecuado aporte sanguíneo, aún cuando todos los factores que gobiernan la angiogénesis puedan estar presentes en abundancia.

En conclusión, las diferencias en el patrón vascular en los distintos tumores están gobernadas por la combinación de, al menos, tres factores:

- 1- el patrón de crecimiento de las células tumorales.
- 2- la influencia de la presión intersticial en las distintas áreas del tumor sobre los movimientos de fluido intersticial y sobre la compresión de los vasos sanguíneos.
- 3- la efectividad del estímulo angiogénico liberado por el tumor y la influencia de posibles estímulos para la migración de células endoteliales.

Las diferencias en la contribución relativa de estos factores determina en gran parte el desarrollo del patrón vascular, específico para cada tumor.

3. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis tumoral. Actividad Angiogénica en tumores primarios y en sus metástasis.

3.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE EXPLANTOS TUMORALES SOBRE MCA

En nuestro laboratorio contamos con un modelo de adenocarcinoma mamario murino singeneico en cepa BALB/c, espontáneo, transplantable y de mediana capacidad metastásica en pulmón (M3) y de una variante obtenida experimentalmente con alta incidencia de metástasis pulmonares (MM3). Era de interés establecer si en este modelo se podía detectar actividad angiogénica, tanto en el tumor primario subcutáneo como en las metástasis pulmonares respectivas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 30 embriones de pollo de 8 días. La técnica empleada comprendió los siguientes pasos:

- 1- El sitio de la implantación y la zona de la cámara de aire se limpiaron con alcohol.
- 2- Se hizo una pequeña perforación en la cáscara en ambas zonas.
- 3- Se aplicó succión con un bulbo de goma en la perforación de la cámara aérea, creándose así una falsa cámara de aire en el diámetro mayor del huevo, por debajo de la segunda perforación.
- 4- En esa zona se delimitó una ventana de aproximadamente 1 cm², se removió la cáscara y la membrana pelúcida. con lo cual quedó expuesta la MCA, que había bajado luego de su separación de la cáscara.
- 5- Sobre la MCA se colocó un filtro Millipore estéril de 0,25 mm de radio, cuyo tamaño de poro es de 0,45 μ m.

- 6- Se cortaron pequeños explantos (1mm^3) de los tumores en estudio, se lavaron con PBS y se colocaron sobre el filtro. Como tejido control se utilizaron explantos de corazón murino. Un segundo control consistió en filtros Millipore embebidos en PBS.
- 7- Se selló la abertura de la falsa cámara de aire con cinta adhesiva transparente y se incubaron los embriones durante 4 días, en posición horizontal.
- 8- Al final del período de incubación se rompió la cáscara en la zona de la implantación, para exponer una amplia zona de la MCA.
- 9- Se cortó la MCA y se la extrajo cuidadosamente con ayuda de una pinza, extendiéndola en una caja de Petri, se observó la respuesta vascular y luego se fijaron las MCAs con formol al 10% en PBS.

Resultados

La prueba en MCA es cualitativa, considerándose que existe actividad angiogénica cuando se observa aumento de la vascularización en el 50% de los embriones ensayados.

La neovascularización en MCA se presenta como una zona muy densa en capilares, distribuidos radialmente alrededor del fragmento tumoral.

Los resultados obtenidos, expresados como el número de MCA con actividad angiogénica positiva, respecto del total de membranas ensayadas, se muestra en la tabla IV.1

TABLA IV.1: ACTIVIDAD ANGIOGENICA EN MCA

Muestra	MCA positivas/ total	Porcentaje de muestras positivas
Control 1	0/3	0
Control 2	0/3	0
M3-sc	6/6	100
M3-p	5/6	83
MM3-sc	4/5	80
MM3-p	6/6	100

Control 1= filtros Millipore embebidos en PBS

Control 2= fragmentos de corazón murino

sc = tumor subcutáneo

p = metástasis pulmonar

Se comprobó de esta manera la existencia de actividad angiogénica, tanto en los tumores subcutáneos como en las metástasis pulmonares.

3.2. Aislamiento del factor responsable de la actividad angiogénica.

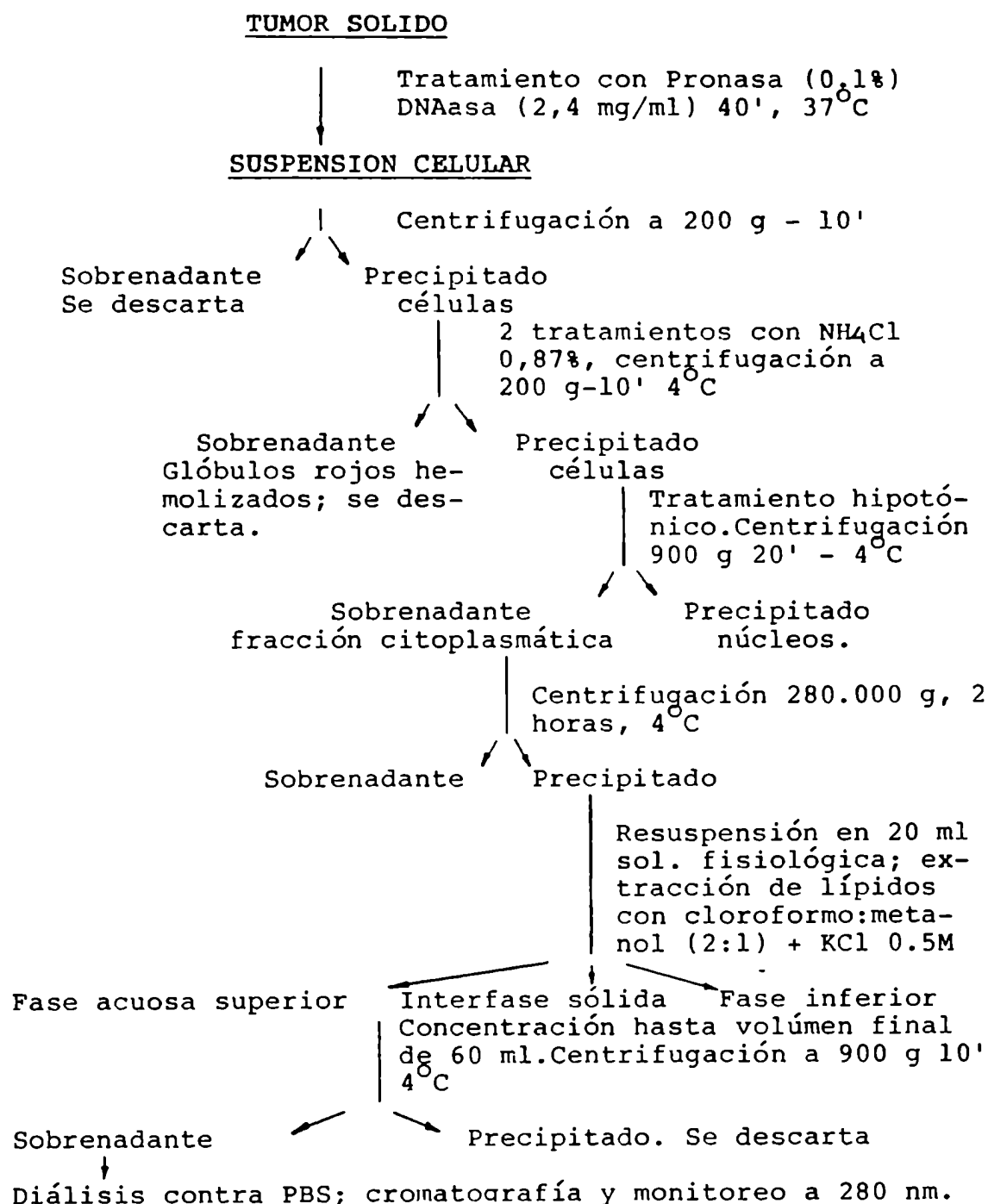
Una vez comprobada la existencia de actividad angiogénica tanto en los tumores subcutáneos como en las metástasis pulmonares respectivas, se procedió al aislamiento del factor angiogénico.

Materiales y Métodos

1. Para la obtención de una suspensión celular a partir de tumores enteros, se procedió de la siguiente manera:
 - a) Se extrajeron tumores de 50 ratones y se lavaron con solución fisiológica heparinizada (Heparina: 1mg/10ml).
 - b) Se eliminaron las zonas necróticas, los tumores se cortaron en piezas de aproximadamente 1 mm³.
 - c) Se incubó con Pronasa-DNasa en 500 ml de medio 199 (GIBCO), durante 40 minutos a 37°C sin agitación (Pronasa: 0,1%, DNasa 2,4 mg/ml).
 - d) El sobrenadante se centrifugó a 200 g, durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en medio 199.
2. Para lisar los glóbulos rojos se hicieron dos lavados sucesivos con una solución de NH₄Cl 0,87% en volumen igual al de la suspensión celular. Se centrifugó a 200 g, durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizó luego un lavado con medio 199, centrifugando a 200g durante 10 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante.
3. Para lisar las células tumorales se hizo un tratamiento hipotónico. Para ello se resuspendió el pellet en solución hipotónica (solución fisiológica diluída al medio).
4. Se centrifugó a 900 g durante 20 minutos, a 4°C, para separar la fracción nuclear de la fracción citoplasmática. Se testeó la actividad angiogénica de ambas fracciones.
5. La fracción citoplasmática se centrifugó a 280.000 g durante 2 horas a 4°C. Se resuspendió el pellet en 20 ml de solución fisiológica.
6. Los lípidos se removieron por adición de 100 ml de Cl₃CH: CH₃OH (2:1) y 0.2 ml ClK (0,5 M). La mezcla se centrifugó a 900 g durante 5 minutos a 4°C.

7. Se aspiró la fase acuosa superior y la interfase sólida con metanol. Ambas se concentraron por calentamiento a 37°C, hasta llegar a un volúmen final de 60 ml.
8. El concentrado se centrifugó a 900 g durante 10 minutos a 4°C, descartándose el precipitado.
9. El sobrenadante se dializó contra PBS, con varios cambios, durante 3 días. Se testeó la presencia de actividad angiogénica.
10. El dializado se cromatografió en una columna Sephadex G-100 (3,5 x 100 cm) en presencia de PBS. El eluyente se monitoreó a 280 nm y se concentró por liofilización.
11. Las fracciones obtenidas se testearon en MCA.

GRAFICO IV.1: AISLAMIENTO DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANGIOGENICA A PARTIR DE TUMORES SOLIDOS



Resultados

A lo largo del proceso de extracción se probaron distintas fracciones sobre MCA, encontrándose actividad angiogénica después del tratamiento hipotónico, tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear.

La actividad angiogénica de la fracción nuclear está asociada a proteínas no histónicas, pero debido a la dificultad que presenta la técnica de purificación del factor a partir de núcleos, esta fracción se descarta. Se testeó además la presencia de actividad angiogénica en el dializado. La prueba sobre MCA fue positiva.

Después de la cromatografía a través de la columna de Sephadex G-100, se ensayaron las distintas fracciones en MCA, encontrándose actividad angiogénica en la fracción correspondiente a un peso molecular aproximado de 90 kDa. El peso molecular se determinó pasando marcadores proteicos de peso molecular conocido a través de la misma columna de Sephadex G-100.

3.3. Estudio de la actividad angiogénica de células tumorales que crecen en cultivo.

Las células tumorales producen factores angiogénicos en forma continua y éstos actúan sobre el endotelio induciendo su proliferación.

Para estudiar en forma comparativa la angiogénesis en los tumores M3 y MM3 se realizaron cultivos de ambos tumores y se probaron los medios condicionados sobre células endoteliales de aorta bovina. Como control se ensayó la actividad proliferativa del medio de cultivo condicionado por fibroblastos murinos.

Materiales y Métodos

Cultivo de tumores

Se sacrificaron los animales y se aislaron los tumores en forma estéril. Para cada cultivo se partió de un tumor.

1. Se limpió el tumor, eliminándose la cápsula y las zonas necróticas.
2. Se lo cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 .
3. Se agregaron 10 ml de solución de Pronasa (0.1%) en medio 199 (DIFCO) y 5 a 10 gotas de DNAasa (2.4 mg/ml) según la viscosidad de la preparación.
4. Se incubó a 37°C durante 30', sin agitación.
5. El sobrenadante se centrifugó durante 5' a 900 rpm.
6. El pellet se resuspendió nuevamente con solución de Pronasa-DNAasa y se incubó durante 30'. Se tomó el sobrenadante y se lo centrifugó durante 5' a 900 rpm.
7. El pellet se lavó 3 veces, con 10 ml de medio MEM (Eagle) cada vez.
8. Se resuspendió el pellet en medio de cultivo: MEM (Eagle) suplementado con 10% de SFB, glutamina (0.3 mg/ml) y gentamina (80 mg/ml). Se observó la viabilidad celular y se sembró en frascos de vidrio o en placas de Petri (Falcon).
9. Los frascos de cultivo se colocaron en estufa a 37°C . Las placas de Petri se ubicaron dentro de un gaseador en el cual la atmósfera contenía 5% de CO_2 en aire.

Las metástasis pulmonares se cultivaron con la técnica de explantos, sobre placas de Petri (Falcon).

Cultivo de fibroblastos

Los fibroblastos se aislaron desde embriones de ratón de aproximadamente 17 a 18 días de gestación.

1. La hembra preñada se mató por dislocación cervical; se abrió la cavidad peritoneal en forma estéril y se aisló el útero, el cual fue transferido a una caja de Petri.

2. Los embriones fueron separados entre sí cortando el útero en forma transversal. Se eliminaron amnios y placenta en cada uno de los embriones, estos se colocaron en una nueva caja de Petri y se lavaron con PBS.
3. Se descartaron vísceras, cola y extremidades y se lavó nuevamente con PBS para eliminar todo resto de sangre.
4. Se cortaron en pequeños fragmentos de no más de 1 mm³.
5. En un erlenmeyer se colocaron aproximadamente 10 ml de solución de tripsina al 0.3%, precalentada a 37°C.
6. Se puso un poco de tripsina en la cápsula y se recogieron los fragmentos con una pipeta Pasteur de boca ancha. Dentro del erlenmeyer se puso un imán estéril y se colocó sobre un agitador electromagnético a 37°C.
7. Después de 20' se aspiró el sobrenadante, se centrifugó a 900 rpm y se lavó el pellet dos veces con medio MEM (Dulbecco) con 5% de SFB.
8. Se hizo recuento celular y se sembraron 7×10^5 células/ml en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de SFB, glutamina y gentamina.

Aislamiento de los medios condicionados

1. Cuando las células se encontraban en el 75% de confluencia aproximadamente, se aspiró cuidadosamente el medio de cultivo y se lavó la capa de células con PBS, este lavado se repitió 3 veces.
2. Se cubrieron los cultivos con medio sin SFB. Los frascos se colocaron en agitación a 4°C, durante 3 horas.
3. Después de finalizado el período de incubación se aspiró el medio de cultivo y se lo transfirió a un tubo de ensayo.
4. Para eliminar cualquier resto celular, al final de período de incubación se centrifugó el medio durante 20 minutos a 1200 rpm.

5. Se dializó durante 48 horas a 4°C contra agua destilada con dos cambios.
6. Se midió el volumen del dializado y por otro lado se disolvieron las células con NaHO 0.1M. Se midió su contenido en proteínas con la técnica de Lowry, para estandarizar la relación entre el volumen de medio condicionado y la masa tumoral.

Cultivo de endotelio de aorta fetal bovina

Dado que el endotelio fetal responde mejor que el adulto al factor angiogénico, se realizaron cultivos de células endoteliales de aortas provenientes de fetos bovinos (de aproximadamente 5 meses de gestación), obtenidos asépticamente en el Frigorífico Rioplatense S.A., de la localidad de Pacheco (Pcia. de Bs.As.).

Materiales y Métodos

Las aortas se extrajeron estérilmente y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm; éstos fueron colocados dentro de cajas de Petri y lavados con PBS.

El procedimiento empleado consistió en los siguientes pasos:

1. Se abrieron los fragmentos aórticos a lo largo, exponiendo el endotelio. Se lavó con PBS para eliminar glóbulos rojos.
2. El endotelio se cubrió con cantidad suficiente de colagenasa (0.95%) (Sigma) y se incubó durante 5' a 37°C
3. Con ayuda de una espátula de acero, se raspó suavemente la superficie expuesta de la aorta, con el fin de desprender las células endoteliales que aún estuvieran adheridas.
4. Se agregaron aproximadamente 2 ml de medio de cultivo y se aspiró con una pipeta; se repitió este paso una vez más.

5. Se centrifugó a 900 rpm durante 5 minutos.
6. El precipitado se lavó dos veces con medio MEM sin suero.
7. El pellet final se resuspendió y se sembró en frascos de vidrio o en cajas de Petri (Falcon), con medio MEM suplementado con 10% de SFB, glutamina (0.3 mg/ml) y gentamina (80 mg/ml).

Los cultivos se repicaron dos veces por semana, utilizando para ello una solución de tripsina 0.25%, EDTA 0.075% en solución salina balanceada.

Se denominó al cultivo: endotelio de aorta fetal bovina, (Eafb).

Una fracción de las células se sembró en tubos Leighton, a los 4 días fueron tratadas con técnicas rutinarias de histología para estudiar la morfología celular y la pureza del cultivo.

Curva de crecimiento de las células Eafb

Para conocer la frecuencia de replicación de las células endoteliales, se sembraron $1,5 \times 10^5$ células con medio MEM suplementado con 10% de SFB, glutamina y gentamina, incubándolas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire.

Cada 24 hs., desde el inicio de la experiencia, se tomaron muestras por triplicado, en las cuales se hizo recuento celular y determinación de proteínas por la técnica de Lowry.

Los resultados se expresan en la tabla IV.2.

La frecuencia de replicación fue estimada a partir de la fórmula:

$$f = \frac{\text{Log } \frac{N_t}{N_0}}{0.301 \times t}$$

donde: N_t es el número de células en el tiempo t .

N_0 es el número de células en el tiempo 0

t es el tiempo, medido en días u horas.

Efecto de las distintas concentraciones de SFB sobre el crecimiento de las células Eafb

Cuando se quiere determinar la capacidad mitogénica de un GF, es necesario conocer primero cuál es la concentración de SFB que mantiene a las células viables, pero con una tasa de proliferación mínima.

Las células Eafb se sembraron en placas de Petri de 3 cm de diámetro (Falcon) en medio MEM suplementado con 10% de SFB. A las 3 horas se cambió el medio de cultivo por medio fresco con distintas concentraciones (5%, 2% y 1%) de SFB. Cada 24 hs se tomaron muestras por triplicado y se cuantificó la proliferación contando el número de células.

Ensayo de la actividad angiogénica sobre células Eafb

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en medio con 10% de SFB, sobre placas de Petri (Falcon) de 3 cm de diámetro y se incubaron durante 24 horas a 37°C . Una vez transcurrido este período, se cambió el medio, suplantándolo por medio con 2% de SFB y se agregaron las fracciones a testear en una concentración final del 10%. Los controles recibieron igual cantidad de PBS o de medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos.

Cada experiencia se repitió 3 veces; al final del período de incubación (en total 72 hs), se hizo recuento celular en dos placas y se midió el contenido en proteínas en otras dos placas.

Resultados

Cultivo de tumores

Se lograron mantener en cultivo tanto los tumores subcutáneos como las metástasis pulmonares respectivas, observándose diferencias significativas en cuanto a sus características de crecimiento.

Los tumores M3 se adaptaron con facilidad a las condiciones del cultivo y llegaron a confluencia más rápidamente que los tumores MM3, lo que confirma su comportamiento in vivo.

En cuanto a la capacidad de ser repicadas, los cultivos de células MM3 difícilmente soportaron más de 2 ó 3 pasajes in vitro, mientras que las células M3 llegaron en algunos casos hasta el pasaje número 15 sin alteración en el patrón de crecimiento.

Cuando se pusieron las células en presencia de medio de cultivo sin suero, las M3 no presentaron cambios en su morfología, mientras que las células MM3 tendieron a perder adhesión al substrato y a redondearse dentro de las 24 hs. Por este motivo los medios condicionados se aislaron después de transcurridas sólo 4 hs. desde el momento en que se colocaron en medio sin suero; en este lapso tanto la morfología celular como la viabilidad permanecieron inalteradas.

Las metástasis pulmonares se cultivaron con la técnica de explantos, dado lo escaso del material de partida. El crecimiento fue lento en ambos tumores y los cultivos no llegaron a formar monocapa, deteniendo su crecimiento al alcanzar aproximadamente un 85% de confluencia. Estas células no pudieron ser repicadas, ya que si bien mantenían la viabilidad después del tratamiento con tripsina, en ningún caso proliferaron en las nuevas placas.

Cultivo de células Eafb

Las células endoteliales se desprendieron desde la íntima en forma de láminas de tamaño variable, siendo común observar entre 10 y 20 células que permanecían fuertemente unidas entre sí, aún cuando se las hiciera pasar varias veces a través de una pipeta Pasteur de punta fina.

La viabilidad de la suspensión fue de un 90% aproximadamente. Se obtuvieron cultivos muy puros con escasa contaminación con otros tipos celulares, generalmente células musculares que pudieron eliminarse fácilmente con ayuda de una varilla de punta redondeada, con la cual se las despegó del substrato.

Las células Eafb se adaptaron perfectamente a las condiciones de cultivo, repicándolas dos veces por semana, en una relación 1:3. Después de un tratamiento suave con tripsina (3 minutos a temperatura ambiente), las células se desprendieron del substrato formando láminas similares a las observadas cuando se realizó el cultivo primario.

El estudio histológico mostró células con morfología aproximadamente triangular, extremos ahusados, citoplasma claro, extendido, con vesículas en cuyo interior se encontraron gran variedad de inclusiones, lo que indica una alta actividad fagocítica. El núcleo es oval, de posición central, con cromatina granular y dos a tres nucleolos prominentes, que se ubican a lo largo del eje mayor del núcleo.

Tabla IV.2: Curva de crecimiento de células Eafb

Tiempo hs	Proteínas/placa (mg) $\bar{X} \pm$ S.E.	Nº de células/placa ($\times 10^{-3}$) $\bar{X} \pm$ S.E.
24	89.2 \pm 1.3	108 \pm 5
48	148.5 \pm 0.9	290 \pm 17
72	385.2 \pm 2.1	626 \pm 29
96	486.1 \pm 1.7	730 \pm 23

En base a los datos de la tabla IV.2 se calculó la frecuencia de replicación (f) de las células Eafb. El valor obtenido ($f = 1.27$) indicó que la población celular proliferaba activamente in vitro, lo que la hacía apta para ser usada en un ensayo de proliferación.

Tabla IV.3: Efecto de la concentración de SFB sobre el crecimiento de células Eafb

Tiempo (hs)	N° de células ($\times 10^{-3}$) \pm S.E.		
	5% SFB	2% SFB	1% SFB
24	109 \pm 3	110 \pm 2	75 \pm 1
48	215 \pm 11	117 \pm 2	63 \pm 2
72	357 \pm 11	138 \pm 1	65 \pm 3
96	362 \pm 10	143 \pm 3	41 \pm 2

Desde los resultados expresados en la Tabla IV.3, se decidió que la concentración óptima de SFB para mantener a las células Eafb en estado quiescente era del 2%. Con 5% de SFB se produce una notable proliferación celular, mientras que una concentración del 1% de SFB es insuficiente para mantener a las células en cultivo.

Tabla IV.4: Ensayo de los medios condicionados sobre células Eafb.

Muestra	N° de células por placa		Contenido en proteínas por placa (mg)		N
	\bar{X}	\pm S.E.	\bar{X}	\pm S.E.	
Control 1	134,66	\pm 5,10	92,1	\pm 2.1	9
Control 2	143,55	\pm 3,21	95,3	\pm 1.7	9
M3 -sc	183,22	\pm 2,40	118,2	\pm 0.8	9
MM3-sc	241,22	\pm 4,17	155,6	\pm 1.9	9
M3-p	242,11	\pm 2,51	146.2	\pm 1.2	9
MM3-p	259,33	\pm 6,33	161.2	\pm 1.9	9

Control 1: PBS
 Control 2: Medio condicionado por fibroblastos de ratón.
 M3-sc. : Medio condicionado por células M3 (tumor primario)
 MM3-sc. : Medio condicionado por células MM3 (tumor primario)
 M3-p : Medio condicionado por células M3 (metástasis pulmonar)
 MM3-p : Medio condicionado por células MM3 (metástasis pulmonar)

Los resultados expresados en la tabla IV.4 fueron analizados con un Anova unidireccional. Se realizaron contrastes entre los distintos grupos experimentales por método de Bonterroni. Los valores críticos se buscaron en una tabla de distribución de t. Las comparaciones entre grupos arrojaron los siguientes resultados:

Control 1	- Control 2	= N.S.
M3-sc	- Control	= N.S.
MM3-sc	- Control	= diferencias significativas ($p < 0.01$)
M3-p	- Control	= diferencias significativas ($p < 0.01$)
MM3-p	- Control	= diferencias significativas ($p < 0.01$)
M3-sc	- MM3-sc	= diferencias significativas ($p < 0.05$)
M3-sc	- M3p	= diferencias significativas ($p < 0.05$)
MM3-sc	- MM3p	= N.S.
M3-p	- MM3p	= N.S.
M3-p	- MM3-sc	= N.S.

Si bien no existen diferencias significativas entre los grupos M3-sc y control, se puede apreciar una tendencia hacia el incremento en la actividad mitogénica cuando se ensayan medios condicionados por células del tumor primario M3 (M3sc). En cambio, la proliferación inducida por medios condicionados MM3sc, difiere significativamente con respecto a los controles ($p < 0.01$).

Cuando se analizan los resultados obtenidos al ensayar medios condicionados por células metastásicas, se demuestra que el medio condicionado M3-p induce una actividad mitogénica significativamente diferente con respecto a los controles ($p < 0.01$) y también con respecto al tumor primario (M3sc), ($p < 0.05$). Por otro lado, el medio condicionado MM3p induce un incremento en la proliferación

de células endoteliales significativamente diferente de los controles ($p < 0.01$) aunque similar (N.S) al del tumor de origen (MM3sc).

Cuando se comparan los tumores primarios entre sí (grupos M3sc y MM3sc) se encuentran diferencias significativas en la actividad mitogénica ($p < 0.05$), lo que demuestra un aumento en la capacidad de inducir proliferación de células endoteliales en el tumor más metastásico (MM3sc).

La diferencia en los resultados obtenidos al ensayar medios condicionados M3sc y M3p ($p < 0.01$), puede estar indicando la presencia, en el tumor primario, de una población con mayor actividad angiogénica que sería la que predomina en el foco metastásico.

En el tumor MM3, en cambio, los valores de actividad proliferativa sobre células endoteliales se mantienen relativamente constantes y no se diferencian entre el tumor subcutáneo y la metástasis pulmonar. Tampoco difieren en forma significativa de los valores obtenidos al ensayar los medios condicionados por células M3p. Dado que el tumor MM3 deriva del tumor M3, se puede suponer que en el proceso de selección se han visto favorecidas aquellas células que, entre otras características importantes para el proceso metastásico, fueran capaces de inducir una mayor actividad angiogénica.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Auspunk D., Knighton D., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. *Am. J. Pathol.* 79: 597, 1975.
2. Goddall C., Sanders A., Shubik P.: Studies of vascular patterns in living tumors with a transparent chamber inserted in hamster cheek pouch. *J. Natl. Cancer Inst.* 35: 497, 1965.
3. Reinhold V., Vander Berg B.: Vascularization of experimental tumors. En: *Development of the vascular system*, pág. 100, 1983. Pitman Books, London. (Cyba Foundation Symposium 100).
4. Endrich B., Reinhold H., Gross I., Intaglietta M.: Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 387, 1979.
5. Endrich B., Messner K.: Microcirculation of transplanted tumors. *Drug. Res.* 31: 2007, 1981.
6. Falk P.: Patterns of vasculature in two pairs of related fibrosarcomas in the rat and their relation to tumor responses to single large doses of radiation. *Eur. J. Cancer* 14: 237, 1978.
7. Reinhold H.: In vivo observations of tumor blood flow. En: *Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors*. Pag. 115, 1981. Editado por H. Peterson. CRC Press, Boca Raton, Florida.
8. Folkman J., Long D., Becker F.: Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16: 453, 1963.
9. Gimbrone M., Leapman S., Cotran R., Folkman J.: Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136: 261, 1972.
10. Knighton D., Ausprunk D., Tapper D., Folkman J.: Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *Br. J. Cancer* 35: 347, 1976.

11. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig: Actividad angiogénica en tumores mamarios murinos y en sus metástasis. Medicina 41: 676, 1981.

CAPITULO V

ANGIOGENESIS INDUCIDA POR COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE

<u>INDICE</u>	Pág.
1. Angiogénesis inducida por macrófagos.	129
2. Angiogénesis inducida por mastocitos.	130
2.1. Estimulación de los mastocitos sobre la migración de células de endotelio capilar in vitro.	130
2.2. La heparina promueve la angiogénesis tumoral.	131
2.3. Inhibición de la angiogénesis con administración combinada de heparina y corticosteroides.	131
2.4. Degradación de la heparina por administración oral.	132
3. Angiogénesis inducida por linfocitos.	133
4. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis inducida por linfocitos.	135
4.1. Angiogénesis inducida por linfocitos de portadores de tumor en una combinación singeneica.	135
4.2. Correlación entre la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA) y la capacidad metastásica.	140
4.3. Especificidad del estímulo activador de las células esplénicas.	145
4.4. Activación de SLIA por células tumorales formolizadas.	147
4.5. Actividad angiogénica en los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas aisladas desde ratones portadores de tumor.	150

4.6. Estudio de las poblaciones esplénicas responsables de la liberación de factores con actividad angiogénica.	154
4.7. Rol de los macrófagos en la reacción de SLIA.	160
5. Bibliografía.	166

1. Angiogénesis inducida por macrófagos

Cuando se inoculan macrófagos activados en la córnea de animales singeneicos y medios condicionados por estas células, se produce una intensa neovascularización (1). Diversos trabajos han demostrado que esta respuesta no está asociada con una reacción inflamatoria aguda (2-4).

Se ha demostrado además que la disminución en la tensión de oxígeno estimula a los macrófagos para que produzcan factores angiogénicos. Así, tanto los tumores, como las heridas, la inflamación o la reducción del flujo sanguíneo, crean condiciones locales de hipoxia que promueven la llegada de macrófagos; la respuesta vascular que éstos inducen, reestablece las condiciones normales de tensión de oxígeno y con ella se inactiva el sistema (5-6).

La actividad angiogénica producida por macrófagos activados es neutralizada completamente con un anticuerpo anti-TNF- α , lo que sugiere que este factor es el responsable de la respuesta neovascular (7).

La expresión de TNF- α por los monocitos requiere la activación de estas células, por ejemplo con IFN-gamma o endotoxina.

Las plaquetas contienen TGF- β en sus gránulos alfa y los liberan localmente en los sitios de injuria celular; a su vez el TGF- β posee una fuerte actividad quimiotáctica sobre los monocitos de sangre periférica y los induce a expresar actividad angiogénica, a través de la liberación de factores solubles, uno de los cuales es el TNF- α .

2. Angiogénesis inducida por mastocitos

Los mastocitos residen generalmente en la cercanía de vénulas y capilares maduros; además, en los procesos que involucran un rápido crecimiento capilar tales como inflamación crónica, psoriasis o en la vascularización de los tumores, se observa un aumento pronunciado en las poblaciones de mastocitos.

Cuando se implantan extractos tumorales en MCA, se observa un incremento de hasta el 40% en la densidad de mastocitos en la zona que rodea al inóculo; estas células aparecen aproximadamente 24 hs. antes que se produzca la llegada de capilares. Los mastocitos purificados con un gradiente de Ficoll (90% de pureza) no inducen angiogénesis en la MCA. Estos resultados indican que los mastocitos facilitan el crecimiento capilar, pero son incapaces de iniciarlo (8).

2.1. Estimulación de los mastocitos sobre la migración de células de endotelio capilar in vitro.

Como se mencionó anteriormente, la migración direccional de las células endoteliales es uno de los primeros eventos en la formación de un brote capilar. Cuando las células endoteliales se incuban con lisados de mastocitos o con medio condicionado por mastocitos, su capacidad de migración se vé incrementada. Se ha demostrado además que el co-cultivo de células tumorales con mastocitos produce la degranulación de éstos y la liberación de distintas sustancias, histamina, condroitín sulfato, heparina, tripsina, quimiotripsina, etc. De todas ellas sólo la heparina promueve en forma significativa la migración endotelial (9).

La actividad migratoria de la heparina o de los medios condicionados por mastocitos sobre las células endoteliales es anulada por completo con inhibidores específicos de la heparina tales como protamina y heparinasa.

2.2. La heparina promueve la angiogénesis tumoral in vivo.

La heparina puede aumentar la angiogénesis inducida por extractos tumorales implantados en la MCA y la angiogénesis inducida por células no neoplásicas (adipocitos)

Mientras que la heparina no puede por sí sola iniciar la angiogénesis, parece adquirir esa capacidad cuando se une a iones Cu^{++} (10).

2.3. Inhibición de la angiogénesis con administración combinada de heparina y corticosteroides

Generalmente se emplea cortisona para eliminar la inflamación que aparece, tanto en MCA como en córnea, cuando se realiza el ensayo de angiogénesis. Como se mencionó anteriormente, la cortisona no inhibe la respuesta angiogénica. Sin embargo, si se la aplica en forma combinada con heparina se observa una inhibición total de la angiogénesis y la aparición de una zona avascular con regresión de vasos sanguíneos. Cuando se coloca un filtro embebido en esta combinación se puede comprobar regresión vascular sobre los vasos del saco vitelino de embriones muy jóvenes. Por el contrario, los vasos maduros, que detuvieron su crecimiento, (MCA de embriones de 10 días o más) no son afectados. Este efecto antiangiogénico es independiente de la actividad anticoagulante de la heparina.

Los estudios realizados con fragmentos de degradación de la heparina, demostraron que un hexasacárido de PM 1,6 kDa sin función anticoagulante posee actividad antiangiogénica. Cuando se combina este fragmento con cortisona, se observa inhibición de la angiogénesis tumoral. Además, la inoculación del hexasacárido combinado con cortisona en ratones con tumor palpable produjo regresión de la masa tumoral (11).

2.4. Degradación de la heparina por administración oral

Dada la imposibilidad de producir cantidades suficientes del hexasacárido, se buscaron vías alternativas para conseguir la degradación de la molécula de heparina, con el fin de eliminar la actividad anticoagulante.

La heparina administrada en forma oral carece de actividad anticoagulante y se libera en circulación como fragmentos pequeños. Se pudo demostrar que el tratamiento combinado de heparina con cortisona o hidrocortisona tiene efecto antiangiogénico. Así se demostró que el carcinoma de pulmón de Lewis y un carcinoma de vejiga regresionan con un tratamiento de heparina en forma oral y cortisona s.c., siendo posible erradicar los tumores en el 50% de los ratones tratados; en estos animales no se observa recurrencia después de finalizar el tratamiento y el número de metástasis pulmonares se reduce notablemente con respecto a los controles.

La respuesta al tratamiento depende de la dosis empleada, ya que con dosis altas se produce un rápido crecimiento de la masa tumoral. Esto indica que la heparina actúa como regulador tanto positivo como negativo del proceso angiogénico.

En cuanto a la cortisona, el efecto antiangiogénico es independiente de la actividad glucocorticoide; el 11-alfa-epicortisol, que no tiene actividad gluco ni mineralocorticoide (por haberse desplazado el grupo 11-hidroxilo de la posición beta a la alfa) retiene su actividad antiangiogénica cuando se la administra junto con la heparina (ver capítulo II).

3. Angiogénesis inducida por linfocitos

La reacción de transferencia de linfocitos normales se caracteriza por la aparición de induración, eritema y tumefacción y representa una reacción local de injerto contra huésped (12). Cuando se modifican las condiciones del ensayo inoculando una dosis menor de células en un huésped irradiado, se observa después de 2 ó 3 días una respuesta vascular caracterizada por aumento en el número de vasos sanguíneos, aparición de divaricaciones y actividad acentuada de las células del endotelio capilar. Esta reacción, desencadenada por la inoculación de células inmunocompetentes en huéspedes alogeneicos o semialogeneicos, se conoce como angiogénesis inducida por linfocitos (lymphocyte-induced angiogenesis, LIA), habiéndose demostrado que tanto los timocitos resistentes a los corticosteroides, como las células de bazo timo-dependientes y las células de nódulos linfáticos son responsables de la inducción de la respuesta neovascular. Por otro lado, las células alogeneicas aisladas desde médula ósea, las células de donantes F1 inoculadas en un huésped de la línea parental y los linfocitos singeneicos, no son capaces de promover una respuesta angiogénica (13).

La reacción de LIA se produce cuando existen diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad entre el huésped y el donante. En el ratón, la mayor respuesta se obtiene cuando las diferencias en el H-2 se presentan en la región Ia; diferencias en las regiones K, D, Ib ó Ic, ya sea separadamente o en distintas combinaciones, sólo llevan a respuestas débiles.

La estimulación de los linfocitos donores es llevada a cabo principalmente por células circulantes del huésped, aunque también intervienen en menor medida células endoteliales, las cuales expresan determinantes antigénicos de la región I (14).

Al estudiar las distintas poblaciones linfocitarias, se demostró que las células responsables de inducir una respuesta vascular en el huésped son Thy 1+; Lyt 1+2-. Esto, junto con la determinación de disparidad en el locus Ia, coloca a las células efectoras del LIA dentro de la clase de células T productoras de linfoquinas (15).

Si en el LIA intervienen mediadores solubles, posiblemente las reacciones neovasculares asociadas con diversas enfermedades (tales como artritis reumatoidea, linfadenopatías, enfermedades oculares y reacciones inflamatorias) tengan como característica en común la liberación de linfoquinas angiogénicas desde los linfocitos T activados.

4. Aportes experimentales del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis inducida por linfocitos.
- 4.1. Angiogénesis inducida por linfocitos de portadores de tumor en una combinación singeneica.

Una de las condiciones más importantes para el desarrollo de un tumor es la de contar con un aporte sanguíneo adecuado.

Dado que las células de nódulos linfáticos sensibilizadas con mitógenos o antígenos promueven angiogénesis in vivo (16-17), quisimos determinar si la presencia de un tumor es también capaz de estimular a los linfocitos del huésped para que éstos, a su vez, induzcan una respuesta neovascular.

Para estimular a los linfocitos se inocularon ratones BALB/c con tumor M3; para medir la respuesta neovascular de los linfocitos estimulados se usaron ratones singeneicos normales.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, machos o hembras de 3 a 6 meses de edad, de las cepas BALB/c y C57Bl/6, pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo".

Portadores de tumor

Mediante un trócar se inoculó el tumor M3 en forma s.c.

El tiempo de portación fue variable (de 24 hs. hasta 25 días).

Controles

Se realizaron tres tipos de control:

1. Portadores de tejido normal: Se inoculó tejido normal singeneico (riñón, glándula mamaria, músculo esquelético) por trócar en ratones de la cepa BALB/c. El tiempo de portación del tejido normal fue de 24 ó 48 hs.
2. Control singeneico: ratones normales de la cepa BALB/c, que no recibieron ningún tipo de inóculo.
3. Control alogeneico: ratones normales de la cepa C57Bl/6, que no recibieron ningún tipo de inóculo.

Suspensiones de linfocitos

Para cada ensayo se preparó un pull de linfocitos a partir de tres bazos.

1. Los ratones portadores de tumor y los controles se mataron por dislocación cervical.
2. Los bazos se extrajeron estérilmente y se cortaron en pequeños fragmentos; éstos se hicieron pasar a través de una malla de acero inoxidable agregando medio 199 sin suero.
3. Se determinó la viabilidad de la suspensión con Trypan Blue y se hizo recuento celular, efectuando las diluciones necesarias para llevar las células a una concentración de 4×10^6 en 0.1 ml de medio 199.

Inoculación de las suspensiones

Las células esplénicas se inyectaron i.d. en ratones normales singeneicos; estos se denominaron ratones receptores. Cada animal recibió dos inyecciones, en la zona media de cada flanco.

Evaluación de la respuesta neovascular

Cinco días después de las inyecciones intradérmicas, los animales recipientes se sacrificaron con éter. La piel fue cuidadosamente separada de los tejidos

adyacentes y la reacción vascular se observó en la cara interior de la misma con ayuda de un microscopio de disección (WILD) con un aumento de 6.4X

La reacción de neovascularización es fácilmente detectable pues se caracteriza por un aumento en el número de capilares y por la presencia de gran cantidad de divariaciones alrededor de la zona de inyección.

El método empleado para cuantificar la reacción neovascular se basó en la determinación de la densidad de vasos por mm^2 de piel. Para ello se tomaron fotografías (diapositivos) de la piel, colocando el sitio de inoculación en el centro de la foto. Estas fueron proyectadas sobre una pantalla reticulada en la que cada cuadro correspondía a una superficie de 1 mm^2 . Se contó el número de vasos de cada cuadrado siguiendo el criterio de Auerbach (13); las observaciones se hicieron a doble ciego.

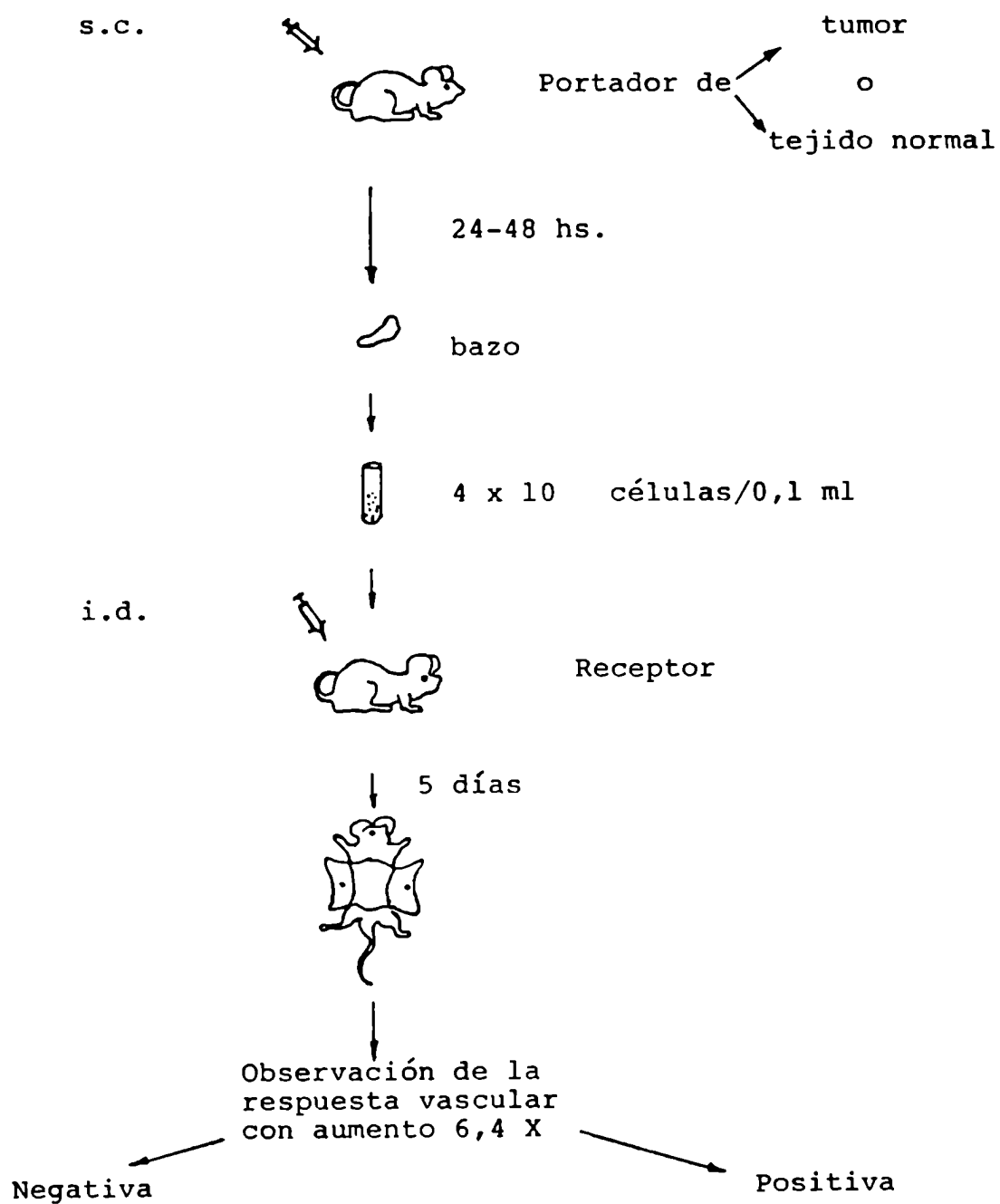
La densidad de vasos (d) alrededor de cada sitio de inoculación se determinó con la fórmula:

$$d = \frac{\Sigma \text{número de vasos sanguíneos en cada cuadrado}}{\text{número de cuadrados}}$$

Análisis estadístico

Los valores de densidad de vasos por mm^2 de piel fueron analizados por el test t de Student.

ESQUEMA GENERAL DEL ENSAYO DE LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS



Resultados

Tabla V.4.1. Respuesta vascular inducida intradérmicamente en ratones BALB/c.

Origen de las células esplénicas.	Densidad de vasos (N ^o de vasos/mm ² de piel) $\bar{X} \pm S.E.$	Numero de sitios inoculados
1	2.78 + 0.06	24
2	1.51 \pm 0.07	25
3	2.81 \pm 0.09	20
4	1.53 \pm 0.06	20

1. ratones portadores de tumor.
2. ratones portadores de implantos de tejido normal (control normal)
3. ratones C57Bl/6 (control positivo: combinación alogeneica).
4. ratones BALB/c (control negativo: combinación singeneica).

Como muestra la tabla V.4.1, la respuesta vascular inducida por las células esplénicas de ratones portadores de tumor es significativamente diferente ($p < 0.001$) de la inducida por células esplénicas de ratones portadores de implantos de tejido normal. Por otro lado se puede observar que los linfocitos de animales portadores de tumor evocan una respuesta neovascular similar al control positivo (combinación alogeneica).

La reacción neovascular se caracteriza por un aumento en el número de vasos y por cambios morfológicos visibles, tales como tortuosidad y aparición de divaricaciones alrededor de la zona del inóculo. Para determinar si existen diferencias en la respuesta

angiogénica a medida que el tumor se desarrolla, se realizaron ensayos con ratones portadores de tumor en distintos estadios; en todos los casos la respuesta vascular se mantuvo alrededor del mismo valor promedio.

Se comprobó así que las células esplénicas son capaces de reconocer la presencia de un tumor y que este reconocimiento se produce dentro de un período breve de portación (24 hs).

La angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (syngeneic lymphocyte-induced angiogenesis, SLIA); podría contribuir entonces al establecimiento de una adecuada vascularización, cooperando con las células tumorales especialmente en las primeros estadios de portación un tumor (18).

4.2. Correlación entre la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA) y la capacidad metastásica

Después de demostrar que los linfocitos de portadores de tumor son capaces de inducir una respuesta angiogénica, resultó interesante estudiar si existían diferencias en la reacción de SLIA entre variantes tumorales con distinta capacidad metastásica: M3 y MM3.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, hembras y/o machos, de 3 a 6 meses de edad, de la cepa BALB/c, pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo"

Suspensión de células tumorales

Se prepararon suspensiones celulares de los tumores M3 y MM3 mediante disgregación enzimática con Pronasa-DNAasa, siguiendo la técnica descrita en el capítulo IV (punto 3.3.). La viabilidad celular fue superior al 80% en todos los casos.

Las células tumorales (10^6 en 0.1 ml de medio) se inocularon s.c. en ratones BALB/c.

Controles

Se implantaron en forma s.c. fragmentos de glándula mamaria de hembra preñada singeneica.

También se emplearon como control células de riñón de ratones normales; las suspensiones se prepararon con la misma técnica seguida para disgregar las células tumorales. Las suspensiones (10^6 células en 0.1 ml de medio 199), se inyectaron s.c. en ratones BALB/c.

Suspensiones de células esplénicas

Después de transcurridas 24 hs. desde la inoculación de células tumorales o normales, los animales se sacrificaron y se extrajeron los bazos.

Para cada suspensión se utilizó un pull de linfocitos preparados a partir de por lo menos 3 bazos de ratones.

Los bazos se cortaron y pasaron a través de una malla de acero inoxidable con medio 199. Para conseguir una mejor dispersión celular, se pasó la suspensión a través de una jeringa. La viabilidad se determinó con Trypan Blue.

Una gota de colorante Trypan Blue se agregó a la suspensión final para facilitar posteriormente la ubicación del sitio de inyección.

Cultivo de células esplénicas

Las suspensiones de células esplénicas de ratones inoculados con tumor M3 ó MM3, en una concentración final de 3×10^6 cél/ml, se sembraron en placas de Petri de 30mm (Falcon). Los cultivos se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 con atmósfera húmeda. La viabilidad celular de los cultivos se determinó en algunas muestras con Trypan-Blue.

El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

Histología

Inmediatamente después del sacrificio, los bazo de ratones portadores de tumor se aislaron y fijaron en solución de formaldehído y ácido pícrico durante 18 hs.

El material fue deshidratado en etanol; después de embeberlo en parafina, se cortaron los bazo en secciones de 3 μ m de ancho y se analizaron los cortes seriados, teñidos con hematoxilina-eosina.

Ensayo de SLIA

Las células esplénicas (4×10^6 en 0.1 ml de medio 199) fueron inyectadas i.d. en ratones normales singeneicos. Estos animales fueron llamados "ratones receptores". Cada ratón recibió dos inyecciones, cada una en la zona media de los flancos.

Cinco días más tarde los ratones receptores se mataron con éter; la piel se separó cuidadosamente y se la examinó bajo un microscopio de disección (Wild) con un aumento de 6.4X.

Cuantificación de la vascularización - Análisis estadístico

Se realizó de la misma forma que en el trabajo de la sección V.4.1.

Resultados

Tabla V.4.2. Respuesta vascular inducida en ratones receptores

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
Ratones inoculados con:		
Cél. tumorales MM3	3.76 \pm 0.13	17
Cél. tumorales M3	2.72 \pm 0.07	18
Cél. normales	1.58 \pm 0.08	19

Para estudiar si la mayor incidencia metastásica del tumor MM3 se podía correlacionar con una mayor capacidad angiogénica se comparó la respuesta vascular inducida en la piel de ratones singeneicos, por células esplénicas activadas con células tumorales M3 ó MM3.

Como se puede observar en la tabla V.4.2., la respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones inoculados con tumor MM3 está aumentada significativamente ($p < 0.001$) con respecto a la respuesta vascular obtenida al ensayar células esplénicas de ratones inoculados con células de tumor M3. Por otra parte la respuesta vascular inducida por linfocitos estimulados por células tumorales (M3 ó MM3) fue significativamente diferente de la respuesta inducida por los linfocitos de ratones controles ($p < 0.001$).

En este modelo entonces, la línea tumoral con mayor incidencia metastásica es la que posee una actividad angiogénica superior a la de la línea poco metastásica; la diferencia observada podría deberse a una mayor retención de células neoplásicas en el bazo de los ratones portadores de tumor MM3. Para descartar esta posibilidad se realizaron cultivos celulares y análisis histológicos de los bazos de ratones inoculados con ambos tipos de tumor;

estos estudios demostraron la ausencia de células neoplásicas en el momento de utilización de los bazos para el ensayo del SLIA (18).

La generación de metástasis por las células tumorales es el resultado final de un proceso de múltiples pasos, cada uno de los cuales está controlado por propiedades de la célula metastásica y en parte también por las linfoquinas liberadas desde los linfocitos estimulados, capaces de generar una reacción vascular.

En este modelo, los resultados obtenidos sugieren que el proceso metastásico podría ser facilitado por los linfocitos estimulados que actuarían sinérgicamente con las células tumorales en el desarrollo de una adecuada red vascular (19).

4.3. Especificidad del estímulo activador de las células esplénicas

Una vez comprobada la reacción de SLIA con los tumores M3 y MM3 surgió una pregunta clave: la activación de las células esplénicas se produce sólo ante la presencia de células tumorales, o cualquier estímulo antigénico es capaz de desencadenar una respuesta neovascular?.

Para clarificar este tema, se ensayó la reacción de SLIA usando como estímulo inductor antígenos xeno, alo y singeneicos.

Materiales y Métodos

Se siguió el procedimiento detallado en la sección 4.1, variando el tipo de inóculo en los ratones portadores (BALB/c).

Tejidos inoculados en los ratones portadores

Estímulo xenogeneico: glóbulos rojos de carnero. Se inocularon 10^8 cels en 0.1 ml en forma s.c.

Estímulo alogeneico: riñón o músculo de ratones normales C57Bl/6. Se cortaron en pequeños fragmentos y se inocularon en forma s.c. con el empleo de un trócar.

Estímulo singeneico: tejido embrionario: los embriones se aislaron desde el útero, eliminando amnios y placenta y se cortaron en fragmentos pequeños, inoculándolos en forma s.c. con el empleo de un trócar.

Controles: tumor MM3 (control positivo), riñón normal BALB/c (control negativo).

Preparación de las suspensiones de células esplénicas

Los ratones portadores de los distintos tipos de inóculo se sacrificaron a las 24-48 hs. de inoculados.

Por otro lado se prepararon suspensiones de las células esplénicas de hembra preñada, para determinar si los antígenos fetales son capaces de activar a los linfocitos maternos.

Ensayo del SLIA. Cuantificación de la vascularización

Como se explicó en la sección V.4.1.

Resultados

Tabla V.4.3. Respuesta vascular inducida en ratones receptores

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
1) ratones BALB/c inoculados con:		
.Glóbulos rojos de carnero	1.62 \pm 0.07	18
.riñón C57 BL/6	1.71 \pm 0.09	14
.tejido embrionario BALB/c	1.53 \pm 0.06	14
.tumor MM3(control positivo)	3.72 \pm 0.11	14
.riñón BALB/c(control negativo)	1.59 \pm 0.08	14
2) hembra preñada BALB/c	1.62 \pm 0.09	12

Para estudiar si la reacción de SLIA se desencadena ante cualquier tipo de estímulo antigénico, se inocularon distintos tejidos en ratones normales. Desde los resultados expresados en la Tabla V.4.3, se concluye que los tejidos ensayados no son capaces de estimular a los linfocitos del ratón portador, para inducir una respuesta angiogénica como puede comprobarse al ensayar la respuesta vascular en los ratones receptores.

Las células de bazo tratadas con mitógenos (fitohemaglutinina, PHA) y las células de nódulo linfático tratadas con antígenos, inducen neovascularización cuando se las implanta en MCA; la misma respuesta se obtiene cuando se ensayan los sobrenadantes de cultivo de estas células (16, 17).

Las experiencias aquí detalladas se realizaron para descartar que en el sistema singeneico del SLIA también pudiera actuar como inductor de la respuesta angiogénica un estímulo antigénico inespecífico.

Si bien estos estudios no descartan que otros antígenos puedan promover una reacción neovascular, resulta llamativa la ausencia de respuesta angiogénica cuando se implantan glóbulos rojos de carnero como estímulo antigénico.

Como se mencionó anteriormente, la disparidad en el complejo mayor de histocompatibilidad provee la estimulación esencial en la reacción de LIA; en cambio, los resultados obtenidos con estas experiencias muestran que la reacción de SLIA no se desencadena por disparidades tan importantes como las que existen en una combinación xenogénea.

Por otro lado resulta interesante comprobar que los antígenos fetales no actúan como inductores de SLIA, tanto cuando se los inocula en los ratones receptores, como cuando se ensayan i.d. los linfocitos de hembra preñada.

4.4. Activación de SLIA por células tumorales formolizadas

La estimulación de las células esplénicas por la presencia del tumor puede deberse tanto a factores solubles liberados desde la célula tumoral, como a componentes de la membrana celular o incluso a una combinación de ambos. Para determinar si la activación de las células esplénicas se produce por la liberación de factores solubles desde las células tumorales, se fijaron con formol células de tumor MM3 antes de inyectarlas en

los animales portadores. El tratamiento empleado permite mantener en forma prácticamente inalterada las características generales de la membrana celular (20).

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, hembras y/o machos, de 3 a 6 meses de edad, de la cepa BALB/c, pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo".

Tumor

Se estudió el efecto de la formolización sobre el tumor MM3, ya que es éste el que induce mayor proliferación de células endoteliales (angiogénesis tumoral) y mayor densidad de vasos en piel de ratón (SLIA).

Control

Como control se usaron células de riñón normal

Suspensiones de células tumorales MM3 y de riñón normal

Se realizaron siguiendo el procedimiento detallado en la sección V.4.1

Preparación de células formolizadas

Se trataron 1×10^6 céls./ml de tumor MM3 o de riñón normal, con el mismo volumen de una solución de formol al 0.2% en PBS y se mantuvieron durante 24 hs. a 4°C. Las células se lavaron con PBS (4 lavados), se resuspendieron en PBS y se dejaron una hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron y se llevaron a la concentración inicial.

Inoculación de las células

Las células tumorales y normales (con y sin tratamiento con formol), se inocularon en forma s.c. en la piel de ratones normales.

Suspensión de células esplénicas. Ensayo del LIA. Cuantificación de la vascularización.

Se realizaron siguiendo la metodología ya mencionada.

Resultados

Tabla V.4.4: Respuesta vascular en los ratones receptores

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E$	Nº de sitios inoculados
Ratones portadores de: células de tumor MM3	3.80 \pm 0.14	17
ídem, formolizadas	3.98 \pm 0.22	15
células de riñón	1.58 \pm 0.08	15
ídem, formolizadas	1.62 \pm 0.05	16

Como se observa en la tabla V.4.4, la respuesta vascular inducida por las células tumorales formolizadas es similar a la respuesta promovida por células tumorales sin tratamiento, ambas inducen una respuesta angiogénica significativamente diferente de los controles ($p < 0.001$). No existen diferencias en la respuesta vascular por el tratamiento con formol en ambos grupos.

Las células tumorales tratadas con formol no liberan factores solubles al medio, por lo tanto los resultados expresados en la tabla V.4.4. permiten suponer

que la estimulación de las células esplénicas se debería a algún tipo de componente de la membrana de la célula tumoral y no a la liberación de factores solubles (21).

Actualmente se están realizando en nuestro laboratorio purificaciones de membrana celular de células tumorales, con el fin de determinar cual o cuales son los componentes de la misma que están involucrados en la activación de las células esplénicas.

4.5. Actividad angiogénica en los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas aisladas desde ratones portadores de tumor.

Los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas aisladas desde ratones portadores de tumor exacerban el crecimiento tumoral cuando se los inyecta en la almohadilla plantar de ratones normales, 24 hs antes del inóculo de células tumorales (22, 23).

Dado que los factores angiogénicos favorecen el desarrollo de los tumores, se pensó que la actividad exacerbadora podría deberse, al menos en parte, a la liberación de factores solubles desde los linfocitos activados, capaces de inducir una respuesta vascular.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, hembras y/o machos, de 3 a 6 meses de edad, de la cepa BALB/c, pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo".

Tumores

Para realizar estos estudios se empleó el tumor S13, un adenocarcinoma mamario murino de la cepa BALB/c, con mediana capacidad metastásica en pulmón, que se mantiene en el Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo" por transplante s.c. en ratones singeneicos.

Suspensiones de células esplénicas de los ratones portadores de tumor.

Entre los 7 y 10 días de portación del tumor, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Los bazo se extrajeron en forma estéril y se procesaron siguiendo la metodología detallada en el punto V.4.1. Como control se prepararon suspensiones de células esplénicas aisladas desde ratones normales.

Estas suspensiones fueron usadas para preparar los sobrenadantes de cultivo (spleen cell supernatants, SCS), o bien para ensayar en forma directa la reacción de SLIA.

Preparación de los SCS

Desde las suspensiones de células esplénicas se eliminaron los eritrocitos con tratamiento con NH_4Cl 0.83% buffer Tris pH7; las células se centrifugaron y el pellet se lavó dos veces con medio de cultivo MEM 199 (Difco). Después del tratamiento se determinó la viabilidad con Trypan-Blue.

Las células esplénicas (5×10^7) se incubaron en 2 ml de medio de cultivo en tubos de propileno durante 24 hs. en una atmósfera con 5% de CO_2 en aire. Al finalizar el período de incubación, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10'. Los sobrenadantes (SCS) se concentraron por liofilización y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de ensayarlos.

Actividad exacerbadora de los SCS sobre el crecimiento tumoral.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que los SCS de ratones portadores de tumor S 13 tienen actividad exacerbadora sobre el crecimiento tumoral (24). Estos mismos sobrenadantes fueron ensayados con el fin de determinar si contenían factores capaces de inducir angiogénesis.

Transferencia de la actividad exacerbadora de los SCS a ratones normales.

La actividad biológica producida por los SCS se puede transferir a las células esplénicas de ratones normales singeneicos. La transferencia se realizó inoculando i.p. 0.05 ml de SCS en ratones BALB/c. A las 24 hs. los ratones se sacrificaron y los bazos se extrajeron en forma estéril para preparar las suspensiones de células esplénicas.

Suspensiones de células esplénicas de ratones transferidos con SCS.

Las suspensiones de células esplénicas de ratones transferidos con SCS se realizaron siguiendo la técnica detallada anteriormente.

Ensayo de SLIA

Las células de bazo de ratones transferidos con SCS y de ratones portadores de tumor S 13, se inocularon i.d. en ratones BALB/c normales.

El ensayo de SLIA se realizó en la forma habitual.

Cuantificación de la vascularización

La densidad de vasos sanguíneos se determinó para cada grupo de animales según la fórmula explicada en la sección V.4.1.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el test t de Student.

Resultados

Tabla V.4.5.1. Respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
Portadores de tumor S 13	4.13 \pm 0.05	20
Ratones normales	1.67 \pm 0.09	20

Los resultados expresados en la tabla V.4.5.1 demuestran que las células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13 son capaces de inducir una fuerte reacción angiogénica cuando se las inocula en la piel de ratones normales singeneicos.

La respuesta vascular inducida por las células esplénicas de portadores de tumor S13 difiere significativamente ($p < 0.001$) de la respuesta inducida por células esplénicas de ratones normales.

Tabla V.4.5.2 Respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones transferidos con SCS

Origen de las células esplénicas.	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
Ratones transferidos con SCS de:		
1. portadores de tumor S 13	4,09 \pm 0.09	14
2. ratones normales	1.65 \pm 0.08	14

Los resultados de la tabla V.5.2 demuestran que las células esplénicas de ratones normales transferidos con SCS de portadores de tumor S 13, son capaces de inducir una respuesta vascular que difiere significativamente ($p < 0.001$) de los controles.

Por otra parte, los valores obtenidos al ensayar células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13 (expresados en la tabla V.4.5.1) no difieren de los valores de densidad inducidos por las células esplénicas de ratones transferidos con SCS de portadores de tumor (tabla V.4.5.2).

En conjunto, estos resultados indican que la respuesta angiogénica inducida por células esplénicas de ratones portadores de tumor está mediada por la liberación de factores solubles, que pueden ser transferidos a ratones normales. Esto sugiere que algún factor o factores, contenidos en los SCS de ratones portadores de tumor S 13, son capaces de activar a las células esplénicas de ratones normales para que estas adquieran tanto la capacidad de inducir una respuesta angiogénica como de exacerbar el crecimiento tumoral (24).

El mecanismo involucrado en la respuesta angiogénica in vivo aún no está completamente dilucidado. Los linfocitos activados liberan linfoquinas que podrían actuar directamente sobre las células endoteliales, o en forma indirecta, activando a los macrófagos para que generen a su vez una respuesta vascular.

4.6. Estudio de las poblaciones esplénicas responsables de la liberación de factores con actividad angiogénica.

Para caracterizar la población celular responsable de inducir la respuesta vascular en el huésped, se ensayaron los SCS obtenidos desde cultivos de distintas poblaciones de células esplénicas de ratones portadores de tumor.

Por otro lado se estudió la respuesta angiogénica inducida por células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+), portadores de tumor.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, normales, machos o hembras de 3 a 6 meses de edad, de la cepa BALB/c pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo".

Ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+) de la cepa BALB/c, hembras de 3 meses de edad obtenidos desde el Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Estos animales se mantuvieron en condiciones estériles (en flujo laminar), dentro de cajas autoclavadas; recibieron comida esterilizada y agua estéril acidificada.

Tumores

Se emplearon tumores MM3 y S 13.

Inoculación de tumores

Los ratones atímicos y heterocigotas fueron inoculados con tumor MM3 en forma s.c. mediante un trócar. Los ratones portaron el tumor durante 25 días.

Los ratones BALB/c normales se inocularon s.c. con tumor MM 3 o S 13 mediante un trócar.

Suspensiones de células esplénicas

Se prepararon suspensiones de células esplénicas con la técnica habitual.

Estas suspensiones fueron inoculadas i.d. en ratones BALB/c para ensayar la reacción de SLIA, o bien se cultivaron durante 24 hs. para preparar SCS.

Depleción de células T por tratamiento con suero anti Thy 1.2

Los ensayos de depleción de células T desde suspensiones totales de células esplénicas se realizaron con un anticuerpo monoclonal obtenido comercialmente (CL 8600, Cerdalane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Canadá). El anticuerpo se adicionó a la suspensión de células esplénicas (1×10^7 cels/ml en medio RPMI 1640) en una dilución final de 1:20; después de una incubación de 60' a 4°C las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron en el volumen original en medio RPMI 1640 con complemento (C' Cerdalane CL 3051, Ontario, Canadá).

El porcentaje de células Thy 1.2 positivas se calculó como índice citotóxico (C.I.), de acuerdo con la fórmula:

$$\text{C.I.: } \frac{\% \text{ citot. (anticuerpo + C')} - \% \text{ citot. (C' solo)}}{100\% - \% \text{ citot. (C' solo)}}$$

El C.I. fue de aproximadamente el 20% en todas las suspensiones de células esplénicas de los ratones portadores de tumor S 13. Las células muertas se aislaron por resuspensión en PBS 1:20 en solución de glucosa (buffer de baja fuerza iónica). La suspensión se pasó a través de una pipeta Pasteur en cuyo interior se colocó lana de nylon. Las células efluentes (viables) se colectaron y resuspendieron en medio MEM 199. Las células viables se ajustaron a una concentración de 25×10^6 células/ml y se cultivaron para obtener los SCS.

Separación de células esplénicas por pasaje a través de columnas de lana de nylon.

Las columnas se prepararon empaquetando 1.5 g de lana de nylon en jeringas de 30 ml; se autoclavaron y se mantuvieron en forma estéril hasta el momento de usarlas.

Cada columna se sembró con 2 ml de una suspensión de células esplénicas (5×10^8 cels/ml aisladas desde ratones portadores de tumor) en medio de cultivo MEM 199.

Después de la siembra, las columnas se mantuvieron durante 45' a 37°C. Las células no adherentes fueron aisladas lavando las columnas con 30 ml de medio de cultivo con 5% de SFB; el medio se mantuvo en aproximadamente 37°C durante todo el proceso.

Para reducir la contaminación con células poco adherentes, la suspensión se pasó a través de una segunda columna, repitiendo el tratamiento anterior.

Las células no adherentes (llamadas células T de aquí en adelante) se centrifugaron y se mantuvieron durante 24 hs en cultivo para obtener los SCS.

La recuperación de las células efluentes fue de aproximadamente el 20% del total de la siembra; la pureza de suspensión de células T después del pasaje por la primera columna fue de aproximadamente el 20% mientras que el pasaje por la 2ª columna elevó este valor hasta un 80%

Preparación de los SCS

Los SCS se obtuvieron desde:

- a) células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13 tratadas con suero anti- Thy 1.2 + C' antes de la incubación.
- b) células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13 pasadas a través de columna de lana de nylon.
- c) células esplénicas de ratones portadores de tumor S 13 sin tratamiento.
- d) células esplénicas de ratones normales.

El procedimiento seguido para preparar los SCS fue el habitual.

Transferencia de los SCS

Los SCS se transfirieron por inyección i.p. a ratones normales BALB/c. A las 24 hs los animales fueron sacrificados y los bazos se extrajeron estérilmente.

Suspensiones de células esplénicas.

Se prepararon suspensiones de células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+) portadores de tumor MM3, de ratones transferidos con SCS y de ratones normales.

Ensayo de SLIA

La técnica seguida fue la habitual.

Cuantificación de la vascularización

Se determinó la densidad de vasos en la forma habitual. Los resultados se analizaron con un test t de Student.

Resultados

Tabla V.4.6.1. Respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones portadores de tumor MM3

Origen de las células esplénicas.	Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ S.E.	Número de sitios inoculados
Portadores de tumor MM3: Ratones atímicos, nu/nu	1.54 \pm 0.40	9
Ratones heterocigotas nu/+	3.65 \pm 0.23	8
Ratones normales BALB/c	3.72 \pm 0.12	12

Para demostrar que la presencia de tumor estimula a las células T a que induzcan una reacción neovascular, se estudió la actividad de las células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y se la comparó con la respuesta

inducida por células esplénicas de ratones heterocigotas (nu/+). Los resultados expresados en la tabla V.4.6 demuestran que las células esplénicas de ratones atímicos, portadores de tumor MM3 no son capaces de inducir una respuesta angiogénica, mientras que las células esplénicas de ratones portadores de tumor sí lo hacen, como fue demostrado anteriormente.

Tabla V.4.6.2: Respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones transferidos con SCS.

Origen de las células esplénicas.	Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ S.E.	Número de sitios inoculados
Ratones transferidos con:		
- SCS de ratones normales.	1.76 \pm 0.08	16
- SCS de ratones portadores de tumor	4.16 \pm 0.09	16
- ídem, células esplénicas deplecionadas de células T	1.87 \pm 0.05	16
- ídem, células esplénicas enriquecidas en células T	3.72 \pm 0.09	12

Otro método empleado para caracterizar la población de células de bazo responsable de la liberación de factores angiogénicos, consistió en estudiar la respuesta vascular inducida por diferentes poblaciones de células esplénicas activadas in vivo por la portación de un tumor.

Para esto, se prepararon sobrenadantes de cultivo de suspensiones esplénicas enriquecidas en dos distintas poblaciones celulares (células B o células T).

Para estudiar si la actividad angiogénica de los SCS preparados desde ratones portadores de tumor persiste aún después de la depleción de las células T, las suspensiones de células esplénicas se trataron con antisuero anti-Thy 1.2+C' y luego se incubaron para obtener los SCS.

Para enriquecer en células T, las suspensiones de células esplénicas se pasaron a través de una doble columna de lana de nylon y las células no adherentes se colectaron y cultivaron. Los SCS fueron luego ensayados in vivo.

La tabla V.4.6.2. muestra que después del tratamiento de las células de bazo con antisuero anti-Thy 1.2+C', los sobrenadantes de la población remanente, enriquecida en células B, no son capaces de inducir una respuesta vascular.

Los SCS preparados desde la suspensión enriquecida en células T obtenida a través del pasaje por columna de lana de nylon, son fuertes inductores de angiogénesis. La respuesta vascular se detecta fácilmente debido al aumento en el número de vasos, tortuosidad y a la tendencia de formación de loops (25).

4.7. Rol de los macrófagos en la reacción SLIA

La reacción de SLIA es el resultado final de una cascada de eventos que comienzan con la activación de los linfocitos ante la presencia de un tumor; una vez activados, los linfocitos producen factores solubles capaces de inducir una respuesta neovascular. Posiblemente estos factores funcionen como mediadores del evento angiogénico, actuando a su vez sobre otro tipo de células.

Ha quedado demostrado que la activación de los macrófagos produce la liberación de PGs; por otro lado se observó que los macrófagos activados son capaces de inducir angiogénesis. Dado que las PGs están relacionadas con la angiogénesis tumoral, se quiso estudiar si participan también en la reacción de SLIA y si esa participación se produce a través de los macrófagos.

Para realizar estos experimentos se probó:

- 1- el efecto de la eliminación de los macrófagos del huésped con carrageenan (citotóxico para macrófagos)
- 2- el efecto de la indometacina (inhibidora de la síntesis de PGs).

sobre la respuesta vascular inducida por linfocitos estimulados por células tumorales. Cada tratamiento se realizó por separado.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, machos o hembras de 3 a 6 meses de edad, de las cepas BALB/c y C57Bl/6, pertenecientes al Bioterio del Instituto "Angel H. Roffo".

Tumor

Para este estudio se emplearon tumores MM3.

Controles

Como control se emplearon riñones normales de ratones BALB/c.

Suspensiones de células normales y tumorales

Las suspensiones celulares se prepararon según la técnica explicada en la sección V.4.1.

Las células (1×10^6 en 0.1 ml) se inocularon en forma s.c. en ratones normales (portadores).

Suspensión de linfocitos

A las 24 hs de la inoculación de células normales o tumorales, los ratones portadores se sacrificaron y los bazo se extrajeron en forma estéril.

Las suspensiones de linfocitos se prepararon con la técnica habitual y se inocularon i.d. (4×10^6 /0.1ml) en los ratones receptores.

Tratamiento de los animales receptores con indometacina

Stocks de Indometacina (Merck, Sharp y Dore) de una concentración de 10 mg/ml en alcohol absoluto se conservaron a -20°C . Para la administración oral de los ratones receptores, se diluyó 1/500 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se cambió 3 veces por semana el líquido de bebida, tomando los ratones entre 4-6 ml por día (80 a 120 mg de indometacina). El vehículo (alcohol) se usó como control diluyéndolo hasta la concentración adecuada.

El tratamiento con indometacina se llevó a cabo en los animales receptores inyectados con linfocitos de ratones portadores de células tumorales; comenzó 3 días antes de la inyección intradérmica y continuó hasta que los animales fueron sacrificados.

Tratamiento con carrageenan

24 hs y 96 hs previas a la inyección i.d. de linfocitos, los ratones receptores fueron inoculados con carrageenan iota (SIGMA). Las inyecciones fueron i.p. y el carrageenan se disolvió en solución fisiológica (25 mg/10 ml) para que cada ratón recibiera 500 μg de carrageenan en cada dosis.

Los controles recibieron igual volumen de solución fisiológica.

Cuantificación de la vascularización

La densidad de vasos se cuantificó en la forma habitual.

Análisis estadístico

Los datos de densidad de vasos se analizaron con un test t de Student.

Resultados

Tabla V.4.7.1 Efecto del tratamiento de los ratones receptores con carrageenan, sobre la respuesta vascular.

Origen de las células esplénicas	Tratamiento de los ratones receptores.	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
Ratones inyectados con:			
Células tumorales.	vehículo	3.65 \pm 0.10	12
Células tumorales.	carrageenan	1.80 \pm 0.07	14
Células normales.	vehículo	1.58 \pm 0.10	12
Células normales.	carrageenan	1.62 \pm 0.09	11

Como se desprende desde los resultados de la tabla V.4.7.1., el tratamiento con carrageenan inhibe totalmente la respuesta vascular inducida por los linfocitos de ratones portadores de tumor ($p < 0.001$). Los valores de densidad de vasos en los ratones tratados con carrageenan no difieren de los controles.

Por otro lado el tratamiento con carrageenan no afecta la densidad de vasos en los controles. Los valores de densidad de vasos en los dos grupos control corresponden al valor normal de la piel de ratones BALB/c. Estos resultados indican que el carrageenan no actúa en forma directa sobre los vasos sanguíneos del ratón

receptor; por el contrario, la actividad del carrageenan se debería a la inhibición de los macrófagos, que se traduce en la disminución en el valor de densidad de vasos en los ratones tratados.

Tabla V.4.7.2. Efecto del tratamiento de los ratones receptores con indometacina sobre la respuesta vascular.

Origen de las células esplénicas	Tramamiento de los ratones receptores.	Densidad de vasos $\bar{X} \pm S.E.$	Número de sitios inoculados
Ratones inoculados con:			
-Células tumorales.	vehículo	3.53 \pm 0.13	11
-Células tumorales.	indometacina	1.82 \pm 0.08	15
-Células normales.	vehículo	1.58 \pm 0.0	9

Como se observa desde los resultados expresados en la tabla V.4.7.2., los linfocitos de los ratones portadores de tumor fueron capaces de inducir una fuerte respuesta vascular, mientras que los linfocitos de ratones portadores de células normales no lo hicieron ($p < 0.001$).

La adición de indometacina en el agua que bebieron los animales receptores bloqueó totalmente la fuerte respuesta angiogénica inducida por los linfocitos de portadores de tumor. Dado que la indometacina inhibe la síntesis de PGs, los resultados obtenidos en estos ensayos indican que en la reacción de SLIA las PGs juegan un rol importante como mediadoras de la respuesta neovascular (26).

Desde estas experiencias podemos concluir que los macrófagos intervienen en la reacción de SLIA, ya que su depleción por tratamiento con carrageenan inhibe el desarrollo de una respuesta vascular. Los macrófagos activados constituyen una de las fuentes principales de liberación de PGs; el bloqueo de la síntesis de PGs por tratamiento con indometacina impide la aparición de una respuesta angiogénica.

Posiblemente entonces los macrófagos activados induzcan neovascularización a través de la liberación de PGs, las cuales, como ya hemos hecho referencia, tienen actividad angiogénica in vivo (26).

5. BIBLIOGRAFIA

1. Polverini P., Cotran R., Gimbrone M., Unanue E.: Activated macrophages induce vascular proliferation Nature 269: 804, 1977.
2. Clark R., Hunt T.: Role of macrophages in wound healing: Surg. Forum 27: 16, 1976.
3. Nathan C., Murray H., Cohn Z.: The macrophage as effector cell. N. Engl. J. Med. 303: 622, 1980.
4. Unanue E.: Secretory function of mononuclear phagocytes. Am. J. Pathol. 83: 396, 1976.
5. Knighton D., Silver I., Hunt T.: Regulation of wound-healing angiogenesis. Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery 90: 262, 1981.
6. Thakral K., Goodson W., Hunt T.: Stimulation of wound blood vessels growth by wound macrophages. J. Surg. Res. 26: 430, 1979.
7. Leibovich J., Polverini P., Shepard M., Wiseman D., Shively V., Nuseir N.: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor-necrosis factor alpha. Nature 329: 630, 1987.
8. Azizkhan R., Azizkhan J., Zetter B., Folkman J.: Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. J. Exp. Med. 152: 931, 1980.
9. Kessler D., Langer R., Pless N., Folkman J.: Mast cells and tumor angiogenesis. Int. J. Cancer 18: 703, 1976.
10. Roche W.: Mast cells and tumor angiogenesis: The tumor-mediated release of an endothelial growth factor from mast cells. Int. J. Cancer 36: 721, 1985.
11. Folkman J.: Regulation of angiogenesis: a new function of heparin. Biochem. Pharmacol. 34: 905, 1985.

12. Sidky Y., Auerbach R.: Lymphocyte-induced angiogenesis: A quantitative and sensitive assay of the graft-vs-host reaction. *J. Exptl. Med.* 141: 1084, 1975.
13. Auerbach R., Kubai L., Sidky Y.: Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer Res.* 36: 3435, 1976.
14. Auerbach R., Sidky Y.: Nature of the stimulus leading to lymphocyte-induced-angiogenesis. *J. Immunol.* 123: 751, 1979.
15. Rohem N., Sidky Y., Auerbach R.: Lyt phenotype analysis of the effector cells responsible for evoking lymphocyte-induced angiogenesis (LIA). *Cell. Immunol.* 63: 272, 1981.
16. Nishioka K., Katayama I.: Angiogenesis activity in culture supernatants of antigen-stimulated lymph node cells. *J. Pathol.* 126: 63, 1978.
17. Pliskin M., Ginsberg S., Carp N.: Induction of neovascularization by mitogen-activated spleen cells and their supernatants. *Transplantation* 29: 255, 1980.
18. Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Lymphocyte-induced angiogenesis in a syngeneic combination. *Transplantation* 37: 327, 1984.
19. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E.: Correlation between the metastatic ability and the lymphocyte-induced angiogenesis. *Inv. & Metast.* 6: 313, 1986.
20. Ross C., Cochran A., Hoyle D., Grant R., Mackie R.: Formalinized tumor cells in the leukocyte migration inhibition test. *Clin. Exp. Immunol.* 22: 126, 1975.
21. Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Angiogenesis inducida por linfocitos: actividad de los linfocitos estimulados por células tumorales

formolizadas. Comunicado en la XXIX^o Reunión Científica de la Sociedad de Investigaciones Clínicas. Mar del Plata, 1984.

22. Jasnís M., Klein S., Bonaparte I., Oisgold-Dagá S.: Delayed hipersensitivity in tumor-bearing mice: In vitro activation of "eclýpsed" spleen cells. Int. J. Cancer 20: 394, 1977.
23. Jasnís M., Eiján A., Oisgold-Dagá S.: Regulation of tumor growth by soluble spleen factors. Effect of tumor resection. J. Surg. Oncol. 35: 139, 1987.
24. Davel L., Miguez M., Jasnís M., Eijan M., Oisgold-Dagá S., Lustig E.: Angiogenic activity by spleen cell supernatants from tumor bearing and tumor-resected mice. J. Surg. Oncol. 37: 82, 1988.
25. Davel L., Miguez M., Kohan S., Jasnís M., Eiján A., Oisgold-Dagá S., Sacerdote de Lustig E.: Angiogenic activity from tumor-bearing mice : Nature of the spleen cell population capable of inducing neovascular responses. : Eur. J. Clin. Oncol., en prensa.
26. Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Evidence that indomethacin inhibits the lymphocyte-induced angiogenesis. Transplantation 39: 564, 1985.

CAPITULO VI

DISCUSION

<u>INDICE</u>	Pág.
1. El proceso angiogénico.	171
1.2. Factores que influncian el crecimiento vascular.	171
1.2.1. Interacciones celulares.	172
1.2.2. Matriz extracelular.	172
1.2.3. GF con actividad angiogénica.	174
1.2.3.1. GF con afinidad por la heparina	175
1.2.3.2. Gf sin afinidad por la heparina	176
1.2.4. Otros moduladores de la respuesta angiogénica.	176
2. Aportes del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis.	178
2.1. Estudio de la angiogénesis tumoral.	178
2.2. Estudio de la angiogénesis inducida por linfocitos.	179
3. Modelo propuesto para explicar las interacciones entre los distintos moduladores de la respuesta angiogénica.	184
4. Bibliografía	185

1. El proceso angiogénico

La proliferación vascular constituye un proceso necesario para el crecimiento normal de los tejidos.

En el adulto, sin embargo, la angiogénesis ocurre con escasa frecuencia y se la observa casi exclusivamente durante la reparación de heridas y fracturas; el sistema reproductor femenino constituye un caso excepcional, ya que en cada ciclo estral se desarrollan vasos sanguíneos tanto en el folículo ovárico como en el cuerpo lúteo. Estos períodos de actividad angiogénica normal son relativamente breves y se encuentran muy bien regulados.

Por el contrario, la angiogénesis en condiciones patológicas evade los mecanismos de control y lleva a la formación de una red vascular anormal, que frecuentemente agrava la evolución del cuadro clínico.

En condiciones normales las células endoteliales son marcadamente quiescentes; sin embargo, ante un estímulo angiogénico migran y proliferan en forma activa siguiendo una secuencia ordenada de eventos. El primer paso de esta secuencia consiste en la activación de la célula endotelial, que se manifiesta a través del aumento en el número de organelas, de la síntesis de enzimas con actividad proteolítica (colagenasas, activador de plasminógeno, etc.) y de la aparición de proyecciones en la membrana plasmática. A continuación la membrana basal es degradada localmente por la acción enzimática y las células endoteliales comienzan a migrar formando brotes vasculares que se anastomosan entre sí dando origen a los loops. Los nuevos capilares son rodeados por pericitos, que se unen fuertemente a la superficie abluminal de la célula endotelial. Por último las células endoteliales sintetizan los componentes de la membrana basal liberando en primer lugar laminina y luego colágeno tipo IV.

1.2. Factores que influyen en el crecimiento vascular

Si bien en un principio se pensó que la angiogénesis resultaba de la acción de un factor soluble sobre un tipo celular específico (endotelio), hoy se sabe que en la iniciación del proceso de neovascularización

intervienen múltiples factores que actúan en diferentes niveles y desencadenan la proliferación de los vasos sanguíneos. Consideraremos aquí aquellos que tienen mayor influencia sobre el desarrollo vascular: interacciones celulares, matriz extracelular, GFs con actividad angiogénica y otros moduladores importantes de la respuesta neovascular.

1.2.1. Interacciones celulares

Las interacciones entre células endoteliales adyacentes regulan el crecimiento celular; las membranas plasmáticas aisladas desde cultivos de células endoteliales en confluencia son capaces de inhibir la síntesis de DNA de cultivos con una tasa activa de crecimiento, esto sugiere que las interacciones de membrana juegan un rol importante en el control del crecimiento (1).

Se ha postulado además que los pericitos son capaces de suprimir la proliferación de las células endoteliales. La neovascularización se caracteriza a menudo por la ausencia de pericitos, lo que puede comprobarse tanto en la fase proliferativa de la retinopatía diabética como en la vascularización tumoral; por otro lado en los hemangiomas se observan escasos pericitos.

La proliferación de las células de endotelio capilar es inhibida por co-cultivo con pericitos o células musculares lisas, sin embargo el medio condicionado por estas células no tiene ningún efecto sobre el crecimiento endotelial; en base a estos resultados se postula un mecanismo inhibitorio mediado por el contacto intercelular (2).

1.2.2. Matriz extracelular

Para el propósito de esta discusión consideraremos como matriz extracelular al conjunto de tejido conectivo intersticial y componentes de la membrana basal. Esta definición incluye tres tipos de moléculas: a) colágenos, tipo IV en la membrana basal y tipos I y III en el conectivo intersticial; b) moléculas de adhesión distintas del colágeno: laminina, fibronectina, etc., c) proteoglicanos/glicosaminoglicanos, tales como heparán sulfato, ácido hialurónico, condroitín sulfato.

El comportamiento de las células del endotelio microvascular se ve afectado por la composición de la matriz extracelular. Las células endoteliales, cultivadas en placas cubiertas previamente con colágeno tipo IV, se organizan formando estructuras tubulares; sin embargo si el sustrato es de colágeno tipo I ó II, las células proliferan formando una monocapa y ocasionalmente aparecen estructuras tubulares después de un período prolongado de cultivo (3-8).

La laminina, por su parte, es uno de los componentes de la MEC que favorece en mayor medida el crecimiento de las células de endotelio capilar. Como se mencionó en el capítulo I, la laminina interviene en la unión de las células endoteliales con el sustrato de colágeno a través de los dominios globulares de los brazos cortos; el sitio de unión al heparán sulfato se encuentra en el dominio globular terminal del brazo largo, mientras que la interacción con la célula se realiza a través de una proteína de la membrana plasmática. Las propiedades de la laminina sugieren que actuaría como molécula mediadora en la unión entre las células y los componentes de la membrana basal.

La fibronectina y la fibrina son dos de las moléculas de adhesión mejor caracterizadas con respecto al comportamiento del endotelio frente a un estímulo angiogénico. Distintos trabajos han demostrado la importancia de la fibrina en el proceso de angiogénesis tumoral (8-9). Los estudios de Mc Auslan, por otro lado, permitieron comprobar que la fibronectina actúa como una señal para desencadenar la migración de las células endoteliales frente a un estímulo angiogénico (10); por otro lado los niveles de fibronectina aumentan en asociación con el crecimiento de las células endoteliales y con la formación de capilares durante la reparación de las heridas (11). Probablemente la migración de las células endoteliales no se deba a una respuesta quimiotáctica, sino a una respuesta haptotáctica frente a los niveles de fibronectina (12). La haptotaxis es la estimulación de un movimiento celular direccional debido a gradientes de adhesión a componentes del sustrato; diversos trabajos han demostrado el rol de la fibronectina y de la laminina en la haptotaxis de una gran variedad de células tumorales

y normales (13-15), habiéndose comprobado además que la fibronectina posee dominios específicos que promueven la migración haptotáctica de distintos tipos celulares (16).

El rol de los proteoglicanos o glicosaminoglicanos en la angiogénesis es de alguna manera paradójica. La heparina aislada desde sobrenadantes de cultivo de mastocitos estimula la migración de las células de endotelio capilar y además promueve la aparición de una respuesta angiogénica en MCA (17). El efecto de la heparina en la angiogénesis no está relacionado con su capacidad anticoagulante ya que fragmentos de heparina sin capacidad anticoagulante son fuertes inductores de angiogénesis. Posiblemente la capacidad de la heparina de promover angiogénesis se deba a su gran afinidad por GFs con actividad mitogénica sobre células endoteliales (18-19).

En cambio, la acción combinada de heparina y glucocorticoides tiene capacidad inhibitoria sobre la angiogénesis e induce la regresión de capilares en desarrollo de la MCA de embriones jóvenes (20-21).

Otro de los glicosaminoglicanos estudiados en relación con la angiogénesis, el ácido hialurónico (HA), tiene una marcada actividad reguladora del desarrollo de los vasos sanguíneos (22). Mientras que el HA nativo inhibe la proliferación de las células endoteliales, los fragmentos obtenidos por digestión con hialuronidasa son fuertes inductores de angiogénesis in vivo y favorecen la proliferación y la migración de células endoteliales in vitro (ver capítulo II).

1.2.3. GF con actividad angiogénica.

Hasta el momento se han aislado varios GF con actividad angiogénica, tanto desde células neoplásicas como desde células normales. Estos GF pueden ser clasificados en base a su capacidad de unirse a la heparina; así surgen dos grandes grupos: GF angiogénicos con afinidad por la heparina y GF angiogénicos sin afinidad por la heparina.

1.2.3.1. GF con afinidad por la heparina

Dentro de este grupo, el análisis bioquímico mediante el estudio de perfiles de elución, secuenciación de aminoácidos, reacciones inmunológicas y unión a receptores celulares específicos permitió establecer que estos GFs son similares al FGF y pueden ser incluidos dentro de dos tipos: GF tipo FGFa y GF tipo FGFb (tabla VI.1). Dentro de estos dos tipos, los GF son similares entre sí y en general representan variaciones de un mismo polipéptido con distintos PM (ver capítulo II).

Tabla VI.1: Clasificación de GF con actividad angiogénica que presentan afinidad por la heparina.

Tipo	GF
FGFa	ECGF α EDGF II GFs aislados desde: retina astroglía médula
FGFb	ECGF β EDGF I CDGF y ChDGF GFs aislados desde: pituitaria cerebro hipotálamo riñón placenta cuerpo lúteo

La heparina se une con gran avidéz a las células endoteliales a través de receptores de membrana específicos; la unión de los FGFs con la heparina favorecería la concentración de estos GF alrededor de la célula endotelial. Dado que en las células tumorales e inflamatorias se detecta actividad heparinasa, se postula

que la degradación enzimática de la heparina permitiría la liberación de estos GF en la proximidad de las células en las que ejercen su efecto biológico.

1.2.3.2. GF sin afinidad por la heparina.

Este grupo comprende una gama muy amplia de moléculas complejas de diversa naturaleza.

Desde células tumorales se han logrado aislar distintos factores con actividad angiogénica: TAF, ESAF, angiogenina, etc, (ver capítulo II). El ESAF es capaz de activar la procolagenasa sintetizada por fibroblastos y de esa manera promueve la degradación de colágeno de la membrana basal. Las células endoteliales producen colagenasas y elastasas, que difunden en la MEC. Estas enzimas se encuentran en estado latente y son activadas por el ESAF favoreciendo la formación de canales en la MEC, a través de los cuales pueden migrar las células endoteliales.

Los TGFs, por otro lado, son liberados tanto desde células embrionarias y células tumorales, como desde linfocitos y macrófagos activados. Se los puede diferenciar en dos tipos $TGF\alpha$, con actividad angiogénica in vivo e in vitro y $TGF\beta$, cuya actividad angiogénica in vitro está mediada por la activación del sistema monocito-macrófago, favoreciendo la liberación de factores mitogénicos desde macrófagos activados y estimulando la producción y acumulación de fibronectina y colágeno en células normales y tumorales.

1.2.4. Otros moduladores de la respuesta angiogénica.

Distintos moduladores intervienen en la aparición de una respuesta vascular. Entre ellos, los más estudiados son el TNF, el PA, las PGs y los iones Cu^{++} .

El TNF liberado desde macrófagos activados actúa como mediador pleiotrópico con interesantes efectos sobre la citotoxicidad tumoral y sobre las reacciones inmunológicas. Este factor tiene actividad angiogénica in

vivo y estimula la formación de estructuras tubulares ("vasos") cuando las células endoteliales se plaquean sobre un substrato de colágeno.

El PA favorece la degradación del colágeno a través de un primer paso en el que el plasminógeno (inactivo) se convierte en plasmina, que a su vez activa la procolagenasa transformándola en colagenasa.

Las PGs del tipo E (PGE1 y PGE2) liberadas desde tumores, macrófagos, exudados inflamatorios y macrófagos activados son también fuertes inductoras de angiogénesis in vivo.

El aumento en la concentración de iones Cu^{++} promueve la redistribución de fibronectina sobre la superficie de la célula endotelial y con ello genera un estímulo que favorece la migración de dichas células.

2. Aportes del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis.

La neovascularización es un fenómeno común a diferentes estados normales y patológicos, que se activa por estímulos diversos, tales como los cambios metabólicos en la diabetes, la tensión de oxígeno el O_2 en la fibroplasia retrolental, los productos de reacciones inflamatorias y en general los distintos factores angiogénicos liberados tanto desde tejidos normales como tumorales.

Cualquiera sea el estímulo que desencadena la respuesta vascular, las células endoteliales parecen tener un programa específico de proliferación, que se cumple según una secuencia ordenada y lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Los estudios detallados en este trabajo de Tesis estuvieron encaminados a tratar de dilucidar en parte los mecanismos implicados en la vascularización tumoral. Para ello encaramos el problema desde dos puntos diferentes: por un lado el estudio de la angiogénesis inducida directamente desde la célula neoplásica y por el otro lado la cooperación de los linfocitos estimulados en el establecimiento de la red vascular del tumor.

2.1. Estudio de la angiogénesis tumoral

Mediante una técnica de evaluación sencilla in vivo, como es el ensayo de la actividad angiogénica en MCA, demostramos en primer lugar que los tumores primarios (M3 y MM3) y las metástasis pulmonares respectivas, son fuertes inductores de angiogénesis, superando en todos los casos el 85% de resultados positivos. La respuesta neovascular en la MCA se manifiesta a través de un aumento en la densidad de capilares que se distribuyen radialmente alrededor del fragmento tumoral. Aunque esta técnica es meramente cualitativa, la respuesta vascular observada alrededor del implanto tumoral indicó la existencia de una notable actividad inductora de angiogénesis en todos los tumores estudiados.

Una vez comprobada la existencia de actividad angiogénica tanto en los tumores primarios como en las metástasis pulmonares respectivas, nos abocamos al aislamiento de la fracción responsable de la actividad angiogénica. A lo largo del proceso de extracción se probaron las distintas fracciones sobre MCA. Si bien no se emplearon técnicas de purificación y de caracterización posteriores que ayudaran a una mejor identificación del factor angiogénico, pudimos demostrar que la fracción citoplasmática correspondiente a un PM aproximado de 90 kDa era la única capaz de inducir angiogénesis en MCA.

Dado que uno de los puntos de interés para nosotros era comparar la actividad angiogénica de dos tumores con distinta capacidad metastásica (M3 y MM3), necesitábamos desarrollar un ensayo cuantitativo que pusiera de manifiesto las posibles diferencias entre ambos tumores.

Con este fin realizamos cultivos de células tumorales y aislamos los medios condicionados, para ensayar in vitro su efecto mitogénico sobre células endoteliales de aorta fetal bovina; los resultados se expresaron en función del incremento en el número de células endoteliales con respecto a los valores control. A través de estas experiencias pudimos comprobar que los medios condicionados por células del tumor primario M3 (M3-sc) no tienen efecto sobre la proliferación celular, observándose sólo una leve tendencia al incremento en el número de células con respecto a los controles. Por el contrario, los medios condicionados por células aisladas desde el tumor primario MM3 (MM3-sc) y desde las metástasis de ambos tumores (M3p y MM3p) promueven activamente la proliferación de las células endoteliales. Estos resultados parecen estar indicando la presencia, en el tumor primario de origen (M3-sc), de una población celular con mayor actividad angiogénica, que predominaría en el foco metastásico (M3p). Dado que el tumor MM3 se obtuvo por transplante s.c. de las metástasis pulmonares del tumor M3, se puede suponer que en el proceso de selección fueron favorecidas aquellas células que, entre otras características importantes para el proceso metastásico, fueron capaces de inducir una mayor actividad angiogénica.

2.2. Estudio de la angiogénesis inducida por linfocitos

La respuesta vascular es inducida por una gran variedad de moduladores que favorecen tanto la migración como la multiplicación de las células endoteliales. Para determinar si los linfocitos están involucrados en el desarrollo vascular de los tumores, aislamos las células esplénicas de ratones portadores de tumor y ensayamos la actividad inductora de neovascularización en un huésped normal singeneico. Los resultados de estos estudios demostraron que los linfocitos, estimulados por la presencia de un tumor, producen una reacción vasoproliferativa cuando se los inocula i.d. en ratones normales singeneicos.

Posteriormente realizamos ensayos de la reacción de SLIA a distintos tiempos de portación de tumor, desde las 24 hs. de realizada la inoculación, hasta 30 días de portación, con el fin de estudiar si existían variaciones en la respuesta vascular a lo largo de la evolución del tumor. En todos los casos la respuesta angiogénica se mantuvo prácticamente sin diferencias en los valores de densidad, los que aumentaron sólo levemente a medida que transcurrió el tiempo de portación; estas diferencias no fueron significativas en un test t de Student. En base a estas experiencias, los estudios posteriores se efectuaron con 24 a 48 hs de portación.

Una vez comprobado que las células esplénicas activadas por la portación de un tumor son capaces de inducir una respuesta neovascular y siguiendo con el estudio sobre las diferencias en la angiogénesis entre dos tumores con distinta capacidad metastásica, nos resultó interesante estudiar si existían diferencias en la reacción de SLIA entre ambas variantes tumorales.

Las células metastásicas son capaces de desprenderse desde el tumor primario, invadir los tejidos adyacentes, alcanzar el torrente sanguíneo o los vasos linfáticos que las transportan en general hacia zonas distantes y formar focos de crecimiento secundario. La sobrevivencia de las células después de haber entrado en la circulación depende de la capacidad de invadir o extravasar el endotelio capilar y establecer un lecho vascular adecuado para la proliferación celular; los factores que promuevan la vascularización favorecerán entonces tanto el

desarrollo del tumor primario como la dispersión de las células metastásicas en el torrente sanguíneo y el establecimiento de un nuevo foco de crecimiento tumoral. Para estudiar los distintos factores involucrados en este proceso, resulta apropiado comparar el comportamiento de células de un tumor altamente metastásico y de las células del tumor de origen, con baja capacidad metastásica.

El modelo experimental obtenido por el Dr. Colombo en el Instituto de Oncología Angel H. Roffo resulta muy útil para estudiar las distintas propiedades asociadas con la aparición y el desarrollo de las metástasis. Nos pareció entonces interesante estudiar si la capacidad metastásica de los tumores M3 y MM3 se podía correlacionar en forma directa con la actividad angiogénica inducida por los linfocitos estimulados.

Los resultados obtenidos sugieren que en este modelo el proceso metastásico podría ser facilitado por los linfocitos estimulados, los cuales actuarían sinérgicamente con las células tumorales promoviendo el desarrollo del lecho vascular.

Con el fin de determinar cual es la población de células esplénicas que se activa por la presencia del tumor, tratamos las suspensiones con antisuero anti-Thy 1.2, o bien las pasamos a través de una doble columna de lana de nylon. Estas suspensiones, enriquecidas en células B y T respectivamente, se cultivaron durante 24 hs y los sobrenadantes (SCS) se transfirieron a ratones normales para estudiar la inducción de angiogénesis. Por otro lado estudiamos la respuesta angiogénica inducida por células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+) portadores de tumor MM3. Tanto las suspensiones tratadas con anti-Thy 1.2, como las preparadas desde ratones atímicos, fueron incapaces de promover una respuesta vascular en los ratones receptores. En cambio las suspensiones enriquecidas en células T y las provenientes de ratones heterocigotas indujeron una respuesta angiogénica similar a los controles positivos de la reacción. Desde estos resultados concluimos que en la reacción de SLIA los linfocitos T son responsables de la inducción de la respuesta vascular.

Una vez comprobado que los linfocitos estimulados por células tumorales son capaces de inducir angiogénesis, quedaba aún por estudiar si esta activación se producía exclusivamente por las células tumorales o bien si cualquier estímulo antigénico era capaz de desencadenar una reacción neovascular en el sistema de SLIA. Para responder a esta pregunta inoculamos distintos tipos de estímulos antigénicos en los ratones portadores y ensayamos la actividad de los linfocitos en ratones normales, demostrando que no se produce respuesta angiogénica aún cuando se inoculen antígenos xenogéneos. Estos resultados indican que la inducción de una respuesta vascular desde linfocitos activados es un proceso altamente específico, que podría estar mediado por antígenos tumorales que se encontrarían ausentes en células normales, tanto adultas como embrionarias.

Para determinar cual es el mecanismo de activación de los linfocitos ante la presencia de células tumorales, fijamos células MM3 con un tratamiento suave con formol. Los estudios de inmunización han demostrado que las células tumorales formolizadas retienen sus características de membrana y su antigenicidad, son relativamente fáciles de preparar y pueden mantenerse sin alteraciones durante varios meses. Al ensayar dichas células en la reacción de SLIA pudimos comprobar que la respuesta vascular se mantenía en los mismos valores que los controles sin tratamiento, lo que nos indicó que la estimulación de los linfocitos se produce por componentes de la membrana celular y no a través de factores solubles liberados desde la célula tumoral.

Es necesario aclarar que estos resultados corresponden a un estudio preliminar; actualmente estamos realizando purificaciones de membrana celular de tumores para caracterizar la fracción responsable de estimular a los linfocitos para inducirlos a desarrollar una respuesta vascular.

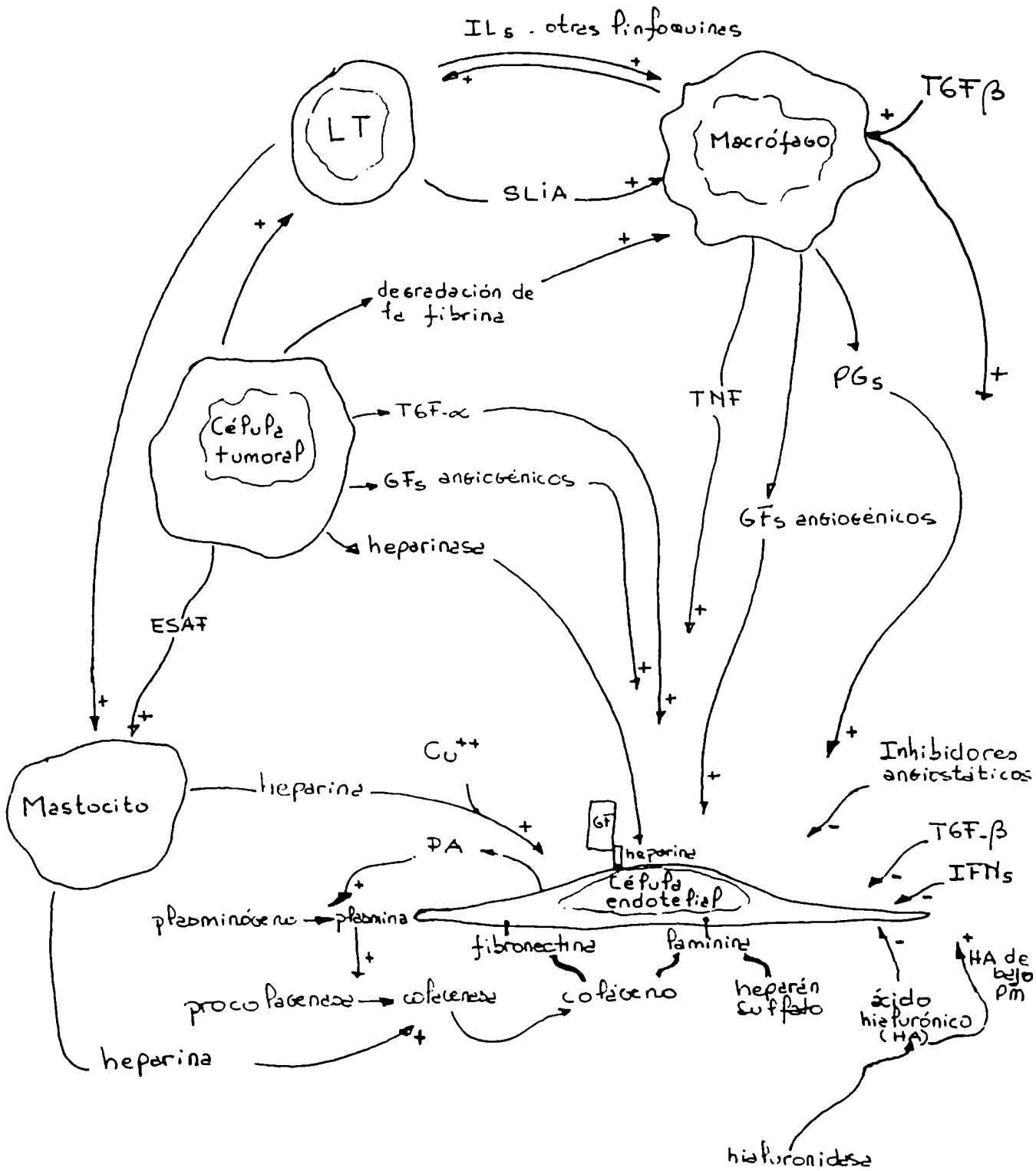
Por otra parte, para estudiar si los linfocitos liberan factores solubles con actividad angiogénica, ensayamos la reacción de SLIA con sobrenadantes de cultivo de células esplénicas aisladas desde ratones portadores de tumor S13 y comprobamos que estos sobrenadantes son capaces de inducir una respuesta neovascular cuando se los transfieren a ratones normales singéneos.

Al estudiar el efecto del carrageenan sobre la reacción de SLIA, comprobamos que la depleción de macrófagos inhibe completamente el desarrollo de una respuesta angiogénica. Esto nos indicó que los macrófagos actúan como mediadores del mecanismo de SLIA.

Dado que los macrófagos activados liberan PGs y que estas tienen actividad angiogénica, nos propusimos estudiar si las PGs están involucradas en la reacción de SLIA; para ello inhibimos la síntesis de PGs en los ratones receptores con indometacina. Los resultados de estos ensayos nos demostraron claramente que la respuesta vascular depende de la liberación de PGs desde los macrófagos, dado que el tratamiento con indometacina inhibe completamente la formación de nuevos capilares.

Desde nuestros resultados se desprende que los linfocitos activados por la portación de un tumor liberan linfoquinas con actividad angiogénica. Estas linfoquinas inician una cascada de eventos que desembocan en la aparición de la respuesta neovascular.

3. Modelo propuesto para explicar las interacciones entre los distintos moduladores de la respuesta angiogénica.



4. BIBLIOGRAFIA

1. Heinmarck R., Schwartz S.: Role of plasma membrane interactions in endothelial cell proliferation J. Cell Biol. 100: 1934, 1985.
2. D'Amore P., Orlidge A.: The role of pericyte in microvascular growth control. En: Angiogenesis. Mechanisms and Pathobiology p.125. Current Communications in Molecular Biology. D. Rifkin, M. Klagsburn Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1987.
3. Shor A., Schor S.: Tumor angiogenesis. Br. J. Pathol. 141: 385, 1983.
4. Schor A., Schor S., Kumar S.: Importance of a collagen substratum for the stimulation of capillary endothelial cell proliferation by tumor angiogenesis factor. Int. J. Cancer 24: 225, 1979.
5. Schor A., Schor S., Weiss J., Brown R., Kumar S., Phillips P.: Stimulation by a low molecular-weight angiogenic factor of capillary endothelial cells in culture. Br. J. Cancer 41: 790, 1980.
6. Madri J., Pratt B.: Endothelial cell matrix interactions: In vitro models of angiogenesis. J. Histochem. Cytochem. 34: 85, 1986.
7. Madri J., Williams S.: Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. J. Cell Biol. 97: 153, 1983.
8. Dvorak H., Dickerson G., Dvorak A., Payne K.: Human breast carcinoma fibrin deposits and desmoplasia, inflammatory cell type and distribution: Microvasculature and infarctation. J. Natl. Cancer Inst. 67: 335, 1981.
9. Nicosio R., Tchao R., Leighton J.: Angiogenesis dependent tumor spread in reinforced fibrin dot culture. Cancer Res. 43: 2159, 1983.

10. Mc Auslan B., Hannan G., Reilly W., Stewart F.: Variant endothelial cells: Fibronectin as a transducer of signals for migration and neovascularization. *J. Cell Physiol.* 104: 177, 1980.
11. Clark R., Della Pelle P., Manseau E., Lamigan J., Dvorak H., Calvin R.: Blood vessel fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 79: 269, 1982.
12. Carter S.: Principles of cell motility: Direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* 208: 1183, 1965.
13. Rogers S., Letorneau P., Palm S., Mc Carthy J., Furcht L.: Neurite extensions by peripheral and central nervous neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. *Dev. Biol.* 98: 212, 1983.
14. Furcht L.: Structure and function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Mod. Cell Biol.* 1: 53, 1983.
15. Mc Carthy J., Furcht T.: Laminin and fibronectin promote the haptotatic migration of B16 melanoma cells in vitro. *J. Cell Biol.* 98: 1474, 1984.
16. Mc Carthy J., Hagen S., Furcht L: Human fibronectin contains distinct adhesion and mobility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *J. Cell Biol.* 102: 179, 1986.
17. Azizkhan R., Azizkhan J., Zetter B., Folkman J.: Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J. Exp. Med.* 152: 931, 1980.
18. Maciag T., Mehlman T., Friesel R., Schreiber A.: Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science* 225: 932, 1984.

19. Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsburn M.: Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223: 1296, 1984.
20. Crum R., Folkman J.: Anti-angiogenesis by steroids without glucocorticoid or mineralocorticoid activity in the presence of heparin. *J. Cell Biol.* 99: 158a, 1984.
21. Crum R., Szabo S., Folkman J.: A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin. *Science* 230: 1375, 1985.
22. Feinberg R., Beebe D.: Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220: 1177, 1983.

M. de Miquel Espino

Eugenio S. de Lustig