

Tesis de Posgrado

Modulación de la angiogénesis linfocitaria en modelos tumorales murinos

Davel, Lilia Elena

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas 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:

Davel, Lilia Elena. (1990). Modulación de la angiogénesis linfocitaria en modelos tumorales murinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2313_Davel.pdf

Cita tipo Chicago:

Davel, Lilia Elena. "Modulación de la angiogénesis linfocitaria en modelos tumorales murinos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2313_Davel.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

"MODULACION DE LA ANGIOGENESIS LINFOCITARIA
EN MODELOS TUMORALES MURINOS"

Autora

LILIA ELENA DAVEL

Directora de Tesis

DRA. EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

Lugar de Trabajo

DPTO. DE INVESTIGACION. INSTITUTO DE ONCOLOGIA "ANGEL H. ROFFO"

Tesis presentada para optar al Título de:
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1990

2313
ef. 2.

Nada es demasiado grande o demasiado pequeño para que el intelecto lo abarque, nada es demasiado distante en el tiempo o el espacio para que le asigne su debido peso en la estructura del cosmos.

BERTRAND RUSSELL

A mi madre y a mi esposo, por brindarme comprensión, apoyo y estímulo durante toda mi carrera.

A mis hijos.

A la memoria de mi padre.

Agradezco

A la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig que con su experiencia, me enseñó a mantener independencia de criterio y me brindó el estímulo necesario para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Marta Miguez, con la cual he compartido durante años, la aventura de la investigación.

A la Dra. María Adela Jasnís por sus amables consejos, críticas y comentarios que influyeron en la elaboración de este trabajo.

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

A todos los integrantes del Departamento de Investigación que han hecho posible la realización de este proyecto.

A la Universidad de Buenos Aires, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

INDICE GENERAL

I-	INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
	1. Angiogénesis.....	2
	2. Proceso angiogénico: mecanismo.....	3
	3. Sistemas empleados para estudiar la angiogénesis.	5
	4. Objetivos.....	14
	5. Bibliografía.....	19
II-	ANGIOGENESIS TUMORAL.....	27
	1. Fase avascular y vascular del crecimiento tumo- ral.....	28
	2. El sistema vascular de los tumores.....	30
	3. Desarrollo experimental.....	34
	4. Actividad angiogénica de cultivos de tumores y sus metástasis.....	41
	5. Bibliografía.....	43
III-	ANGIOGENESIS LINFOCITARIA.....	45
	1. Sistema inmune.....	47
	2. Inmunidad humoral y celular.....	47
	3. Células que participan en la respuesta inmune..	48
	4. Modulación inmune y cooperación celular.....	59
	5. Angiogénesis inducida por componentes del siste_ ma inmune.....	63
	6. Desarrollo experimental.....	68
	7. Bibliografía.....	90

IV- ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE FACTORES ESPLENICOS. POBLA	
CIONES CELULARES.....	96
1. Actividad biológica de factores esplénicos.....	97
2. Poblaciones celulares esplénicas.....	99
3. Desarrollo experimental.....	100
4. Bibliografía.....	122
V- MODULADORES DE LA RESPUESTA ANGIOGENICA.....	126
1. Inductores de actividad angiogénica.....	128
2. Inhibidores de la angiogénesis.....	148
3. Desarrollo experimental.....	153
4. Bibliografía.....	173
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	187
1. Proceso angiogénico.....	188
2. Aportes del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis.....	189

ABREVIATURAS

MCA: Membrana corioalantoidea.

LIA: Angiogénesis inducida por linfocitos.

i.d.: intradérmico.

SLIA: Angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos.

i.p.: Intraperitoneal.

Ag: Antígeno.

Ac: Anticuerpo.

MØ: Macrófago

PMN: Polimorfonuclear

IL: Interleukina

LB: Linfocito B.

LT: Linfocito T.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

BCGF: Factor de crecimiento par células B.

TCGF: Factor de crecimeinto para células T.

BCDF: Factor de diferenciación de células B.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

PM: Peso molecular.

kDa: Kilo Dalton.

s.c.: Subcutáneo.

E.S.: Error standard.

GRC: Glóbulos rojos de-carnero.

EON: extracto de órganos normales.

ETS: Extracto tumoral soluble.

rpm: Revoluciones por minuto.

So: Sobrenadante.

STBM: Ratones portadores de tumor pequeño.

LTBM: Ratones portadores de tumor grande.

STRM: Ratones ex-portadores de tumor pequeño

LTRM: Ratones ex-portadores de tumor grande

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

ECCF: Factor de crecimiento de células endoteliales.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

PDGF: Factor de crecimiento aislado desde plaquetas.

TAF: Factor angiogénico tumoral.

ESAF: Factor angiogénico estimulante de células endoteliales.

HAF: Factor angiogénico humano.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

HA: Acido hialurónico.

PGs: Prostaglandinas.

IFN: Interferón.

FN: Fibronectina.

CAPITULO I INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1. Angiogénesis.....	2
2. Proceso angiogénico; mecanismo.....	3
3. Sistemas biológicos empleados para estudiar la angiogénesis.....	5
3.1. Cámaras transparentes.....	5
3.2. Membrana corioalantoidea de embrión de pollo...	7
3.3. Implantación de muestras en córneas.....	9
3.4. Polímeros de liberación lenta.....	10
3.5. Ensayos con células endoteliales.....	11
3.6. Angiogénesis linfocitaria.....	13
3.6.1. Angiogénesis inducida por linfocitos (LIA).....	13
3.6.2. Angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA).....	14
4. Objetivos.....	14
4.1. Angiogénesis tumoral.....	15
4.2. Angiogénesis linfocitaria.....	15
4.3. Actividad angiogénica de factores esplénicos Poblaciones celulares.....	16
4.4. Moduladores de la respuesta angiogénica.....	17
5. Bibliografía.....	19

1. ANGIOGENESIS

El conocido patólogo Virchow, fue el primero en describir una asociación entre la red vascular y el tejido tumoral (1).

El 1907, Goldman sugirió que en los tumores, el estímulo que lleva a la proliferación de los vasos sanguíneos surge de la célula invasora (2).

Años más tarde el grupo de Algire, observó que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un tumor se produce desde los tejidos que rodean al implanto y denominó a este proceso angiogénesis tumoral (3). En trabajos posteriores se demostró que la angiogénesis tumoral está mediada por factores solubles liberados desde las células neoplásicas (4).

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 solo el alargamiento de los vasos sanguíneos sino también un complejo proceso de remodelación (5).

Dentro de la amplia gama de procesos normales en los que esta involucrada la angiogénesis, se halla la maduración del cuerpo luteo (6). Una gran variedad de tejidos normales producen factores angiogénicos, entre ellos podemos citar: tiroides, retina, glándulas salivares y tejido linfático. (9, 10, 11, 12, 13).

La neovascularización es un evento de gran importancia tanto en los procesos inflamatorios como durante la reparación tisular en las heridas (7,8). En condiciones patológicas, la angiogénesis se observa en la formación de queloides, procesos de neovascularización ocular, psoriasis, res-

puestas inflamatorias crónicas, como artritis, y en neoplasias (14, 15)

Desde hace unas décadas, muchos investigadores se han dedicado al estudio del proceso angiogénico para tratar de dilucidar su mecanismo. Es de destacar la importancia que tiene el hecho de encontrar sustancias antiangiogénicas que frenen el proceso de neovascularización evitando el desarrollo de un tumor o de otra patología en la que esté involucrada la angiogénesis.

2. PROCESO ANGIOGENICO: MECANISMO

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 (16).

Las células endoteliales estimuladas por factores

angiogénicos secretan enzimas degradantes muy activas como la colagenasa y activador de plasminógeno (17). 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 (18).

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 (19). 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 (20, 21). 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 (22).

3. SISTEMAS BIOLÓGICOS EMPLEADOS PARA ESTUDIAR LA ANGIOGENESIS.

3.1. CÁMARAS TRANSPARENTES

Los primeros estudios sobre angiogénesis fueron meramente descriptivos y se basaron en el empleo de cámaras transparente 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 apa

rición de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a la herida causada por la implantación de la cámara (23,24).

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 inducen 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 (25, 26).

En 1964 Sanders y Shubik diseñaron una nueva versión de la cámara transparente para implantarla en la bolsa de la boca del hamster Sirio. Este sistema brindó un sitio privilegiado inmunológicamente en el cual pudieron implantarse tumores de distintas especies sin que se produjera rechazo (27).

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 (28).

3.2. MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRION 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 (29).

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 μ m) 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 (30).

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 (31).

Usualmente se emplean vehículos para conseguir la liberación de pequeñas cantidades de la sustancia a testear (1-50 μ g). Uno de los vehículos más empleados es metilcelulosa al 0,5%. Un método alternativo consiste en disolver la muestra en 5-10 μ l 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 (32).

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 (33). 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 (34).

Los ensayos de actividad angiogénica en MCA son relativamente poco costosos y permiten el estudio a gran escala de sustancias promotoras e inhibidoras 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 (35-46).

A pesar de las ventajas antes mencionadas, esta técnica tiene varias limitaciones, tales como la subjetividad de la evolución, la dificultad en cuantificar la respuesta vascular y el problema de diferenciar vasoproliferación de efectos causados por los mismos soportes 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 (47, 48).

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.

3.3. IMPLANTACION DE MUESTRAS EN CORNEAS

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 (49). 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 (50). 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 (51). Más tarde se desarrolló una técnica similar para el estudio de la angiogénesis en córnea de rata (52).

3.4. POLÍMEROS DE LIBERACION 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 etilenvinil-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 (53).

3.5. ENSAYOS CON CELULAS 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 (54, 56).

La migración se estudia con la cámara de Boyden, el ensayo de Albrecht-Buelher 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 (57).

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 co-

locan la muestra y el control. en una cuarte 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 colo- rean las células; la cuantificación de la migración se reali- za determinando dos parámetros: distancia alcanzada y número de células que han migrado (58).

En el ensayo de proliferación de células endotelia- les frente a extractos de diverso origen, se determina el incremento en el número celular, la incorporación de precursor- res marcados y el contenido en ADN (59-64).

3.6. ANGIOGENESIS LINFOCITARIA

Todos los bioensayos nombrados hasta ahora se utili- zan para medir angiogénesis directa producida por implantos de tumor o de otros tejidos. Pero cualquiera sea el estímulo disparador del proceso angiogénico, las células del siste- ma inmune participan activamente en el desarrollo de la res- puesta vascular. Por ello es de destacar la existencia de métodos utilizados para detectar la angiogénesis inducida por linfocitos.

3.6.1. ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS (LIA): Lymphocyte induced angiogenesis (LIA) es una reacción de trans- ferencia de linfocitos normales que se caracteriza por la apa- rición de induración, eritema y tumefacción y representa una

reacción local de injerto contra huesped (65).

Cuando se inyectan intradérmicamente (i.d.) linfocitos normales en ratones alo o semiallogeneicos previamente irradiados 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 inocula linfocitos normales singeneicos. La respuesta angiogénica se mide cinco días después, en función del número de divaricaciones vasculares que rodean al inóculo.

3.6.2. ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS SINGENEICOS

(SLIA): Para estudiar la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (syngeneic lymphocyte-induced angiogenesis: 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 (66).

El ensayo de SLIA será explicado en detalle en el Capítulo III.

4. OBJETIVOS

4.1. ANGIOGENESIS 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 trasplantes sucesivos s.c. de las metástasis en ratones singeneicos (67).

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.

4.2. ANGIOGENESIS LINFOCITARIA

Dado que en los tumores es bastante común hallar una masiva infiltración linfocitaria, estudiamos 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.

Para determinar si la activación de los linfocitos se produce por componentes de la membrana de la célula tumoral realizamos estudios con células formolizadas y extractos tumorales con actividad antigénica.

Quisimos comprobar si la activación de los linfocitos se produce solo ante la presencia del tumor o si cualquier estímulo antigénico es capaz de desencadenar un respuesta neovascular. Para ello estudiamos el efecto de estímulos xeno, alo y singeneicos.

4.3. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE FACTORES ESPLENICOS. POBLACIONES CELULARES.

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. Para comprobar esta suposición estudiamos si los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas de portadores y ex-portadores de tumor contienen factores solubles capaces de inducir angiogénesis.

A continuación se realizaron distintos estudios con el fin de caracterizar la población de células esplénicas responsable de la angiogénesis. 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 media

dores del evento angiogénico al actuar sobre otros tipos celulares.

En base a estos datos quisimos determinar si los macrófagos intervienen en el SLIA, para ello probamos el efecto de la depleción de los mismos en los ratones receptores de linfocitos.

4.4. MODULADORES DE LA RESPUESTA ANGIOGENICA

La angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos es el resultado final de una cascada de eventos que comienzan con la activación de los linfocitos ante la presencia de un tumor y finaliza con la aparición de la respuesta vascular en la piel del ratón. Para analizar el mecanismo del SLIA estudiamos algunos factores que intervienen en el mismo.

En primer lugar quisimos saber si las PGs, estaban involucradas en este proceso angiogénico y para poder dilucidarlo tratamos a los animales con un inhibidor de su síntesis y evaluamos la respuesta vascular.

Como sabíamos que el Cu^{2+} juega un papel importante en la angiogénesis, tratamos de establecer, mediante dietas suplementadas con Cu^{2+} , tanto en los ratones dadores de linfocitos como en los receptores, cual es su influencia sobre el SLIA.

Por otra parte, conocíamos los efectos sobre las angiogénesis del factor de necrosis tumoral. Estudiamos como este factor puede modular la respuesta vascular de linfocitos de portador de tumor.

Por último como la fibronectina, y fragmentos deri-

vados de ella cumplen un papel importante en la inhibición de metástasis experimentales y existe una correlación entre angiogénesis y metástasis, no interesó determinar si algunos componentes de la matriz extracelular intervienen en la angiogénesis.

Para ello tratamos de evaluar la acción de la fibronectina y de fragmentos peptídicos derivados de ella sobre la respuesta vascular inducida por linfocitos de portador de tumor.

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo de Tesis es:

- 1) Detectar actividad angiogénica en distintos modelos tumorales.
- 2) Aislar un factor angiogénico tumoral.
- 3) Establecer un nuevo modelo para la evaluación de la respuesta neovascular.
- 4) Correlacionar la actividad angiogénica con la capacidad metastásica.
- 5) Caracterizar las poblaciones celulares involucradas en la respuesta angiogénica.
- 6) Analizar el comportamiento de distintos modificadores de la respuesta inmune sobre el control de la angiogénesis.

De esta manera nos proponemos dilucidar, en parte, el mecanismo involucrado en el proceso angiogénico y la modulación del mismo a través del sistema inmune.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Shubik P. Vascularization of tumors: A review. *J. Cancer Res. Clin.Oncol.*103: 211 (1982).
2. Goldmann E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2:1236 (1907).
3. Algire G., Charkley H. Vascular reaction of normal and malignant tissues in vitro: Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl. Cancer Inst.* 6: 73 (1945).
4. Folkman J. An understanding of angiogenesis: Search and discovery. *Perspect. Biol. Med.* 29: 10 (1985).
5. Zawicki D., Jain R., Schmidt-Schoenbein G., Chien S.: Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc. Res.* 21: 27 (1981).
6. 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).
7. Polverini P., Cotran R., Gimbrone M., Unanue E. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804 (1977).
8. Thakral K., Goodson W., Hunt T. Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. *J. Surg. Res.* 26: 430 (1979).

9. Folkman J.: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res.* 46: 467 (1986)
10. Chen C., Chen S.: Angiogenic activity of vitreous and retinal extract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19:596(1980)
11. Hoffman H., Mc Auslan B., Robetson D., Burmett E.: An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. *Exp. Cell. Res.* 102: 269 (1976).
12. 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).
13. Auerbach R., Kubai L., Sidky Y.: Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer Res.* 36: 3435 (1976).
14. Federman J., Brown G., Feldberg N., Felton S.: Experimental ocular angiogenesis. *Am. J. Ophthalmol.* 89: 231 (1980).
15. Folkman J., Klagsburn M.: Tumor angiogenesis: effect on tumor growth and immunity. En: *Fundamental aspects of neoplasia.* pag 401 (1975) Editado por Glothieb, Plescia, Bishop. Springer-Verlag. New York Inc.
16. Ausprunk D., Folkman J.: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed vessels during tumor-angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14: 53, 1977.
17. Moscatelli D., Gross J., Rifkin D.: Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 91: 201, 1981.

18. 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.
19. Nicosia R., Tchoo R., Leighton J.: Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. Cancer Res. 43: 2159, 1983.
20. Folkman J., Haudenschild C.: Angiogenesis "in vitro". Nature 288: 551, 1980.
21. Madri J., Williams S.: Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. J. Cell Biol. 97: 153, 1983.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Algire G.: An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. J. Natl. Cancer Inst. 4: 1, 1943.

26. 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.
27. Sanders A., Shubik P.: A transparent window for use in the syrian hamster. *Israel J. Exp. Med.* 11: 118, 1964.
28. Greenblat M., Shubik P.: Tumor angiogenesis. Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 111, 1968.
29. 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.
30. Auerbach R., Kubai L., Knighton D., Folkman J.: A simple procedure for the long term cultivation of chick embryos. *Dev. Biol.* 41: 391, 1974.
31. 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.
32. Vu M., Smith C., Burger P., Klinworth G.: An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane in angiogenesis. *Lab. Invest.* 53: 499, 1985.
33. Folkman I.: Tumor angiogenesis. En: *Cancer*. Vol.3, pag. 355, 1975. Editado por F. Becker, Plenum Press, New York
34. Auerbach R.: Angiogenesis-inducing factors, a review. En: *Lymphokines* pag. 69; Vol. 4, 1981. Editado por E. Pick y M. Laudry, Academic Press.

35. Barnhill R., Ryan T.: Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *J. Invest. Dermatol.* 81: 485, 1983.
36. Strum J.: Angiogenic responses elicited from chorioallantoic and normal mammary tissues from G.R. mice. *Am. J. Pathol.* 111: 282, 1983.
37. Tsukamoto K., Sugino G.: Tumor angiogenesis activity in clonal cells transformed by bovine adenovirus type 3. *Cancer Res.* 39: 1305, 1979.
38. 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.
39. Pliskin M., Ginsberg S., Carp N.: Induction of neovascularization by mitogen-activated spleen cells and their supernatants. *Transplantation* 29: 255, 1980.
40. Glaser B., D'Amore P., Michels R., Patz A., Fenselau A.: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J. Cell. Biol.* 84: 298, 1980.
41. Burgos H.: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 289, 1983.
42. Brown R., Weiss I., Tomkinson I., Phillips P., Kumar S.: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors. *Lancet* 1: 682, 1980.

43. Sariola H., Exblon P., Lehtonen E., Saxen L.:
Differentiation and vascularization of the metanephric
kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev.
Biol.* 96: 427, 1983.
44. Litty G., Thompson D., Gallup J., Mello R., Patz A.,
Fenselanu A.: Vitreous and inhibitor of retinal extract
induced neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*
24: 52, 1983.
45. Brem H., Folkman J.: Inhibition of tumor angiogenesis
mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141: 427, 1975.
46. Vu M., Burger P., Klinworth G.: Angiogenic activity in
injured rat corneas as assayed in the chick chorioallantoic
membrane. *Lab. Invest.* 53: 311, 1985.
47. 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.
48. 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.
49. Gimbrone M., Cotran R., Leapman S., Folkman J.: Tumor
growth and neovascularization: and experimental model
using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 413,
1974.

50. Chandury T., Lerner M., Nordquist R.: Angiogenesis by human melanoma and breast cancer cells. *Cancer Lett.* 11: 43, 1980.
51. Muthukkaruppan U., Auerbach R.: Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205: 1416, 1976.
52. 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.
53. Langer R., Folkman J.: Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263: 797, 1976.
54. Murray J., Brown L., Langer R., Klagsburn M.: A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In vitro* 19: 743, 1983.
55. Johnson A.: Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells from arteries and cells from veins. *J. Clin. Invest* 65: 841, 1980.
56. 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.
57. Zetter B.: Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor-derived factors. *Nature* 285: 41, 1980.
58. Alessandri G., Ráju K., Gullino P.: Mobilization of capillary endothelial cells in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 43: 1790, 1983.

59. Ness S., Gerbes A., Gbriach E.: Isolation, identification and continuous culture of coronary endothelial cells from ginea pig hearts. Eur. J. Cell. Biol. 24: 287, 1981.
60. Rosen E., Mueller S., Noveral J., Levine E.: Proliferative characteristics of clonal endothelial cells strains. J. Cell. Physiol. 107: 123, 1981.
61. 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.
62. 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.
63. Folkman J., Haudenschild C., Zetter B.: Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5217, 1979.
64. 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.
65. Auerbach R., Sidky Y.: Nature of the stimulus leading to lymphocyte-induced angiogenesis. J. Immunol. 123: 751, 1979.
66. 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 ANGIOGENESIS TUMORAL

1. Fase avascular y vascular del crecimiento tumoral...	28
2. El sistema vascular de los tumores.....	30
3. Desarrollo experimental.....	34
3.1. Actividad angiogénica de explantos tumorales sobre M.C.A.....	34
3.2. Aislamiento del factor responsable de la actividad angiogénica.....	37
4. Actividad angiogénica de cultivos de tumores primarios y sus metástasis.....	41
5. Bibliografía.....	43

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.

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 tu-

moral 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.

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. Solo 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 trasplante 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 trasplante 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 trasplante. 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 la 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 (vénulas) 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 vénulas; 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, sien

do 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 un "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 la 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; ésto 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 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 ade

cuando 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.(11)

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE EXPLANTOS TUMORALES SOBRE MCA

En nuestro laboratorio contamos con un modelo de adenocarcinoma mamario murino sintéico 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)(15). Era de interés es

tablecer si en este modelo se podía detectar actividad angiogénica, tanto en el tumor primario subcutáneo como en las metástasis pulmonares respectivas.

MATERIALES Y METODOS

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 (1 mm³) 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 muestran en la Tabla II.1

TABLA II.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 angio

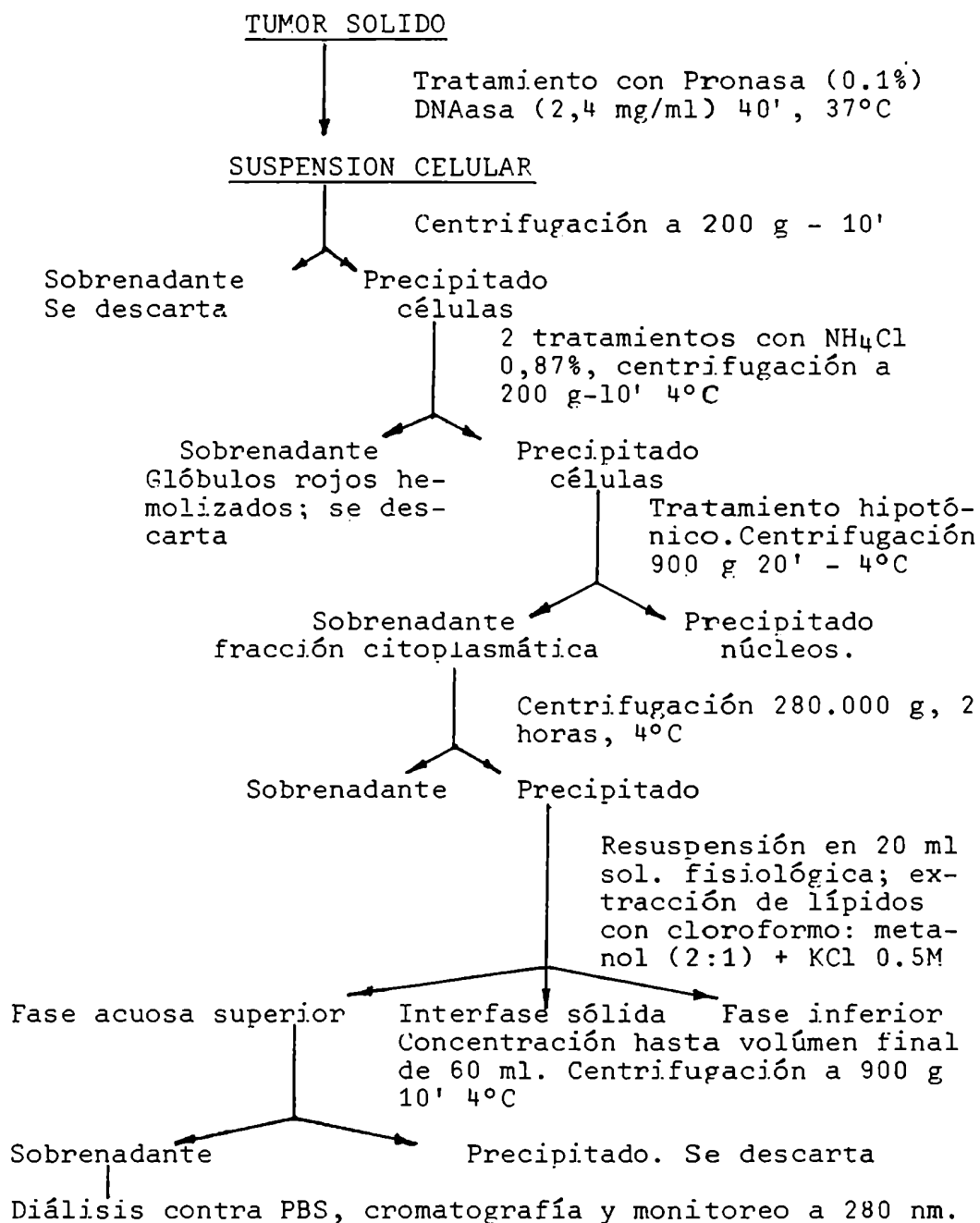
génica tanto en los tumores subcutáneos como en las metástasis pulmonares respectivas, se procedió al aislamiento del factor angiogénico.

MATERIALES Y METODOS

- 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: 1 mg/10 ml).
 - 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 $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$: (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 volumen 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 II.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 (12).

4. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE CULTIVOS DE TUMORES HUMANOS Y SUS METASTASIS

Las células tumorales producen TAF en forma continua, éste es liberado al medio extracelular y actúa sobre el endotelio de los capilares vecinos al tumor induciendo su proliferación. De allí la importancia de estudiar la liberación del TAF en los medios condicionados de cultivos de tumores primarios y sus metástasis.

El TAF actúa como mitógeno específico para las cé-

lulas endoteliales (13, 14). Por ello en nuestro laboratorio se realizó cultivo de células endoteliales con el fin de cuantificar la actividad angiogénica de tumores primarios y sus metástasis.

Los resultados demostraron que el tumor con alta incidencia metastásica (MM3) es capaz de inducir mayor proliferación de células endoteliales que el tumor M3. Por otra parte resultó notable que los sobrenadantes de cultivo de células metastásicas fueron los que presentaron mayor actividad angiogénica in vitro, siendo esta actividad mucho más acentuada que la obtenida desde los tumores primarios respectivos.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Auspunk D., Knighton D., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantoic. 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. Paę 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. Folkman J., Watson K., Ingber D., Hanahan D.: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58 (1989).
12. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E: Actividad angiogénica en tumores mamarios murinos y en sus metástasis. *Medicina* 41: 676, (1981).
13. Folkman J., Haudenschild C.: Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551 (1980).
14. Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Klagsburn M.: Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223: 1296 (1984).
15. Colombo L.: Obtención y estudio "in vivo" e "in vitro" de las características de un modelo adecuado para el enfoque de la heterogeneidad celular en la biología del proceso metastásico. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, UBA, Abril de 1986.

CAPITULO III ANGIOGENESIS LINFOCITARIA

INDICE	Pag
1. Sistema inmune.....	47
2. Inmunidad humoral y celular.....	47
3. Células que participan en la respuesta inmune.....	48
3.1. Linfocitos.....	48
3.1.1. Linfocitos B.....	49
3.1.2. Linfocitos T.....	51
3.1.2.1. Subpoblaciones de linfocitos T..	52
3.2. Células nulas.....	55
3.2.1. Células killer.....	55
3.2.2. Células natural killer.....	56
3.2.3. Células killer activadas por linfoquinas.	56
3.3. Monocitos - Macrófagos.....	57
3.4. Otras células circulantes.....	58
3.4.1. Neutrófilos.....	58
3.4.2. Eosinófilos.....	58
3.4.3. Mastocitos.....	59
4. Modulación inmune y cooperación celular.....	59
4.1. Mediadores de la respuesta inmune.....	60
4.1.1. IL-1.....	60
4.1.2. IL-2.....	61
4.1.3. IFN- γ	61
4.1.4. Otras linfokinas.....	63
5. Angiogénesis inducida por componentes del sistema in- mune.....	63
5.1. Angiogénesis inducida por M \emptyset	63
5.2. Angiogénesis inducida por mastocitos.....	64

	Pag
5.2.1. Heparina.....	65
5.3. Angiogénesis inducida por linfocitos.....	66
6. Desarrollo experimental.....	68
6.1. Angiogénesis de linfocitos de portadores de tumor en una combinación singeneica.....	68
6.2. Correlación entre la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos y la capacidad metastásica.....	74
6.3. Especificidad del estímulo activador de las células esplénicas.....	80
6.4. Células tumorales formolizadas y SLIA.....	83
6.5. Efecto de extractos tumorales solubles con actividad antigénica sobre la angiogénesis.....	87
7. Bibliografía.....	90

1. SISTEMA INMUNE

Los vertebrados poseen un mecanismo de vigilancia ("surveillance") denominado "sistema inmune", que los protege de los microorganismos patógenos y de otros agentes agresores reales o potenciales como las células cancerosas (1).

El sistema inmune reconoce específicamente y elimina selectivamente a los agentes invasores extraños por un complejo proceso conocido como respuesta inmune (2).

La respuesta inmune posee 3 características principales:

- exhibe una exquisita especificidad.
- posee capacidad de memoria de contactos anteriores con patógenos extraños específicos ("recuerdo del antígeno (Ag)).
- responde a agentes extraños o sea el reconocimiento de lo "no propio", que es realidad, de lo propio ya que el sistema inmune existe independientemente de la preexistencia del Ag (gran parte de nuestro repertorio inmunológico, no se usa durante toda la vida).

Frente al universo de Ags propios y no propios, los vertebrados han aprendido a diferenciarlos elaborando mecanismos de no reactividad (tolerancia) contra los primeros y de reactividad positiva contra lo extraño, procurando de este modo neutralizar la agresión.

2. INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

La protección inmune se debe a un sistema dual que responde específicamente a las sustancias extrañas, aunque

una de las respuestas es la favorecida. Por un lado, la respuesta humoral caracterizada por ciertas proteínas específicas, anticuerpos (Ac), dirigidas hacia determinados Ags. Esta respuesta entraña la estimulación de células que lleva a la proliferación de linfocitos especializados en la síntesis y secreción de las inmunoglobulinas (Igs) del suero, por ello se denomina respuesta humoral.

Por otra parte, la respuesta celular, es el resultado de la actividad específica de ciertas células del sistema linfóide.

Esta dualidad del sistema inmune resulta de la existencia de dos poblaciones de células linfoides indistinguibles morfológicamente llamadas en 1969 por Ivan Roitt, linfocitos B (L B) (por médula ósea: bone marrow) y linfocitos T (L T) (por timo) (3).

3. CELULAS QUE PARTICIPAN EN LA RESPUESTA INMUNE

3.1. LINFOCITOS

El linfocito es la célula inteligente del sistema inmune, ya que es la única con especificidad inmunológica y para ello está programada. Por eso, se dice que son células inmunocompetentes o sea, sensibles al Ag (4).

En los mamíferos, entre el 0,5-10% de las células producidas diariamente son linfocitos, muchos de los cuales mueren en pocos días, mientras que algunos se mantienen como células de larga vida.

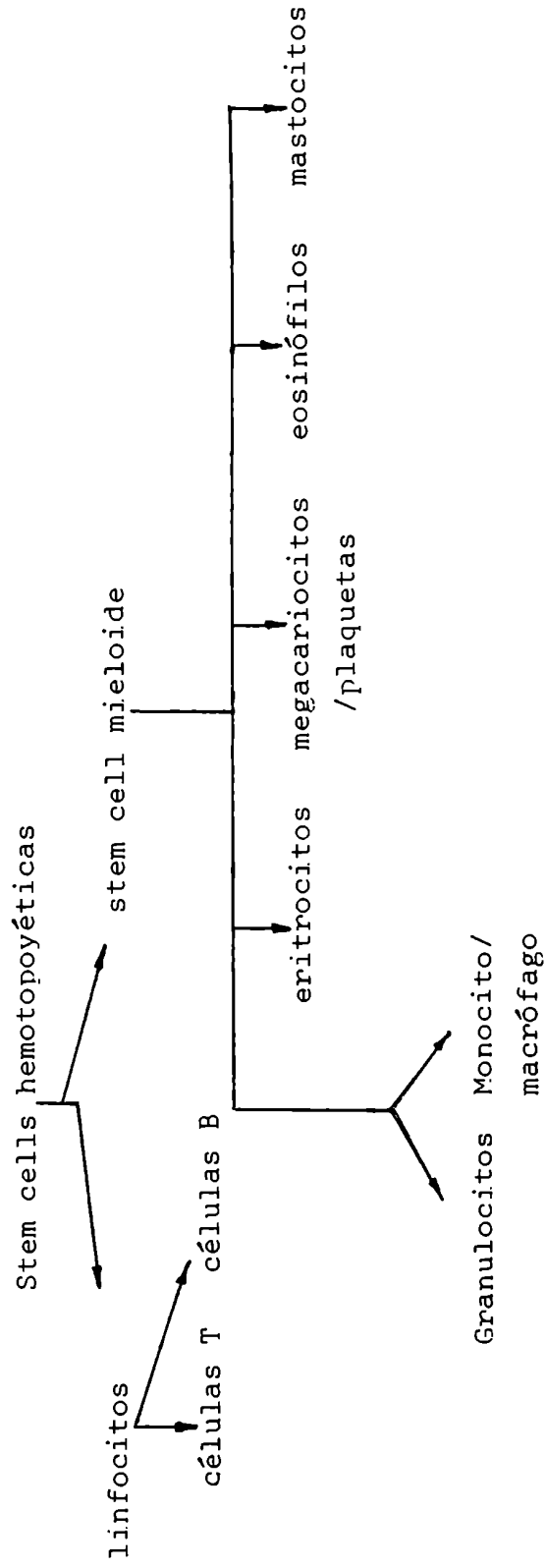
Los linfocitos se originan a partir de células indiferenciadas totipotentes o multipotenciales, las "stem cells" (célula madre o troncal) que en el período embrionario colonizan el hígado, pasando luego a la médula ósea en el adulto. Según el ambiente que rodea a estas células, especialmente el proveniente de las características de los órganos en que pueden colonizar y los productos que éstos sintetizan y secretan, pueden diferenciarse en linfocitos, eritrocitos, megacariocitos, plaquetas, eosinófilos, mastocitos, monocitos/macrófagos (MØ) y granulocitos: basófilos y neutrófilos o polimorfonucleares (PMN) (Fig. 1).

En este proceso interviene una glicoproteína, interleukina-3 (IL-3) o factor de crecimiento hematopoyético multilinear que estimula la diferenciación de las stem cells en células con decisión tomada ("committed cells") o células comprometidas.

Los linfocitos interactúan con el Ag a través de moléculas receptoras (Rc) que poseen sobre su membrana y es así como se activan y llevan a cabo varias funciones efectoras de la inmunidad (5).

3.1.1. Linfocitos B (LB): ó células productoras de Ac., son los responsables de la respuesta inmune humoral. Cuando las células se activan por reconocimiento de un invasor extraño, se diferencian a células plasmáticas que secretan Ac, los que se unen específicamente a la sustancia extraña e inician una variedad de respuestas de eliminación. Por lo tanto el resultado final de la estimulación antigénica es la secreción de Ac o la adquisición de memoria inmunológica no respondiendo al estímulo y haciéndose tolerogénico.

FIGURA 1: ONTOGENIA DE LAS CELULAS LINFOIDES



Para tales respuestas el LB requiere de las interacciones cooperativas con el LT, sobre todo para la respuesta a los Ags T dependientes ya que cuando no existe la colaboración T-B no hay respuesta positiva, mientras que en el caso de los Ags T independientes, aunque no exista colaboración T se estimula igualmente la respuesta inmune. Por ello es criticable la compartimentalización en dos clases de células inmunocompetentes (T y B) como responsables de la inmunidad celular (T) y humoral (B) ya que los LT juegan un rol adicional en la regulación específica de toda la respuesta inmune, sobre todo en la respuesta de Acs hacia los Ags T dependientes (6).

3.1.2. Linfocito T (LT): median la respuesta inmune celular. Cuando el organismo es invadido por una sustancia extraña, algunas de estas células lo reconocen, se activan e inician una serie de reacciones que incluyen la unión y eliminación de las células alteradas por el invasor. Como resultado de la estimulación antigénica los LT proliferan y se diferencian en:

- células T efectoras o reguladoras de la respuesta inmune.
- células T de memoria inmunológica: estas células al ponerse nuevamente en contacto con el Ag entran en blastogénesis y división proveyendo nuevos LT capaces de reconocer y reaccionar con el Ag que lo condujo a su diferenciación inicial.(7).

Mientras que los LB reconocen al Ag en circulación, a través de sus Igs de superficie, el LT a través del RcT sólo reconoce al Ag en la superficie celular de células que lo han procesado y no en circulación.

A diferencia de lo que ocurre con el LB, el LT sólo

reconoce al Ag cuando le es presentado por las células accesorias (macrófagos, células dendríticas, etc) asociado a los llamados A_gs del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) existentes en sus membranas, hecho que se conoce como restricción por el CMH.

El CMH es una región del cromosoma que codifica para una variedad de proteínas de la superficie celular que median interacciones celulares inmunes y rechazo de trasplantes de tejido extraño. En el ratón, los A_gs del CMH se llaman H-2 (por A_gs de histocompatibilidad 2) y en el hombre H-LA (por A_gs asociados a leucocitos humanos). Una clase de A_gs de trasplante, llamados A_gs de clase I del CMH, presentada virtualmente por todas las células de los vertebrados, juega un importante rol en la vigilancia inmunológica de los LT a infecciones virales y células cancerígenas. Los productos de los genes de clase I incluyen los A_gs de trasplante K,D y L (A, B y C en humanos) que son los responsables del fenómeno de rechazo de injertos. Otra clase de proteínas codificadas por el CMH, llamadas A_g de clase II o de la respuesta inmune, regula un gran número de interacciones celulares involucradas en la misma y se halla únicamente en LB, ciertos LT, algunos MØ y células presentadoras de A_g. Los A_g de clase II están localizados en la región I del CMH (SB, DC y DR en humanos) y proveen el reconocimiento de los elementos propios, son los marcadores de lo propio (8).

3.1.2.1. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T. LAS CELULAS T.

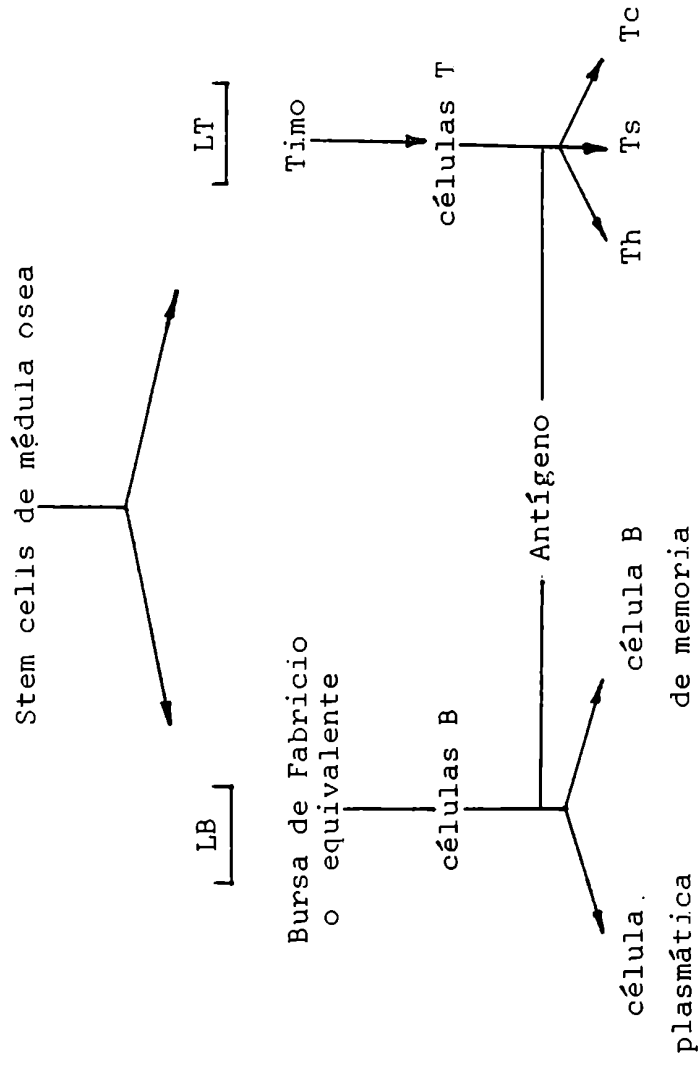
Las células T participan en mecanismos inmunológicos tales como rechazo de injertos, reacciones de hipersensibilidad retardada o delayed-type hypersensitivity (DTH), injerto contra huésped o graft-versus-host (G vs H), defensa contra virus y células tumorales y regulación de la respuesta inmune expresando funciones de colaboración o supresión sobre otros LT y LB. (9).

Por ello, de acuerdo a la función que ejercen se conocen distintas subpoblaciones de LT (Fig. 2):

- T citotóxicos o "killer" (asesinos) (Tc): son células con capacidad para matar a otras células. Este fenómeno es parte de la respuesta inmune contra tumores donde la célula efectora Tc reconoce al Ag del CMH clase I propio junto con el Ag extraño y así se produce la lisis de la célula blanco ("Target"). Las células Tc son portadoras del Ag Lyt 2 o sea con Lyt 1-, 2+ en el ratón y su equivalente en humano es CD8+ (10).

T "helper" o colaboradoras o auxiliares (Th): son células que colaboran con los LB en la respuesta de Ac frente a Ags T dependientes y también con los Tc. El reconocimiento del Ag se produce a través de células accesorias en las que el Ag extraño está asociado ahora al Ag del CMH clase II (Ia). Después del reconocimiento antigénico la célula Th libera factores solubles (linfoquinas) que actúan en la respuesta inflamatoria, en la DTH y en la respuesta a la infección por ciertas bacterias y virus (11) Al ser portadoras del Ag Lyt 1+, 2-; equivalente en humano es CD4+.

FIGURA 2: MADURACION DE LOS LINFOCITOS



T supresoras (Ts): son reguladores negativos ya que son células capaces de suprimir la respuesta inmune bloqueando o disminuyendo la actividad de otras células del sistema inmune (LB, Th). Reconocen al Ag extraño dentro del contexto de Ag del CMH de clase I y actúan a través de factores solubles. Son las células responsables de la tolerancia inmunológica, base de la incapacidad para montar una respuesta contra los propios Ags tisulares, lo cual no se cumple en las enfermedades autoinmunes. Cabe recordar aquí, que los LT poseen memoria y que posiblemente para cada una de las funciones mencionadas existan LT con memoria (12).

3.2. CELULAS NULAS

Además de los linfocitos T citotóxicos ("killer") (Tc) existe una variedad de células que destruyen células extrañas por lisis de contacto (13). Estas células incluyen a

- células "killer" (K).
- células "natural killer" (NK).
- células "natural citotoxic" (NC).

3.2.1. Células "K": Parecen linfocitos, como ellos participan en la respuesta inmune pero no presentan características clásicas de los LT ni de los LB y por ello se denominan células nulas To, U o K. Destruyen a la células blanco a través de Ac o sea mediante

citotoxicidad celular Ac dependiente (ADCC).

3.2.2. Células "NK"

Estas células juegan un rol importante en la vigilancia inmunológica contra el cáncer y matan aún en ausencia de Ac. Aunque matan a una variedad de tipos celulares, las células tumorales son más susceptibles a la lisis mediada por NK que las células normales. Poseen algunos marcadores comunes con los LT, por lo que se piensa que están relacionadas con las células T aunque también presentan ciertos marcadores encontrados en MØ y neutrófilos.

Se los define como Tc no restringidos por el CMH y que no pueden expresar el marcador CD3 propio de los LT aunque existen poblaciones NK-like que sí lo presentan.

3.2.3. Células "LAK"

Son linfocitos "killer activados por linfokinas" pero distintos de las Tc, con respecto a su origen desde células no T precursoras y a que su acción no está restringida por el CMH. Serían una mezcla de células NK activadas "in vitro" por IL-2 y LT con función NK-like, diferentes en su acción citolítica de los linfocitos infiltrantes del tumor denominadas TIL(14).

3.3. MONOCITOS-MACROFAGOS

Si bien sólo los linfocitos son capaces de reconocer y reaccionar específicamente contra un Ag, para montar una respuesta completa, se necesita de la participación de otros tipos de células auxiliares. Las células con funciones accesorias y que pueden presentar los Ag a los L T para su reconocimiento son fundamentalmente los MØ que se originan a partir de la "stem cell" totipotencial de médula ósea y que en una semana se diferencia a monoblasto → promocito → monocito que circula durante 24-48 hs en sangre periférica para migrar y establecerse en los tejidos como MØ tisular recibiendo distinto nombre de acuerdo a los diferentes tejidos. Así en el tejido conectivo son histiocitos, en el hígado células de Kupffer, en el sistema nervioso células de la microglía, en la piel células de Langerhans, en ganglio células dendríticas, en las cavidades serosas como el pulmón, macrófagos alveolares (15, 16).

Los macrófagos poseen tres funciones importantes:

- fagocitan y destruyen microorganismos extraños
- secretan proteínas biológicamente activas.
- ciertos MØ poseen la capacidad de ser células presentadoras de Ag. Como son células fagocíticas, por este mecanismo captan al Ag, lo procesan (degradando las proteínas) y una porción del Ag es reexpresado en la superficie de las células, de esta manera, se activan incrementando la producción de IL-1. El Ag procesado aparece en la superficie de las células accesorias, asociado a los Ags del CMH mediante uniones hidrofóbicas y en ese contexto es presentado al L T. Además de célula accesoria el MØ

actúa como célula efectora en citotoxicidad por ejemplo, pues responde a las linfokinas y se acumula en los sitios donde va a ocurrir la reacción. Es el principal componente en la respuesta inflamatoria de las reacciones de inmunidad celular e interviene en las reacciones inflamatorias crónicas que no involucran mecanismos inmunológicos (16).

3.4. OTRAS CELULAS CIRCULANTES

Existen varios tipos de células circulantes que participan activamente sobre el sistema inmune, incluyendo reacciones alérgicas. No son más numerosas que aquellas que responden específicamente a los Ag y la acción de cada una de ellas depende del estímulo. La función de algunas de estas células (neutrófilos) es directamente la muerte celular, mientras que otras, como los basófilos y mastocitos, liberan mediadores vasoactivos (17).

3.4.1. Neutrófilos: son los comunmente llamados leucocitos PMN. Responden rápidamente a varios estímulos quimiotácticos y poseen alta capacidad de fagocitosis interviniendo en reacciones mediadas por complejos Ag-Ac-C' (18).

3.4.2. Eosinófilos: son similares a los neutrófilos en su capacidad de generar metabolitos tóxicos del oxígeno y matar a una serie de microorganismos, pero de una manera menos eficiente, aunque juegan un papel importante en la defensa con-

tra parásitos. Contienen gránulos que se liberan después de la activación por unión a la IgE o IgG (19).

3.4.3. Mastocitos: Al igual que los basófilos producen y almacenan histamina que liberan cuando sus receptores de IgE se unen al complejo Ag-Ac. La liberación de histamina y otros mediadores como heparina producen vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y quimiotaxis de eosinófilos y esta liberación puede realizarse también por mecanismos que no dependen de IgE (20).

4. MODULACION INMUNE Y COOPERACION CELULAR

El sistema inmune es capaz de cambiar un tipo de respuesta por otra pues no es del "todo o nada", ya que posee un complicado mecanismo de regulación que elige el tipo de respuesta.

La función efectora se realiza a través de los LB productores de Ac, los Tc y los LT productores de factores solubles, mientras que la función reguladora se realiza mediante los Th y Ts, unos amplificando la respuesta y otros suprimiéndola.

Por lo tanto, no se debe hablar de inmunosupresión o inmunoestimulación, sino de inmunomodulación (21).

4.1. MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNE

Muchos tipos celulares tienen la capacidad de sintetizar y secretar productos específicos en respuesta a una estimulación específica. "Citokinas" es un término general que se refiere a todos los factores solubles producidos por las células a muy bajas concentraciones, y con una amplia actividad biológica.

"Linfokinas", en cambio, es un término que se refiere a una variedad de factores sintetizados y secretados por las células Th sensibilizadas por la unión específica a los Ag T dependientes o activados por la exposición a lectinas mitogénicas. (22)

Una subclase de linfokinas que activan a otros linfocitos son las "interleukinas" mientras que los factores producidos por los monocitos y MØ estimulados se denominan "monokinas"

4.1.1. INTERLEUKINA 1 (IL-1): es una monokina la cual se ha demostrado recientemente que actúa sobre los LT y otros tipos de células, designada inicialmente como factor activador de linfocitos (LAF). Una vez que el MØ se activa por la presencia de Ag o mitógenos, libera IL-1 que actúa sobre los Th. La IL-1 conjuntamente con la presentación del Ag al LT estimula la producción de IL-2 y aumenta el número de receptores para IL-2 en estos linfocitos.

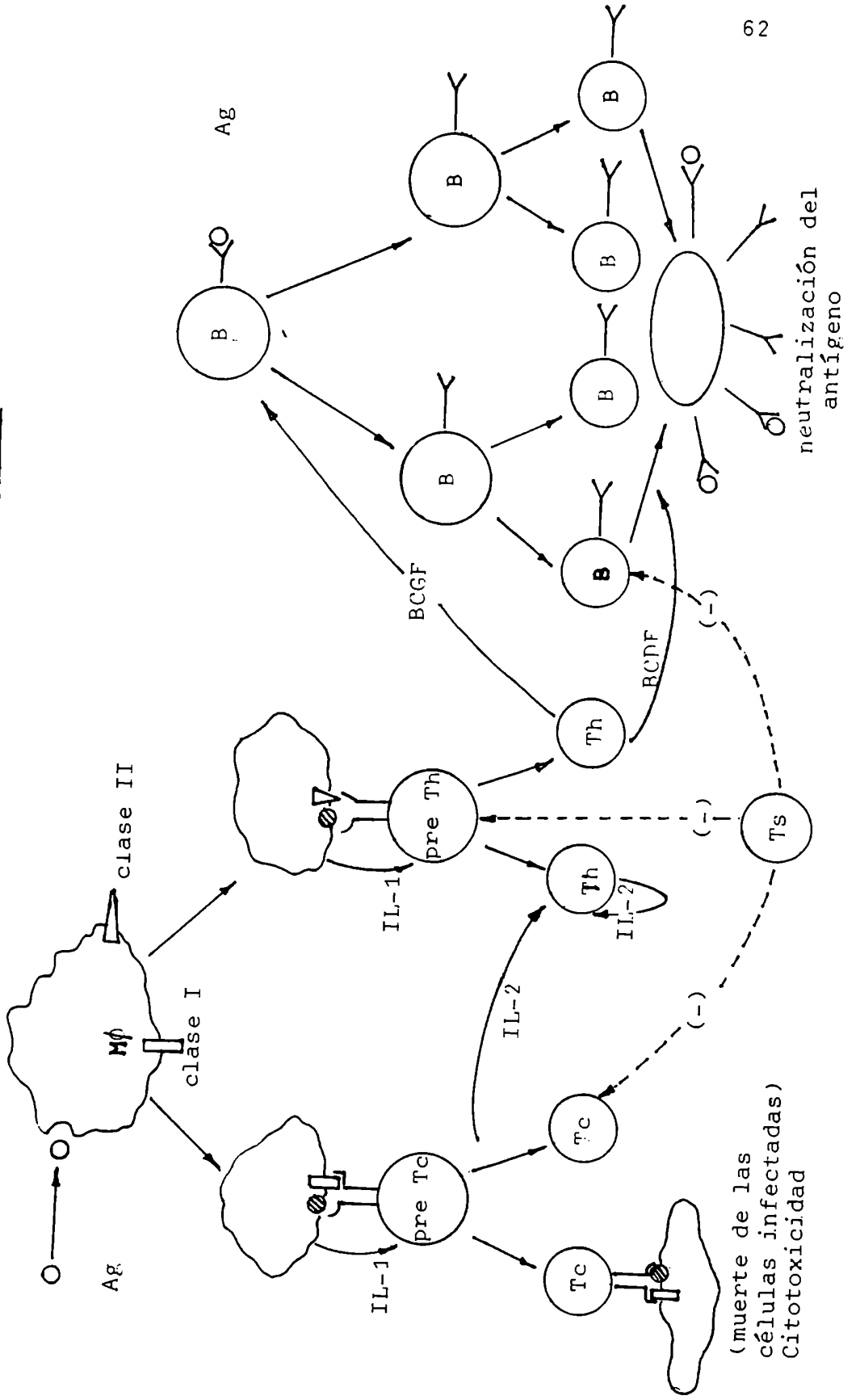
Con respecto a su acción sobre los LB, aumenta la liberación del factor de crecimiento para células B (BCGF) y por lo tanto la actividad de LB estimulados por Ag (23).

4.1.2. INTERLEUKINA 2 (IL-2): es una linfokina identificada como factor de crecimiento de células T (TCGF), producida por los Th efectores y que juega un papel importante en la generación de los Tc (24).

La IL-2 es producida por los LT activados y su especificidad de acción está ligada a la existencia en la células de receptores específicos para IL-2. Sin embargo estos receptores no están presentes en los LT en reposo, solo se expresan después de la activación del LT, es decir después de la presentación del Ag conjuntamente con la señal aportada por la IL-1. Así, para que un clon específico de LT proliferare es preciso, además del contacto antigénico (el cual selecciona la especificidad), que los MØ produzcan IL-1 y que el receptor de IL-2 aparezca en los LT específicos. Por lo tanto para que la IL-2 sea liberada necesita de un gatillado Ag-específico inicial, pero una vez liberada induce la proliferación de cualquier linfocito que posea receptor para IL-2 (Fig. 3).

4.1.3. INTERFERON (IFN- γ): es producido por LT estimulados por Ag o mitógenos. Como parte del circuito de linfokinas promueve una variedad de respuestas inmunorregulatorias ya que activa MØ y aumenta la expresión de Ag de clase II. Es una proteína esencial para la red de comunicación leucocitaria (25).

FIGURA 3: INTERACCIONES ENTRE CELULAS Y MEDIADORES SOLUBLES



4.1.4. OTRAS LINFOKINAS: Entre las muchas moléculas que el sistema inmune utiliza para comunicarse, se deben considerar:

- IL-3, factor de crecimiento de células hematopoyéticas en general.
- GM-CSF, factor estimulante de colonias granulocíticas, monocíticas.
- IL-4 o BCGFI, factor de crecimiento de células B.
- BCDF, factor de diferenciación de células B a células plasmáticas.
- TNF- β , factor de necrosis tumoral β o linfotoxina.

5. ANGIOGENESIS INDUCIDA POR COMPONENTES DEL SISTEMA IMMUNE.

5.1. ANGIOGENESIS INDUCIDA POR MACROFAGOS

Cuando se inoculan macrófagos activados en la córnea de animales singéneos y medios condicionados por estas células, se produce una intensa neovascularización (26). Diversos trabajos han demostrado que esta respuesta no está asociada con una reacción inflamatoria aguda (27-29).

Se ha demostrado además que la disminución en la tensión de oxígeno estimula a los macrófagos para que produzcan factores angiogénicos. Así tanto en los tumores, como en 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 (30-31).

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 (32).

La expresión de TNF- α por los monocitos requiere la activación de estas células, por ejemplo con IFN- γ 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 .(33)

Cuando los monocitos se activan adquieren la capacidad de inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, que es el proceso central en la inflamación, cicatrización de heridas y desarrollo tumoral (34)

5.2. ANGIOGENESIS 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. (35).

Cuando se implantan extractos tumorales en MCA, se observa un incremento de hasta el 40% en la densidad de mas-

tocitos 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 (36).

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 ve incrementada. Se ha demostrado además que el cocultivo de células tumorales con mastocitos produce la degranulación de éstos y la liberación de distintas sustancias, histamina, condroitín sulfato, heparina, tripsina, quimotripsina, etc. De todas ellas sólo la heparina promueve en forma significativa la migración endotelial (37).

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 (38).

5.2.1. HEPARINA:

Varios autores han demostrado que 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^{2+} (39).

Cuando se realiza el ensayo de angiogénesis, generalmente, se emplea cortisona para eliminar la inflamación que aparece, tanto en MCA como en córnea. 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 angiogénica. 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 produce regresión de la masa tumoral (40).

5.3. ANGIOGENESIS 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 (42).

La reacción de LIA se produce cuando existen diferencias en el CMH 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 dadores 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 (43).

Al estudiar las distintas poblaciones linfocitarias se demostró que las células responsables de inducir una res-

puesta 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 (44).

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 mediadores angiogénicos desde los LT activados.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS DE PORTADORES DE TUMOR EN UNA COMBINACION 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 (45-46), se trató de 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 C57B1/6, 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 sin geneico (riñón, glándula mamaria, músculo esquelético) por trócar en ratones de la cepa BALB/c. El tiempo de por tación 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 C57B1/6, 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 singéneos; éstos 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 aumen

to 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 (42); las observaciones se hicieron a doble ciego.

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

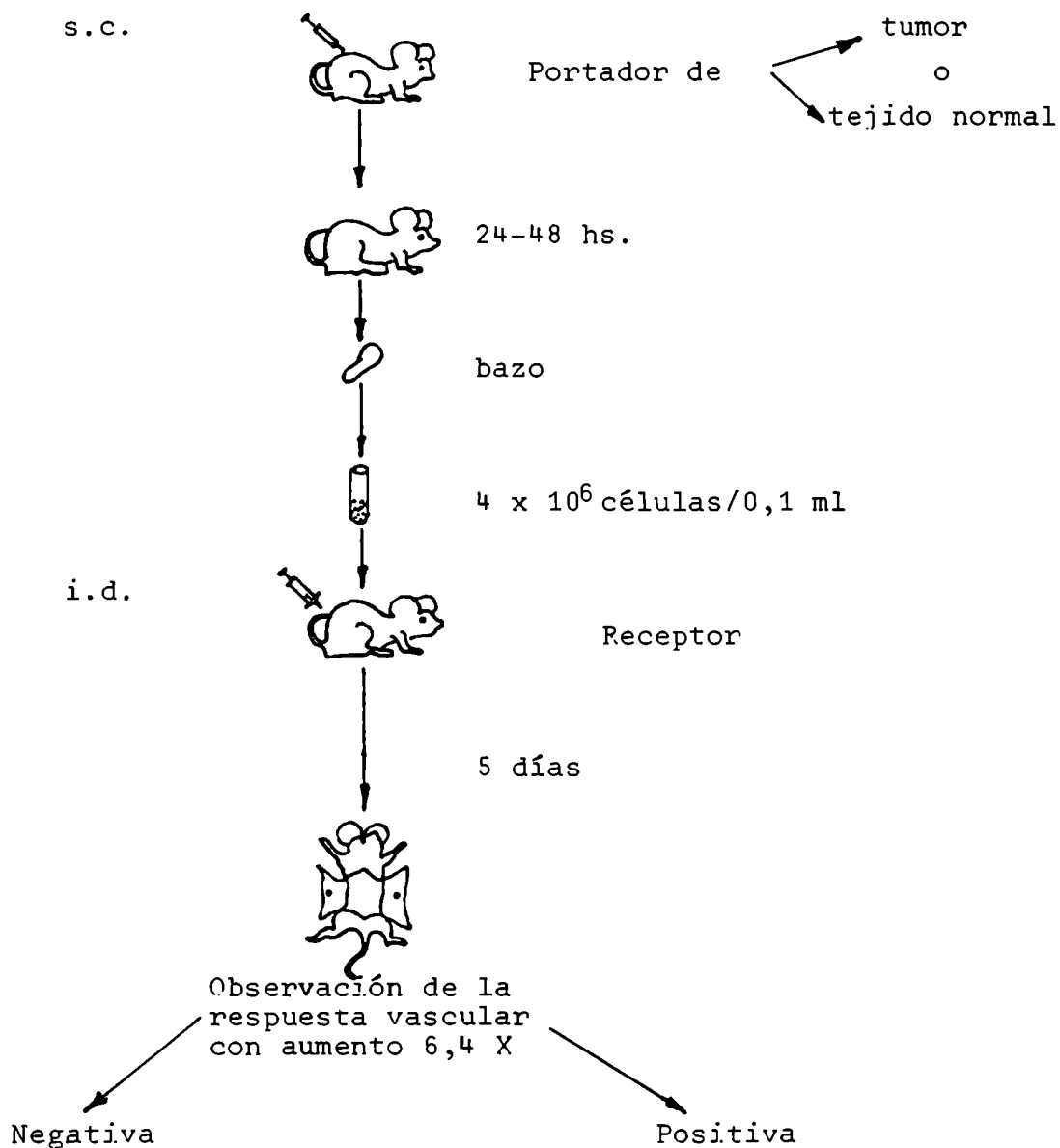
$$d = \frac{\sum \text{número de vasos sanguíneos en cada cuadrado}}{\text{número de cuadrados}}$$

Análisis estadístico

Los valores de densidad de vasos por mm^2 de piel fueron analizados por el test t_{u}^2 de Student.

''
L

ESQUEMA GENERAL DEL ENSAYO DE LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR
LINFOCITOS SINGENEICOS (SLIA)



Resultados

TABLA III.1 Respuesta vascular inducida intradérmicamente en ratones BALB/c.

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos (Nº de vasos/mm ² de piel) $\bar{X} \pm E.S.$	Número de sitios inoculados
1	2.78 \pm 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 III.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 inducen 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 divariaciones 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 singéneicos (syngeneic lymphocyte-induced angiogenesis, SLIA) podría contribuir entonces al establecimiento de una adecuada vascularización, cooperando con las células tumorales especialmente en los primeros estadios de portación de un tumor (47)

6.2. CORRELACION ENTRE LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS SINGENEICOS (SLIA) Y LA CAPACIDAD METASTASICA.

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 la siguiente técnica:

1. Se limpió el tumor, eliminándose la cápsula y las zonas necróticas.
2. Se lo cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm³.
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 gen-

tamina (80 mg/ml). Se observó la viabilidad celular (superior al 80% en todos los casos).

9. 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 30 mm (Falcon). Los cultivos se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ 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 bazos 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 bazos 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 misma forma que en el trabajo de la sección 6.1.

Resultados

TABLA III.2 Respuesta vascular inducida en ratones receptores.

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $X \pm E.S.$	Número de sitios inoculados
Ratones inoculados con:		
Cél. tumorales MM3	3.76 ± 0.13	17
Cél. tumorales M3	2.72 ± 0.07	18
Cél. normales	1.58 ± 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 singéneos, por células esplénicas activadas con células tumorales M3 ó MM3.

Como se puede observar en la Tabla III.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 (48).

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.

6.3. ESPECIFICIDAD DEL ESTIMULO ACTIVADOR DE LAS CELULAS 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 sin geneicos (49).

Materiales y Métodos

Se siguió el procedimiento detallado en la sección 6.1. 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 formas.c. e i.p.

Estímulo alogeneico: riñón o músculo de ratones normales C3H. 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 para esta respuesta angiogénica.

Ensayo del SLIA. Cuantificación de la vascularización

Como se explicó en la sección 6.1.

Resultados

TABLA III.3 Actividad angiogénica inducida por linfocitos singeneicos (SLIA)

Fuente de células de bazo	Nº de vasos/mm ² de piel X ± E.S.
. ratones inoculados con:	
tumor MM3	3.65 ± 0.145 (8) ***
riñón singeneico	1.53 ± 0.067 (8)
tejido fetal	1.44 ± 0.094 (8)
riñón alogeneico	1.51 ± 0.072 (10)
G.R.C.	1.51 ± 0.060 (12)
. hembra preñada	1.45 ± 0.074 (8)

*** p < 0.001

Los ratones portadores de los distintos tejidos se sacrificaron a las 24 hs, ya que los LT reconocen al tumor para la respuesta angiogénica en este período de tiempo.

De los resultados expresados en la Tabla III 3 se concluye que los linfocitos de la hembra preñada no son capaces de inducir la actividad angiogénica y que de todos los estímulos estudiados, solo el tumor activa a los linfocitos para dar una fuerte respuesta vascular.

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 (45, 46).

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 CMH 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 la 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 portadores como cuando

se ensayan i.d. los linfocitos de hembra preñada en los ratones receptores.

6.4. CELULAS TUMORALES FORMOLIZADAS Y SLIA

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 (50).

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 den-

sidad 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 6.1.

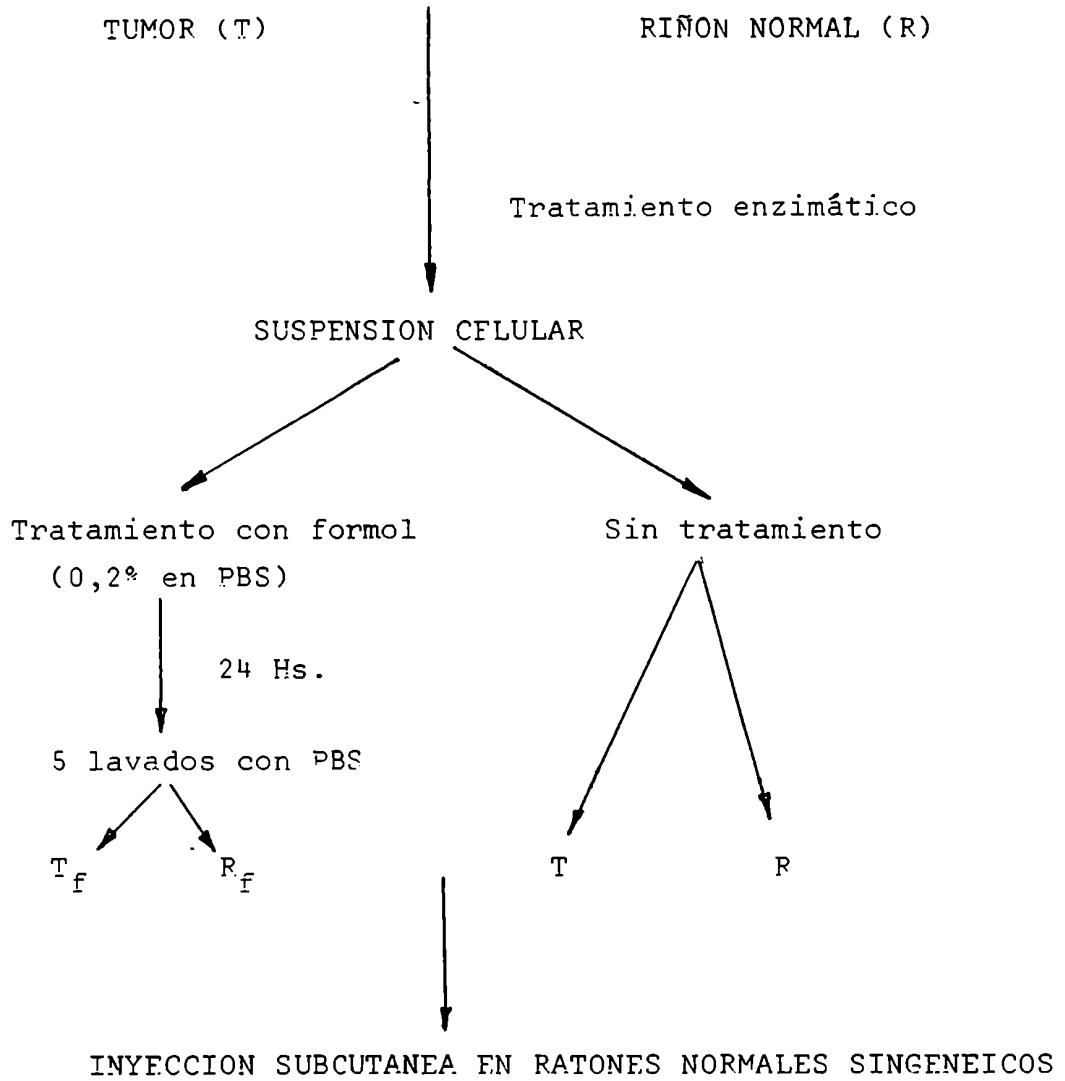
Preparación de células formolizadas

Se trataron 1×10^6 cels./ml de tumor MM3 o de riñón normal, con el mismo volumen de una solución de formol al 0.1% 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).

ESQUEMA DE OBTENCION DE CELULAS FORMOLIZADAS



Suspensión de células esplénicas. Ensayo de SLIA.
Cuantificación de la vascularización.

Se realizaron siguiendo la metodología ya mencionada.

Resultados

TABLA III.4 Respuesta vascular en los ratones receptores.

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm E.S.$	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 III.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 III.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 liberación de factores solubles (51).

6.5. EFFECTO DE EXTRACTOS TUMORALES SOLUBLES CON ACTIVIDAD ANTIGENICA, SOBRE LA ANGIOGENESIS.

Klein y colaboradores demostraron que la inoculación de un extracto soluble del tumor M3 (ETSM3) a ratones ex-portadores de tumor, aumentaba significativamente la incidencia de metástasis pulmonares a través de mecanismos mediados por el bazo(52). Ya que estos extractos tumorales poseían actividad antigénica y eran capaces de inducir a los linfocitos para la liberación de factores solubles, nos interesó determinar si los ETS podían estimular a ratones normales para producir una respuesta angiogénica.

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"

Extractos solubles

Se prepararon extractos solubles de órganos normales (EON) y de los tumores M3 y MM3. Para ello el tejido

fresco se homogenizó en 5 volúmenes de PBS, pH=7.2 con un homogenizador Virtis durante 5 minutos.

El sobrenadante se mezcló durante 30 minutos con cloroformo (2:1 v/v) y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El nuevo sobrenadante se conservó congelado durante toda una noche y después de descongelar se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos. Todos los pasos se realizaron a 4°C. La determinación de proteínas del extracto deslipidizado se realizó por el método de Lowry (53). Los extractos se conservaron a -20°C hasta su uso.

Inoculación de los extractos

Los ETS y EON se inocularon en forma s.c. en ratones BALB/c normales. El esquema de inoculación fue de 2 dosis de 100 ug de proteína cada una con un intervalo de 2 días. A las 24 hs se extrajeron los bazos.

Suspensión de células esplénicas. Ensayo de SLIA y Cuantificación de la vascularización.

Se realizaron siguiendo la metodología ya descripta.

Resultados

Los resultados de la Tabla III.5 muestran que los linfocitos de ratones inoculados con ETSM3 producen una acentuada respuesta vascular, mientras que los extractos totales de MM3 (100% de proteína) no alcanzan para activar a los linfocitos para la respuesta angiogénica. Este resultado,

nos sorprendió en un primer momento ya que tanto las células vivas como formolizadas de MM3 inducen una fuerte actividad angiogénica. Por todo ello creemos que la falta de respuesta del ETS MM3 se debería a la baja concentración intracelular de factores inductores de angiogénesis o a la presencia de inhibidores en la dosis proteica inoculada, sugiriendo la existencia de diferencias cuali y/o cuantitativas en los factores inductores de la angiogénesis presentes en los extractos tumorales totales de los dos adenocarcinomas estudiados (54).

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.

TABLA III.5 Respuesta vascular inducida i.d. en ratones normales BALB/c.

Origen de las células de bazo	Nº de vasos por mm ² de piel (X ± E.S.)	Nº de sitios inoculados
ETS M3	3.56 ± 0.29***	12
ETS MM3	1.66 ± 0.15	12
EON	1.49 ± 0.06	15

ETS M3: ratones inyectados con extracto tumoral soluble M3.

ETS MM3: ratones inyectados con extracto tumoral soluble MM3

EON: ratones inyectados con extracto soluble de órganos normales.

*** p < 0.001

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Hood L, Weissman I, Wood W, Wilson J.: The Immune System
En: Immunology pag. 1, (1984) Benjamin/Cumming, California.
- 2- Paul W.: Regulation of the Immune Response and the
Immune Network . En: Fundamental Immunology pag. 19 (1985)
Ed. por Raven Press N. York.
- 3- Braun M.: Inmunidad Celular, células que participan en la
respuesta inmune . En: Immunología e Inmunoquímica,
Margni R. pag. 31, (1981) Ed. por Panamericana Bs.As.
- 4- Truffa-Bachi P, Leclerc C.: Comment les cellules coopèrent
pour défendre l'organisme La Recherche 177:702, (1986).
- 5- Roitt I, Greaves M, Torrigiani G, Brostoff G, Playfair J.:
The cellular basis of immunological response: A synthesis
of some current views. Lancet, 2: 367 (1969).
- 6- Kamps W, Cooper M.: Microenvironmental studies of pre-B
and B cell development in human and mouse fetuses . J.
Immunol. 129: 526 (1982).
- 7- Benacerraf B, Unanue F.: Cellular basis of immunity .
En: Textbook of Immunology pag. 76 (1979). Ed. por Williams
& Williams, London.
- 8- Heber-Katz F, Schwartz P, Matis L, Hannum C, Fairwell T,
Appella E, Hansburg D.: Contribution of antigen-presenting
cell major histocompatibility complex gene products to
the specificity of antigen-induced T cell activation. J.
Exp. Med. 155: 1086 (1982).

- 9- Masmann T., Coffman R.: Two types of mouse helper-T cell clone-Implications for immune regulation Immunol. Today 8(7): 223 (1987).
- 10- Lanier L, Phillips J.: Evidence for three types of human cytotoxic lymphocyte. Immunol Today 7 : 132 (1986).
- 11- Fradelizi D.: Les messagers de L'Immunité . La Recherche 177: 668 (1986).
- 12- Ptak M., Bereta M., Marankiewicz R., Gershon K., Green D.: Production of antigen-specific contrasuppressor cells and factor and their use in augmentation of cell-mediated immunity. J. Immunol.133(2): 623 (1984).
- 13- Benacerraf B., Unanue E.: Tumor Immunology. En Textbook of Immunology Pag. 196 (1979). Ed. por Williams & Williams London.
- 14- Grimm F, Mazumder A., Zhang H., Rosenberg S.: The lymphokine activated killer cell phenomenon: Lysis of NK-resistant fresh solid tumor cells by IL-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes . J. Exp. Med. 155: 1823 (1982).
- 15- Unanue E.R.: Antigen presenting function of the macrophage. Annual Review of Immunol. 2: 395 (1984).
- 16- Sorg C., Lohmann-Matthes.: Macrophages and accessory cells of the immune system . Immunol. Today 10(8): 527 (1989).
- 17- Larsen G., Henson P.: Mediators of inflammation . Ann. Rev. Immunol. 1: 335 (1983).
- 18- Johnston R.: Defects of neutrophil function . New Eng. J. Med. 307: 434 (1982).

- 19- Greene M, Schatten S, Bromberg J.: Delayed Hypersensitivity
En Fundamental Immunology pag. 685 (1985) Ed. Por Raven
Press. N York.
- 20- Stevens R, Austen F.: Recent advances in the cellular and
molecular biology of mast cells Immunol. Today 10(11):
381 (1989).
- 21- Rich R, Fl Mary M, Fox F.: Induction of suppresor T Cells
by cytokines . Transplant Proc., 20(6): 1156 (1988).
- 22- Banchereau J.: Lymphokine receptor interactions . Immunol.
Today, 10(3): 73 (1989).
- 23- Larrek J.: Native interleukin-1 inhibitors Immunol Today,
10 61 (1989).
- 24- Smith K.: Interleukin-2: Inception, Impact and Implications.
Science 240: 1169 (1988).
- 25- Svedersky L, Neduin G, Goeddel D, Palladino M.: Interferon-
enhances induction of lymphotoxin in recombinant interleukin
2-stimulated peripheral blood mononuclear cells . J.Immunol,
134(3): 1604 (1985).
- 26- Polverini P., Cotran K., Gimbrone M., Unanue E.: Activated
macrophages induce vascular proliferation. Nature 269:
804, (1977).
- 27- Clark R., Hunt T.: Role of macrophages in wound healing
Surg. Forum 27: 16,(1976).
- 28- Nathan C., Murray H., Cohn Z.: The macrophage as effector
cell . N. Engl. J. Med. 303: 622,(1980)

- 29- Unanue E.: Secretory function of mononuclear phagocytes. Am. J. Pathol. 83: 396 (1976).
- 30- Knighton D., Silver I., Hunt T.: Regulation of wound-healing angiogenesis. Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery 90: 262 (1981).
- 31- Thakral K., Goodson W., Hunt T.: Stimulation of wound blood vessels growth by wound macrophages. J. Surg.Res. 26: 430 (1979).
- 32- 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).
- 33- Whal S., Mc Cartney-Francis N., Mergenhagen S.: Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-B . Immunol. Today 10(8): 259 (1989).
- 34- Leibovich I., Polverini P., Kock A.: Induction of neovascularization by activated human monocytes . J. Leukocyte Biol. 39: 233 (1986).
- 35- Lauria L., Sacerdote de Lustig E.: Mastocitos durante el crecimiento de un tumor experimental en ratón . Medicina 48(6): 651 (1988).
- 36- 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).
- 37- Kessler D., Langer R., Pless N., Folkman J.: Mast cells and tumor angiogenesis. Int. J. Cancer 18: 703 (1976).

- 38- Vlodavsky I., Michaeli R., Barner M., Fridna M., Horowitz A., Fules Z., Biran S.: Involvement of heparanase in tumor metastasis and angiogenesis . Isr. J. Med. Sci. 24(9-10): 464 (1988).
- 39- 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).
- 40- Folkman J.: Regulation of angiogenesis: a new function of heparin. Biochem. Pharmacol. 34: 905 (1985)
- 41- Sidky Y., Auerbach R.: Lymphocyte-induced angiogenesis: A quantitative and sensitive assay of the graft-vs-host reaction. J. Exptl. Med. 141: 1084 (1975)
- 42- Auerbach R., Kubai L., Sidky Y.: Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. Cancer Res. 36: 3435 (1976)
- 43- Auerbach R., Sidky Y.: Nature of the stimulus leading to lymphocyte-induce-angiogenesis. J. Immunol. 123: 751 (1979)
- 44- 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)
- 45- Nishioka K., Katayama I.: Angiogenesis activity in culture supernatants of antigen-stimulated lymph node cells. J. Pathol. 126: 63 (1978)
- 46- Pliskin M., Ginsberg S., Carp N.: Induction of neovascularization by mitogen-activated spleen cells and their supernatants. Transplantation 29: 255 (1980).

- 47- Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Lymphocyte-induced angiogenesis in a syngeneic combination . Transplantation 37: 327,(1984).
- 48- Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E.: Correlation between the metastatic ability and the lymphocyte-induced angiogenesis. Inv. & Metast. 6:313 (1986).
- 49- Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Especificidad de la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA) de un portador de tumor . Medicina 48(6): 599 (1988)
- 50- 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).
- 51- Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Angiogenesis inducida por linfocitos: actividad de los linfocitos estimulados por células tumorales formolizadas. Medicina 44(6). 637 (1984)
- 52- Klein S., Bonaparte Y., D'Elia I.: Enhancement of the incidence of metastasis in tumor-resected mice .Invasion Metastasis 14(5): 309 (1985).
- 53- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent . J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
- 54- Davel L., Miguez M., Klein S.: Efecto de extractos solubles tumorales con actividad antigénica sobre la angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos . Medicina 47(6): 651 (1987).

CAPITULO IV ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE FACTORES ESPLENICOS
POBLACIONES CELULARES

INDICE	Pag
1. Actividad biológica de factores esplénicos.....	97
1.1. Exacerbación del crecimiento tumoral por factores esplénicos.....	97
1.2. Actividad angiogénica de factores esplénicos....	98
2. Poblaciones celulares esplénicas.....	99
2.1. Poblaciones celulares responsables de la exacerbación tumoral.....	99
2.2. Poblaciones celulares involucradas en la angiogénesis inducida por linfocitos.....	100
3. Desarrollo experimental.....	100
3.1. Correlación entre la actividad exacerbadora del del crecimiento tumoral y la actividad angiogénica.....	100
3.1.1. Actividad angiogénica de So de bazo de portadores de tumor.....	101
3.1.2. Actividad angiogénica de So de bazo de ex-portadores de tumor.....	106
3.2. Poblaciones celulares responsables de la actividad angiogénica.....	110
3.2.1. Estudio a partir de So esplénicos.....	110
3.2.2. Estudio a partir de células de bazo de ratones nude.....	115
3.2.3. Función de los MØ en el ensayo de SLIA...	117
4. Bibliografía.....	122

1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES ESPLÉNICOS

1.1. EXACERBACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR FACTORES ESPLÉNICOS.

La exacerbación del crecimiento tumoral se atribuye a diversos mecanismos (1). En etapas tempranas del crecimiento tumoral, los esplenocitos del huésped son capaces de inhibir el crecimiento tumoral cuando se inoculan junto con las células tumorales. A medida que el tumor progresa, esa actividad inhibidora desaparece y ya a los 16-18 días de evolución se encuentra actividad exacerbadora del crecimiento tumoral tanto en los esplenocitos como en los sobrenadantes (So) de cultivo de los mismos. El bazo posee un papel regulador muy importante en la aparición y crecimiento de un tumor (3). Algunos autores postulan que los factores inmunoreguladores liberados por esplenocitos, en realidad son secretados por las células tumorales y luego absorbidos por los linfocitos (4).

Diversos estudios demostraron que en condiciones apropiadas y dependiendo del modelo experimental usado, las células linfoides pueden tener un comportamiento estimulatorio o inhibitorio sobre el crecimiento tumoral.

En nuestro laboratorio, estudios realizados en ratones portadores de un adenocarcinoma mamario S13, se estableció la existencia de factores esplénicos que modulan el crecimiento tumoral (5). La actividad exacerbadora aparece alrededor del día 7 de portación del tumor y persiste durante toda la evolución tumoral y es necesaria la presencia del tumor metabólicamente activo para que los esplenocitos mani-

fiesten un neto efecto estimulador. Si bien existen diferencias con respecto al comportamiento del bazo luego de la cirugía tumoral, es claro que posteriormente a la extirpación del tumor, la actividad exacerbadora desaparece (6).

1.2. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE FACTORES ESPLENICOS

Sobrenadantes de cultivo de células de bazo tratadas con mitógenos de células T poseen actividad angiogénica cuando se ensaya la angiogénesis en MCA (7).

Esto significaría que el sistema linfoide contribuye a la neovascularización en muchas reacciones inflamatorias inmunológicas. Los linfocitos estimulados por Ag y mitógenos liberan linfokinas y es posible que uno de estos factores estimule la proliferación endotelial. Sin embargo Nishioka y col. encontraron actividad angiogénica en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos estimulados por Ag, no hallando correlación entre las actividades angiogénica y blastogénica (8).

Por otra parte, los sobrenadantes de cultivo de líneas linfoblastoideas humanas que contienen las mismas linfokinas que las que se obtienen por estimulación antigénica de linfocitos humanos poseen una marcada actividad inhibitoria de la migración de células endoteliales (9). Sin embargo, los So de esplenocitos de ratón obtenidos por cultivo mixto leucocitario, contienen una linfokina mitogénica para células endoteliales (10). Además, en estudios realizados en conejos se pudo evidenciar que los

So de cultivos de células T estimulados por mitógeno producen una linfokina con potente actividad angiogénica (11).

2. POBLACIONES CELULARES ESPLÉNICAS

2.1. POBLACIONES CELULARES RESPONSABLES DE LA EXACERBACION TUMORAL.

El bazo es un órgano formado principalmente por LB, LT y alrededor de 3% de M0. Cualquiera de estas poblaciones celulares pueden ser las responsables de la liberación de factores exacerbadores (12, 13).

En nuestro laboratorio se determinó que en un portador de tumor precoz, tanto la población T como no-T son responsables de la actividad exacerbadora. Cuando se estudiaron los So de cultivo de ambas poblaciones en un estadio avanzado, se observó que sólo la población T libera factores exacerbadores (14). Estos resultados están de acuerdo con hallazgos de otros investigadores que indican que las actividades de células T y no-T, no siempre requieren el contacto célula-célula, sino que los efectos pueden ser obtenidos por mediadores solubles derivados de las diferentes poblaciones esplénicas (15). Estos mediadores tienen la capacidad de exacerbar el crecimiento tumoral por diferentes mecanismos que podrían involucrar la aparición de células supresoras o la anulación de funciones helper o citotóxicas (16).

2.2. POBLACIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS

En los primeros trabajos sobre LIA, Sidky y Auerbach de terminaron que tanto las células de bazo v nódulos linfáticos como los timocitos resistentes a los corticoides son capaces de inducir una fuerte respuesta vascular, sugiriendo que la población efectora era de origen tímico o timo dependiente (17). Más adelante, a partir de antisueros monoclonales se identificó a las células efectoras del LIA como Thy 1.2(+), Lyt 1+2- o sea células T productoras de linfokinas (18). En la actualidad, con un Ac monoclonal, se demostró que el factor inductor de la angiogénesis es producido por LT murinos que poseen el Ag L3T4 (19). Pero aún hoy, no se conoce completamente cual es el rol del sistema inmune en la mediación de la angiogénesis.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD EXACERBADORA DEL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA ACTIVIDAD ANGIOGENICA.

Los So 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 (20).

Dado que los factores angiogénicos favorecen el desarrollo de los tumores, se pensó que la actividad exacerba-

dora podía deberse, al menos en parte, a la liberación de factores solubles desde los linfocitos activados, capaces de inducir una respuesta vascular.

3.1.1. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE SO DE BAZO DE PORTADORES DE TUMOR

Se comenzó por estudiar los factores solubles liberados por los esplenocitos de portadores de tumor precoz y avanzado para determinar si el tamaño tumoral tiene influencia sobre la actividad angiogénica.

Materiales y Métodos

Tumor

Se utilizó un adenocarcinoma mamario medianamente metastastizante en pulmón (S13) que se mantiene por transplante s.c. en ratones singeneicos y produce la muerte de los animales a los 30-35 días post-transplante.

Animales

Ratones endocriados de la cepa BALB/c de 2-3 meses de edad de ambos sexos pertenecientes al Bioterio del Instituto "A.H.Roffo". Fstos animales se separaron en tres grupos:

1) Control: se utilizaron los bazos de ratones normales para

ser procesados y obtener So de bazo normal.

2) Portadores de tumor chico (small tumor-bearing mice:STBM): recibieron en forma s.c. en el flanco izquierdo 1 mm³ de tumor S13 con trócar. El tumor creció hasta alcanzar un diámetro promedio de 10 mm (7-10 días de evolución).

3) Portadores de tumor grande (large tumor-bearing mice:LTBM): la diferencia con el grupo anterior es el tiempo de evolución del tumor (20-25 días) lo que equivale a un diámetro promedio de 20 mm.

Suspensiones de células esplénicas de los ratones portadores de tumor

Los ratones portadores de tumor se sacrificaron por dislocación cervical. Los bazos se extrajeron en forma estéril y se procesaron siguiendo la metodología detallada anteriormente.(Cap. III).

Como control se prepararon suspensiones de células esplénicas aisladas desde ratones normales.

Estas suspensiones fueron utilizadas para preparar los So de cultivo o bien para ensayar en forma directa la reacción de SLIA.

Preparación de los So

Los So de bazo de los tres grupos antes mencionados se prepararon como sigue: los bazos fueron extirpados en condiciones estériles y su células dispersadas mecánicamente.

Los glóbulos rojos fueron lisados con Tris-NH₄Cl (9 vol, 0.83% NH₄ Cl y 1 vol, 0.17M Tris (hidroxi metil)- ,

aminoetano) pH: 7.2. Las células linfoideas fueron suspendidas en medio 199 y lavadas dos veces. Estas células fueron cultivadas por 24 hs en medio 199 suplementado con 10 mM HEPES, 50 unidades de penicilina por ml y 50 ug de streptomina por ml, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

La viabilidad de las células, determinada por el método de exclusión del Tripan Blue fue siempre superior al 85%. Se cultivaron 25 x 10⁶ células viables/ml en tubos de poliestireno de 9 ml de capacidad. Se cultivaron 2 ml de la suspensión celular por tubo.

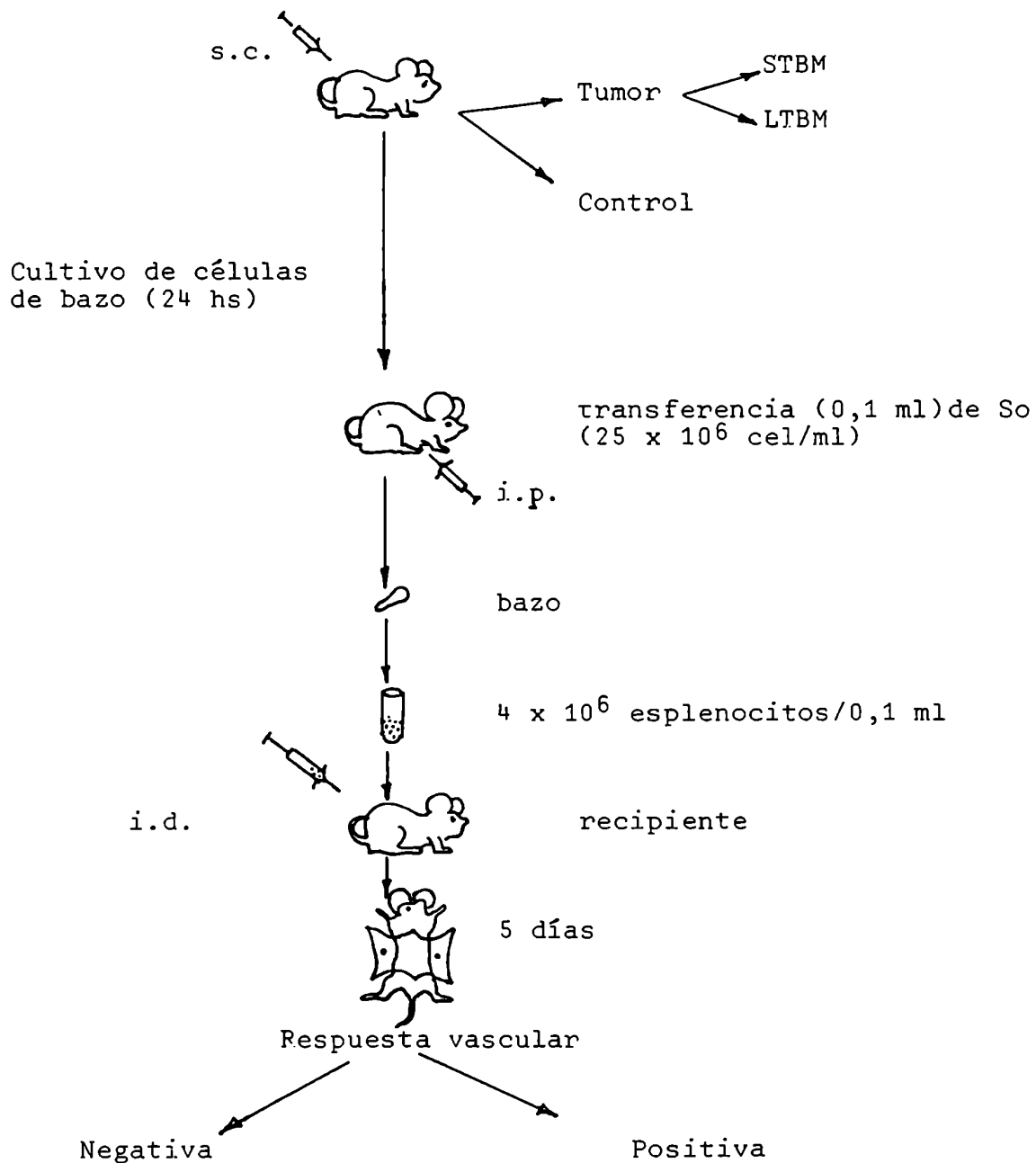
Luego de cultivar las células por 24 hs los sobrenadantes libres de células fueron obtenidos por centrifugación a 1500 g durante 15 min. Estos So así obtenidos se envasaron en frascos conteniendo 10 ml, se congelaron a -40°C y luego se liofilizaron. La concentración proteica de los mismos fue de 1 mg/ml.

Los So se conservaron liofilizados y se usaron en todas las experiencias siguientes.

Transferencia de la actividad biológica de los So.

Los medios condicionados, que difunden rápidamente desde la zona de inoculación, no pueden ser inoculados i.d. en la piel del ratón pues son factores solubles. Por ello y como la actividad biológica de los So puede ser transferida a ratones normales (6), se inyectaron i.p. 0,1 ml de los So de bazode los tres grupos anteriores a ratones normales (Figura 1).

FIGURA 1: ESQUEMA DE SLIA PARA TRANSFERENCIA DE So



Suspensiones de células de bazo de los ratones trans-
feridos con So. Ensayo de SLIA y cuantificación de
la vascularización.

Se realizaron con la metodología ya descripta.

Resultados

TABLA IV.1 Respuesta vascular inducida por células esplé-
nicas de ratones portadores de tumor S13.

Origen de las células esplé- nicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ E.S.	Número de sitios inoculados
Portadores de tumor S13	4.13 \pm 0.05	20
Ratones normales	1.67 \pm 0.09	20

Los resultados expresados en la Tabla IV.1 de-
muestran que las células esplénicas de ratones portadores de
tumor S13 son capaces de inducir una fuerte reacción angiogé-
nica cuando se las inocula en la piel de ratones normales
singeneicos.

La respuesta vascular inducida por las células es-
plénicas de portadores de tumor S13 difiere significativamen-
te ($p < 0.001$) de la respuesta inducida por células espléni-
cas de ratones normales.

TABLA IV.2 Respuesta vascular inducida por So de cultivo de esplenocitos de ratones portadores de tumor

Origen de las células de bazo	Nº de vasos por mm ² de piel $\bar{X} \pm E.S.$	Nº de sitios inoculados
Ratones transferidos con So de:		
STBM	4.10 + 0.09***	15
LTBM	4.22 + 0.32***	14
Control	1.76 + 0.09	13

STBM: ratones portadores de tumor pequeño

LTBM: ratones portadores de tumor grande

Control: ratones normales.

*** $p < 0.001$

Los resultados de la Tabla IV.2 indican claramente que los So de bazo de ratones portadores de tumor (STBM y LTBM) contienen factores solubles capaces de inducir una fuerte respuesta vascular independientemente del tamaño del tumor.

3.1.2. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE SOBRENADANTES DE BAZO DE EX-FORTADORES DE TUMOR

Dado que la angiogénesis es uno de los procesos que facilitan el desarrollo tumoral, y está mediada por factores

solubles, nos interesó investigar que ocurre después de la cirugía tumoral. Para ello realizamos el ensayo del SLIA en ratones exportadores de tumor S13.

Materiales y Métodos

Tumor, Animales, Obtención de los So de esplenocitos, Transferencia de la actividad de los So, Suspensiones de células de bazo de los ratones transferidos con So, Ensayo de SLIA y Cuantificación de la vascularización.

Se realizaron con la metodología ya descrita. La única diferencia consiste en los grupos de animales estudiados:

1) Ex-portadores de tumor grande (large tumor-resected mice, LTRM): Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 20 mm, los animales fueron anestesiados con Nembutal extirpándose la masa tumoral. Los bazos fueron procesados a distintos tiempos post-cirugía (generalmente 7 días). (Fig. 1).

2) Ex-portadores de tumor chico (small tumor-resected mice: STRM) La diferencia con el grupo anterior fue en el tamaño tumoral (10 mm) equivalente a 7-10 días de evolución.

Resultados

TABLA IV.3 Respuesta vascular inducida por So de cultivo de esplenocitos de ratones esportadores de tumor.

Origen de las células de bazo	Nº de vasos por mm ² de piel $\bar{X} \pm \text{E.S.}$	Nº de sitios inoculados
Ratones transferidos con So de:		
LTRM	3.85 \pm 0.07***	11
STRM	1.62 \pm 0.06	13
Control	1.76 \pm 0.09	13

LTRM: ratones ex-portadores de tumor grande.

STRM: ratones ex-portadores de tumor pequeño

Control: ratones normales.

*** $p < 0.001$

De la tabla anterior, surgen los efectos de la cirugía tumoral. Cuando ésta se realiza en una etapa precoz los So (STRM) no manifiestan actividad angiogénica, pero si la cirugía se realiza en una etapa avanzada los So inducen una fuerte respuesta vascular, lo que indicaría en principio que actuarían en forma paralela con la exacerbación tumoral.

En la Tabla IV.4 mostramos la existencia de una fuerte correlación entre la actividad angiogénica y la exacerbación del crecimiento tumoral de los medios condicionados obtenidos desde STBM, LTBM, STRM, LTRM.

TABLA IV.4 Actividad biológica de factores esplénicos

So	Actividad exacerbadora del crecimiento tumoral	Actividad Angiogénica
STBM		
LTBM		
STRM		
LTRM	15 días post cirugía	
	15 días post cirugía	
Control		

Podemos concluir entonces, que factores solubles son los mediadores de la actividad angiogénica. Estos factores son liberados en las condiciones de cultivo, por los esplenocitos de portador de tumor y el ex-portador de tumor avanzado. Cuando la cirugía se realiza en cambio en un portador de tumor pequeño, desaparecen los factores capaces de inducir angiogénesis.

Este comportamiento es similar a lo que ocurre con la actividad exacerbadora del crecimiento tumoral, sugiriendo que la diferencia en el comportamiento de las células de bazo después de la cirugía de un tumor grande o pequeño se debe a cambios cuali o cuantitativos en las subpoblaciones esplénicas. Por lo tanto los linfocitos estimulados por el tumor ejercen algún control sobre la neovascularización durante el desarrollo tumoral (21).

El mecanismo involucrado en la respuesta angiogénica

ca"in vivo"aún no está completamente dilucidado. Los linfocitos activados liberan linfokinas 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.

3.2. POBLACIONES CELULARES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANGIOGENICA

Para caracterizar desde el punto de vista del donador la población celular responsable de inducir la respuesta vascular, se ensayaron los So obtenidos desde cultivos de distintas poblaciones de células esplénicas de ratones portadores de tumor (3.2.1.). Por otro lado se estudió la respuesta angiogénica inducida por células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+), portadores de tumor. (3.2.2).

Se estudió además, la población celular involucrada en el SLIA desde el punto de vista del receptor de esplenocitos (3.2.3).

3.2.1. ESTUDIO A PARTIR DE So ESPLENICOS

Materiales y Métodos

Tumor

Se utilizó un adenocarcinoma mamario S13 descripto

anteriormente.

Animales

Se usaron ratones endocriados BALB/c normales y portadores de tumor (STBM y LTBM) como se explicó en la sección 3.1.1.

Preparación de So

Los bazos de STBM y LTBM se extirparon esterilmente, se realizó la suspensión celular y el cultivo como se describió en la sección 3.1.1.

Luego de 24 hs de cultivo se cosecharon los So y se ensayaron para la actividad angiogénica.

Se obtuvieron So de cultivo de los siguientes grupos:

- a) esplenocitos de portadores de S13 sin tratamiento.
- b) esplenocitos de portadores de S13 fraccionados por columna de nylon.
- c) esplenocitos de portadores de S13 pretratados con suero anti Thy 1.2 + C'.
- d) esplenocitos de ratones normales.

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 an

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 volúmen 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:

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

El C.I. fue de aproximadamente el 20% en todas las suspensiones de células esplénicas de los ratones portadores de tumor S13. 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 (viabiles) se colectaron y resuspendieron en medio TC 199. Las células viabiles se ajustaron a una concentración de 25×10^6 células/ml y se cultivaron para obtener los So correspondientes (22).

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 células aisladas desde ratones portadores de tumor) en medio de cultivo.

Después de la siembra, las columnas se mantuvieron durante 45' a 37°C (23). 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 So.

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 50% mientras que el pasaje por la 2^o columna elevó este valor hasta un 80%.

Transferencia de los So

Los So 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. Ensayo de SLIA y cuantificación de la vascularización.

Se realizaron con la metodología habitual.

Resultados

TABLA IV.5 Respuesta vascular inducida por células de bazo de ratones transferidos con So.

Origen de las células de bazo	Densidad de vasos $\bar{X} \pm E.S$	Nº de sitios inoculados
Ratones transferidos con:		
So de STBM o LTBM (sin fraccionamiento)	4.16 \pm 0.09***	16
So de STBM o LTBM enriquecida en L.T.	3.72 \pm 0.09	12
So de STBM o LTBM enriquecida en L no-T	1.87 \pm 0.05*	14
So de bazo normal	1.76 \pm 0.08	16

*** $p < 0.001$

* no significativo

En la tabla se observan los resultados, en los cuales no se separaron los datos de STBM y LTBM ya que ambos tenían igual comportamiento.

Después del tratamiento con antiThy 1.2 + C', los

So enriquecidos en células B, no son capaces de inducir una respuesta vascular, ya que la densidad de vasos no difiere significativamente del control (So de bazo normal, En cambio, los So de la suspensión enriquecida en células T son fuertes inductores de la angiogénesis, indicando que sería la población T la responsable del fenómeno SLIA. La diferencia observada entre la población no tratada y la enriquecida en LT, si bien no es significativa, podría estar indicando que los MØ, presentes en el bazo, cumplen también alguna función en esta respuesta.

3.2.2. ESTUDIO A PARTIR DE CELULAS DE BAZO DE RATONES ATIMICOS

Para comprobar el resultado anterior quisimos estudiar que ocurría con respecto al SLIA con los esplenocitos de ratones portadores de tumor atímicos o sea que carecen de L.T.

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".

Patones 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. Es-

tos animales se mantuvieron en condiciones estériles (en flujo laminar), dentro de cajas autoclavadas; recibieron comida esterilizada y agua estéril acidificada.

Tumores

Se empleó el tumor MM3.

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 MM3 mediante un trócar.

Suspensiones de células esplénicas.

Se prepararon suspensiones de células esplénicas de ratones atímicos (nu/nu) y heterocigotas (nu/+) portadores de tumor MM3, 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 IV.6 Respuesta vascular inducida por células esplénicas de ratones portadores de tumor MM3.

Origen de las células esplénicas	Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ F.S.	Nº 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

*** $p < 0.001$

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 IV.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 (24).

3.2.3. FUNCION DE LOS MØ EN FL ENSAYO DE SLIA

La reacción de SLIA es el resultado final de una cas

cada 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 participaban 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) (25).
- 2- el efecto de la indometacina (inhibidora de la síntesis de PGs) ver capítulo V.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, machos o hembras de 3 a 6 meses de edad, de las cepas BALB/c y c57B1/6, 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 6.2.(Cap. III).

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 / 0.1 ml) en los ratones receptores.

Resultados

TABLA IV.7 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 $\bar{X} \pm E.S.$	Nº 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 N°IV.6 , 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 depleción de los macrófagos, que se traduce en la disminución en el valor de densidad de vasos en los ratones tratados.

4. BIBLIOGRAFIA

- 1- Isakov N., Segal S., Hollander N., Feldman M.: An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor-bearing animals. I. Effect on tumor growth and antibody production. Int. J. Cancer 22: 465 (1978).
- 2- Treves A., Cohen I., Feldman M.: A syngeneic metastatic tumor model in mice: the natural immune response of host and its manipulation. Isr. J. Med. Sci. 12: 369 (1976)
- 3- Chang R., Turk J.: Increased resistance in splenectomized mice to methylcholantrene induced tumor. Br. J. Cancer 35: 768 (1977).
- 4- Hollander N., Isakov N., Segal S., Feldman M.: An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor-bearing animals. II Characterization of the cell populations involved in its production and release. Int. J. Cancer 22: 471 (1978).
- 5- Jasniz M., Klein S., Bonaparte Y., Oisgold Dagá S.: Delayed hypersensitivity in tumor-bearing mice: in vitro activation of eclipsed spleen cell. Int. J. Cancer 20: 294 (1977).
- 6- Jasniz M., Eiján A., Oisgold Dagá S.: Regulation of tumor growth by soluble spleen factors: Effect of tumor resection. J. Surg. Oncol. 35: 139 (1987).
- 7- Pliskin M., Ginsberg S., Carp N.: Induction of neovascularization by mytoçen-activated spleen cells and their supernatants. Transplantation 29 255 (1980).

- 8- Nishioka K., Katayama I.: Angiogenic activity in culture supernatants of antigen-stimulated lymph node cells . J. Pathol. 126 ; 63 (1978).
- 9- Cohen M., Picciano P., Douglas W., Yoshida T., Krentzer D., Cohen S.: Migration inhibition of endothelial cells by lymphokine containing supernatants. Science 215: 301 (1982).
- 10- Watt S., Auerbach R.: A mitogenic factor for endothelial cells obtained from mouse secondary mixed leukocyte cultures. J. Immunol. 136(1): 197 (1986).
- 11- Luty G., Lin S., Prendergast R.: Angiogenic lymphokines of activated T cell origin . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24: 1595 (1983).
- 12- Ting C., Rodriguez D.: Tumor cells-triggered macrophages mediated suppression of the T-cell cytotoxic response to associated antigens. I. Characterization of the cell components for induction of suppression . J. Natl. Cancer Inst. 69 867 (1982).
- 13- Buessow S., Paul R., Lopez D.: Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice . J. Natl. Cancer Inst. 73: 249 (1984).
- 14- Eijan A., Jasnis M., Kohan S., Oisgold-Dagá S.: Nature of spleen cell population capable of releasing tumor enhancing factor . J. Surg. Oncol. 36: 161 (1987).
- 15- Kontiainen S., James R., Culbert F., Feldman M.: Structure of antigen-specific suppressor factor: Current views Surv. Immunol. Res. 1: 17 (1982).

- 16- Sukramanian Ch., Yu S., Mc Khann C.: Soluble suppressor factor from the spleens from tumor-bearing mice . Cancer Res. 38: 1996 (1978).
- 17- Sidky Y., Auerbach R.: Lymphocyte-induced angiogenesis a quantitative and sensitive assay of the graft-vs-host reaction. J. Exp. Medicine 141: 1084 (1975).
- 18- Roehm N., Sidky Y., Auerbach R. Lyt phenotype analysis of the effector cells responsible for evoking lymphocyte induced angiogenesis (LIA) . Cel. Immunol. 63: 272 (1981)
- 19- Hadar E., Frshler W., Kreisle P., Shu-Peng Ho, Volk M., Klopp R.: Lymphocyte-induced angiogenesis factor is produced by L3T4+ murine T lymphocytes, and its production declines with age . Cancer Immunol. Immunother. 26:31 (1988).
- 20- Oisgold-Dagá S., Jasnís M.: Efecto de factores esplénicos sobre el crecimiento tumoral . Medicina 41(6): 673 (1981).
- 21- Davel L., Míguez M., Jasnís M., Eijan A., Oisgold-Dagá S., Sacerdote de Lustig E.: Angiogenic activity by spleen cell supernatants from tumor-bearing and tumor-resected mice . J. Surg. Oncol. 37: 44 (1988).
- 22- Hudson L., Hay F. En: Practical Immunology 2ºEd. Pag. 278 (1980) Editado por Blackwell Scientific Publications.
- 23- Julius H., Simpson E., Herzenberg L.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived lymphocytes. Europ. J. Immunol. 3: 645 (1973).

- 24- Davel L., Miguez M., Kohan S., Eijan A., Oisgold-Dagá S., Sacerdote de lustig E.: Angiogenic activity from tumor bearing mice: nature of the spleen cells population capable of inducing neovascular responses . J. Exp. Clin. Cancer Res. 7 111 (1988).
- 25- Rumjanek V., Watson S., Sljivic V.: A re-evaluation of the role of macrophages in carrageenan-induced immunosuppression . Immunol. 33: 423 (1977).

CAPITULO V. MODULADORES DE LA RESPUESTA ANGIOGENICA

INDICE	Pag
1. Inductores de actividad angiogénica.....	128
1.1. Factores de crecimiento.....	129
1.1.1. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).....	129
1.1.2. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)...	131
1.1.3. Factores de crecimiento transformantes...	131
1.1.3.1. TGF α	132
1.1.3.2. TGF β	133
1.1.4. Factor de crecimiento aislado desde pla- quetas (PDGF).....	134
1.1.5. Factores angiogénicos derivados de tumo- res.....	135
1.1.5.1. Factor angiogénico tumoral (TAF)	135
1.1.5.2. Angiogenina.....	136
1.1.5.3. Factor angiogénico humano (HAF).	137
1.1.6. Otros factores de crecimiento con activi- dad angiogénica.....	137
1.2. Productos de degradación del ácido hialurónico (HA).....	139
1.3. Heparina.....	140
1.4. Prostaglandinas (PGs).....	141
1.5. Cobre.....	141
1.6. Activador del plasminógeno.....	143
1.7. Fibrina.....	143
1.8. Fibronectina (F.N.).....	144
1.9. Factor de necrosis tumoral (TNF).....	145

1.10. Interleukina-1 (IL-1).....	146
2. Inhibidores de la angiogénesis.....	147
2.1. TGF- β ¿estimulador ó inhibidor de la angiogénesis?.....	148
2.2. Interferones (IFNs).....	149
2.3. Esteroides angiostáticos.....	149
3. Desarrollo experimental.....	153
3.1. Inhibición de la angiogénesis por indometacina..	153
3.2. Influencia de la suplementación de cobre en la dieta sobre la angiogénesis inducida por linfocitos.....	158
3.3. Acción del rHu-TNF α sobre la angiogénesis.....	163
3.4. Componentes de la matriz extracelular y SLIA....	167
4. Bibliografía.....	173

1. INDUCTORES DE ACTIVIDAD ANGIOGENICA

Los procesos angiogénicos se desarrollan 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 solo el alargamiento de los vasos sanguíneos sino también un complejo proceso de remodelación.

La proliferación vascular constituye un proceso necesario para el crecimiento normal de los tejidos. Sin embargo, en el adulto, la angiogénesis ocurre con escasa frecuencia y se la observa casi exclusivamente durante la reparación de heridas o en períodos relativamente breves, en los que está muy bien regulada. Por el contrario, la angiogénesis en condiciones patológicas, evade los mecanismos de control y lleva a la formación de una red vascular anormal. Ante un estímulo angiogénico, las células endoteliales migran y proliferan en forma activa y entre los factores que activan a las células endoteliales para inducir su proliferación se encuentran los factores de crecimiento (growth factor: GF).

Los GF son sustancias liberadas por diferentes tipos celulares y transportadas hasta las células target sobre las que van a actuar, por diversas rutas, desde la difusión local hasta la vía sistémica.

Si bien en un principio se pensó que la angiogénesis era el 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 múl

tiples factores, que actúan en diferentes niveles y desencadenan la proliferación de los vasos sanguíneos.

1.1. FACTORES DE CRECIMIENTO

1.1.1. FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (fibroblast growth factor: F.G.F.): es miembro de una familia de factores, extraídos del tejido neural, que tienen afinidad por la heparina y son mitogénicos para las células endoteliales (1).

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 (2-3).

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: factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) aislado

de hipotálamo, GF aislado de ojo tipo II, GF aislado de retina. GF aislado de astrogliá tipo I y GF aislado de médula (4).

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 (5).

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.

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 matriz extracelular. La liberación de FGFs asociados con el heparán sulfato, mediante tratamiento con heparinasas, indica que la actividad heparinasa hallada en ciertas células tumorales e inflamatorias podría estar involucrada en la angiogénesis.

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 (6-7).

1.1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (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 (8-9)

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 (9').

1.1.3. 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 (10).

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, dado que las mismas células tumorales que los producen poseen receptores para dichos factores (11).

1.1.3.1. 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 (12).

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 (13). 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.(14).

1.1.3.2. TGF-beta

Se lo aisló desde distintos tejidos: riñón, placenta, y células transformadas por virus. 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 (15-16).

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 exámen 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 (17).

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 (18).

1.1.4. FACTOR DE CRECIMIENTO AISLADO DESDE PLAQUETAS (PDGF)

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 un injuria tisular (19). El 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. 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.

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 (20). 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 de RNAm de cadena B del PDGF. La composición del substrato también puede influenciar la producción de PDGF, el colágeno tipo I disminuye la síntesis de este GF cuando se lo compara con substratos de fibronectina o plástico (21).

1.1.5. FACTORES ANGIOGENICOS DERIVADOS DE TUMORES

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 (21).

1.1.5.1. FACTOP ANGIOGENICO TUMORAL (tumor angiogenic factor:

TAF): En 1971 Fokman 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 (22).

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 (23, 24).

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" (25).

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 (26).

Este factor angiogénico de bajo PM fue aislado también desde fuentes no tumorales, tales como retina y fluido sinovial (27, 28); 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 procólagenasa presente en el medio condicionado de fibroblastos de piel, promoviendo la degradación de colágeno tipo I y en menor medida, del colágeno tipo III (29, 30).

1.1.5.2. 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 (31).

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 (32, 33, 34).

1.1.5.3. FACTOR ANGIOGENICO HUMANO (human angiogenic factor:

HAF): es un factor angiogénico que se diferencia de los factores antes descritos en que no tiene afinidad por la heparina, posee un PM mayor que la angiogenina y no es IL-1 (35). Por técnicas inmunohistológicas pudo localizarse en distintos tejidos tumorales y normales inflamatorio. Por lo tanto, se supone que es producido por una subpoblación de MØ inflamatorios.(36).

1.1.6. OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO CON ACTIVIDAD ANGIOGENICA.

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 glándula submaxilares y parotídeas normales contienen varios GF: NGF, 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 (37).

El transplante 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 (38).

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 β -mercaptoetanol, lo que la diferencia del FGF (39).

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' (40).

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 (41).

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 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 (42)

Desde la placenta y la membrana amniótica se aislaron factores mitogénicos con características similares al EGF y al FGF, además de otro GF activo 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 (43).

1.2. PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL ACIDO HIALURONICO

La matriz extracelular 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 matriz extracelular; es un glicosaminoglicano (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 cumple un papel 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 su 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 (44).

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

1.3. HEPARINA

La heparina es un glicosaminoglicano ácido cuyo PM varía entre 12.000 y 20.0000, compuesto por residuos de glu-

cosamina sulfatada y ácido urónico. "In vivo", se halla presente como glicoproteína en los gránulos basófilos de mastocitos y leucocitos desde los que se libera durante las reacciones inflamatorias (45).

La heparina estimula la locomoción de las células endoteliales in vitro e incrementa la angiogénesis tumoral in vivo (46, 47). En base a estos conocimientos se utilizó heparina para potenciar la respuesta neovascular inducida por distintos factores en MCA (48).

1.4. PROSTAGLANDINAS

Los niveles de prostaglandina son elevados en los tumores, en macrófagos activados, en exudados inflamatorios y en las heridas (49).

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 mg. Las PGs de otras series no son activas en la inducción de una respuesta vascular (50).

1.5. COBRE

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^{2+}) 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 (51).

El análisis de distintos factores angiogénicos, con espectrometría de absorción atómica demostró que las fracciones activas contienen Cu^{2+} ; 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^{2+} exógeno. Por otro lado, se demostró que la unión de Cu^{2+} a la molécula de heparina o al polipéptido glicil-L-histidil-L-lisina, hace que éstos adquieran capacidad angiogénica (52).

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 (53, 54). Cuando la córnea de conejo se trata con PGE u otro efector de la angiogénesis, se observa un incremento en los niveles de Cu^{2+} 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^{2+} , la PGE no tiene actividad angiogénica.

1.6. ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO (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 procolagenasa (inactiva) en colagenasa (activa). El PA está involucrado en varios procesos fisiológicos que incluyen ovulación, migración celular, diferenciación y regulación de la fibrinólisis (55).

Células endoteliales de origen bovino, secretan PA, y esta liberación de PA se incrementa cuando las células endoteliales responden a un estímulo angiogénico. Por lo tanto, la secreción de PA está involucrada en la actividad angiogénica (56)

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 inlujo 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

las neoplásicas poseen tanto actividad procoagulante como fibrinolítica y hay evidencia de que estas propiedades son importante 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 (57-59).

1.8. FIBRONECTINA

La fibronectina es una glicoproteína de alto PM (200 kDa) presente en el plasma y en la MFC. 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 (60, 61).

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^{2+} y el aumento en el contenido en gangliósidos estarían relacionados con el incremento en la

movilidad del endotelio (62).

1.9. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

La estimulación de leucocitos con mitógenos induce la secreción de proteínas inmunomoduladoras, IL-2, IFN y otros 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".

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 (64).

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 acción

tivación 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 1, promueve la actividad procoagulante y, la síntesis de IL-1 y aumenta la adhesión a leucocitos polimorfonucleares (65, 66).

1.10. IL-1

Es una citokina pleiotrópica producida por muchos tipos de células de los cuales los más importantes son los fagocitos monoculares (67). Se han analizado intensamente los efectos de la IL-1 sobre el endotelio vascular y se ha verificado una acción inflamatoria y protrombótica en las células endoteliales que responden al estímulo de este mediador (68). La IL-1 altera las propiedades funcionales de las células vasculares, incluyendo el metabolismo del ácido araquidónico, las propiedades trombogénicas, el reclutamiento de leucocitos y la producción de citokinas. Es interesante destacar que el FGF ácido, aislado de cerebro y que es mitogénico para células endoteliales, posee una secuencia homóloga con la IL-1 (69). Sin embargo, la IL-1 posee una

secuencia de aminoácidos completamente diferente al TNF y comparte muchas de sus actividades biológicas, como por ejemplo la de inducir las mismas proteínas sobre la superficie de las células endoteliales (70).

2. INHIBIDORES DE LA ANGIOGENESIS

La angiogénesis o neovascularización es un complejo proceso fisiológico que involucra la migración, proliferación y diferenciación de las células endoteliales. Además la neovascularización es un evento estrechamente controlado fisiológicamente y poco se conoce sobre los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la angiogénesis. Por lo tanto, factores solubles que estimulan o inhiben eventos individuales necesarios para el proceso de angiogénesis, tales como la migración o proliferación de células endoteliales, pueden ser mediadores en dichos mecanismos regulatorios.

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).

¿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 salteados o inhibidos cuando se requiera la formación de vasos sanguíneos, como por ejemplo durante la regeneración tisular.

La mayoría de los inhibidores de la neovascularización se han extraído de tejidos avasculares, por ej: cartílago (71), humor vítreo (72) y cristalino (73). Desafortunadamente el estudio de estos inhibidores se limitó por el hecho que solo muy pequeñas cantidades de material biológico puede extraerse de dichas fuentes (74).

El sulfato de protamina, factor difusible obtenido de cartílago es otro inhibidor de la angiogénesis pero tiene el inconveniente de ser tóxico en tratamientos sistémicos prolongados y por ello no puede ser usado como agente antitumoral (75).

La medroxiprogesterona posee actividad inhibitoria de la vascularización y crecimiento tumoral debido a su capacidad anticologénica (76). Sin embargo en los tumores murinos estudiados en nuestro laboratorio no se observaron efectos de la medroxiprogesterona sobre la vascularización aunque sí hubo una disminución significativa en el nº de metástasis de los ratones portadores de tumor (77).

2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE TIPO BETA (TGF β) ¿ESTIMULADOR O INHIBIDOR DE LA ANGIOGENESIS?

En un principio, se lo caracterizó como una proteína con capacidad mitogénica y fuerte inductor de la angiogénesis in vivo (78). Datos actuales indican que posee un e-

fecto inhibitorio del crecimiento celular (79). Además TGF- β inhibe la proliferación de células de endotelio de aorta bovina "in vitro", pero esta inhibición es reversible ya que después de la remoción del factor, las células comienzan a proliferar con la misma velocidad que los controles sin tratamiento (80). Como el TGF β es quimiotrópico para los monocitos y éstos una vez estimulados liberan mediadores inflamatorios (IL-1, PDGF, FGF, TNF), se sugiere que la actividad angiogénica del TGF- β in vivo estaría mediada en parte por la activación de los M ϕ (81).

2.2. INTERFERONES (IFNs)

Los IFNs son proteínas regulatorias que modifican una variedad de actividades biológicas.

Los IFNs, a diferencia de otros inhibidores de la angiogénesis, inhiben no sólo la respuesta de las células endoteliales, sino que suprimen la señal iniciada por las células tumorales y los linfocitos alogeneicos. Debido a ello, es posible que los IFNs puedan incrementar el efecto de otros inhibidores de la angiogénesis (83).

2.3. ESTEROIDES ANGIOSTATICOS

Recientemente se han descubierto una nueva clase de esteroides "angiostáticos" que circulan en el plasma y que podrían restringir el crecimiento de las células endoteliales (84).

La función de los esteroides angiostáticos fue descubierta al realizar estudios sobre el papel de la heparina en la angiogénesis. En el ensayo de la MCA, la respuesta angiogénica queda a veces enmascarada por una reacción inflamatoria. La aplicación de cortisona o hidrocortisona previene la reacción inflamatoria pero no interfiere 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 MCA (85).

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 do

ble 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 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 (86).

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 (87). 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 (88). 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; éstos están rodeados por una membrana basal más gruesa que contienen 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 (89).

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. (90).

Actualmente se están estudiando sustitutos sintéticos de la heparina para controlar la angiogénesis. Un oligosacárido cíclico (tetradecasulfato de β ciclodextrina) administrado junto con esteroides angiostáticos incrementa de 100-1000 veces el efecto antiangiogénico de la heparina en la MCA (91).

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. INHIBICION DE LA ANGIOGENESIS POR INDOMETACINA

Es un hecho conocido que las prostaglandinas (PGs), están relacionadas con la angiogénesis tumoral. El grupo de Gullino demostró que el fluido intersticial proveniente de un tumor es muy rico en PGs y que este tendría actividad angiogénica similar al TAF (92). Descubrió además, que antes que se produzca la angiogénesis se observa una acumulación de iones cobre y que la ceruloplasmina, proteína transportadora de cobre en el plasma, es angiogénica. Sin embargo cuando se tratan los animales con indometacina, potente inhibidor de la síntesis de PGs, no se induce angiogénesis. Concluye de estas observaciones que la angiogénesis es el resultado final de una cascada de eventos, dos de los cuales son la producción de PGs y la movilización de cobre en el tejido donde ocurre la neovascularización. Más adelante se comprobó que los inhibidores de la síntesis de PGs reducen el crecimiento tumoral al inhibir la vascularización (93).

Para determinar si las PGs también están involucradas en la angiogénesis inducida por linfocitos, probamos el efecto de la indometacina sobre la respuesta vascular inducida por linfocitos estimulados por el tumor MM3.

Como los linfocitos generalmente no producen PGs, al ser estimulados por el tumor liberarían linfokinas, las cuales activarían a los MØ para producir altos niveles de PGs y así inducir la proliferación vascular.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, machos o hembras de 3 a 6 meses de edad, de la cepa BALB/c y 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 6.2. (Cap. III)

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 / 0.1 ml) en los ratones receptores.

Tratamiento de los animales receptores con indometacina.

Stocks de Indometacina (Merck, Sharp y Dhone) 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 ($20 \mu\text{g/ml}$) y se cambió 3 veces por semana el líquido de bebida, tomando los ratones entre 4-6 ml por día (80 a $120 \mu\text{g}$ 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. (Fig. 1).

Cuantificación de la vascularización

La densidad de vasos se cuantificó en la forma habitual.

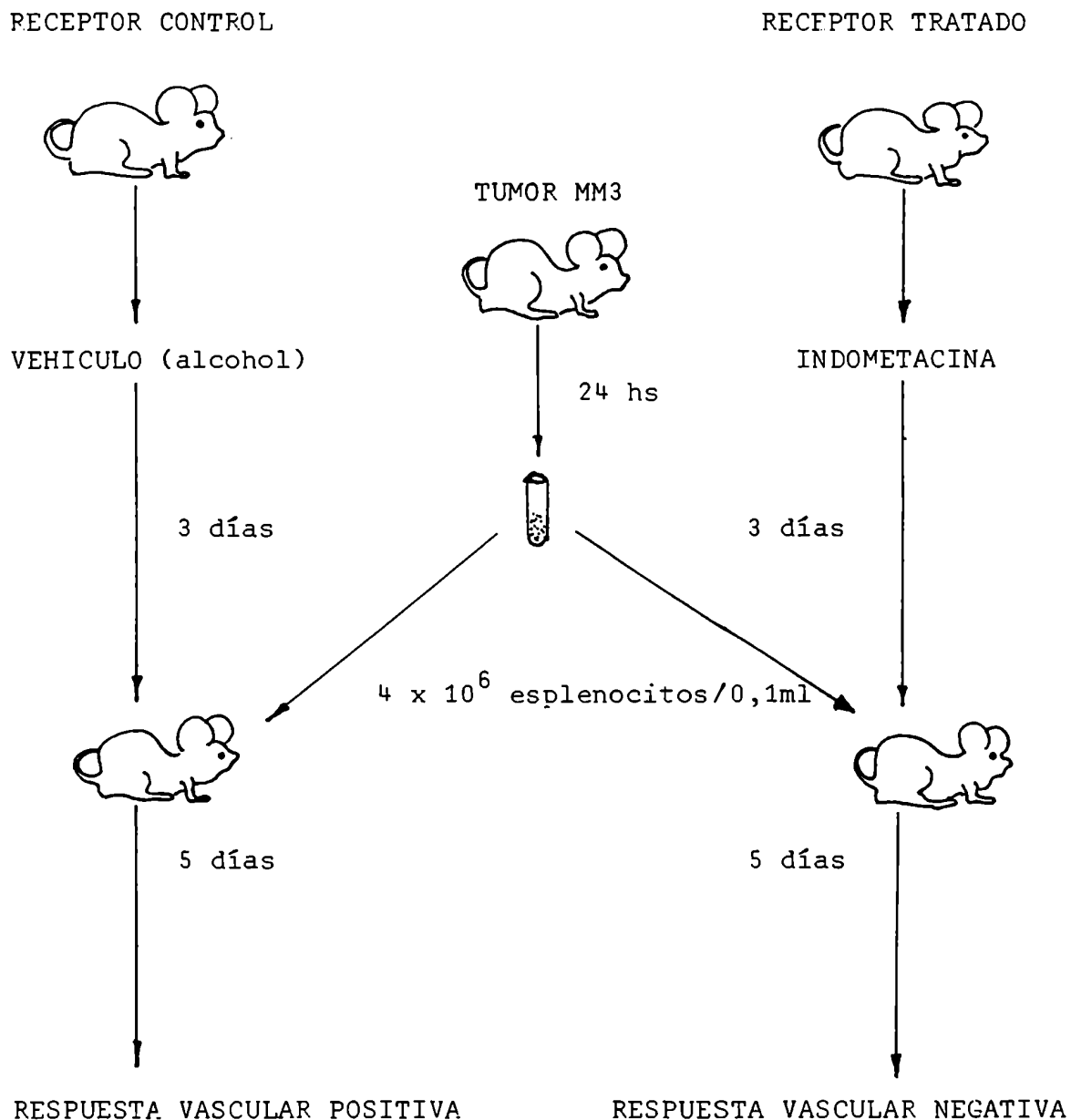
FIGURA 1: ESQUEMA DE SLIA PARA EL TRATAMIENTO CON INDOMETACINA

TABLA V.1. Efecto del tratamiento de los ratones receptores con indometacina sobre la respuesta vascular.

Origen de las células esplénicas	Tratamiento de los ratones receptores	Densidad de vasos $\bar{X} \pm E.S.$	Número de sitios inoculados
Ratones inoculados con:			
Células tumorales	vehículo	3.53 \pm 0.13	11
Células tumorales	indometacina	1.81 \pm 0.08	15
Células normales	vehículo	1.58 \pm 0.09	9

Como se observa desde los resultados expresados en la Tabla V.1, 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 (9%).

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.

3.2. INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACION CON COBRE EN LA DIETA SOBRE LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR LINFOCITOS

La neovascularización ha sido atribuída a factores solubles liberados por el tumor, así como por un aumento de la concentración de iones cobre y PGE (49,50). Además se sabe que las sales de cobre modulan la producción de PGE y que tienen influencia sobre la inmunidad humoral y celular (95, 96).

Por ello nos interesó determinar el efecto de las sales de cobre sobre la respuesta neovascular inducida por linfocitos de portador de tumor.

Materiales y Métodos

Animales

Ratones endocriados, de la cepa BALB/c de 3 a 6 meses de edad.

Tumor

Para este estudio se emplearon tumores S13 y M3 que se inocularon s.c. mediante un trocar en ratones normales BALB/c.

SUSPENSION DE CELULAS ESPLÉNICAS. ENSAYO DE SLIA.
CUANTIFICACION DE LA VASCULARIZACION.

Se realizaron siguiendo la metodología ya descripta.

SUPLEMENTACION CON COBRE EN LA DIETA

Se realizó en el agua de bebida usando 1.000 ppm de Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada. Los ratones control solo bebieron agua bidestilada.

Los ratones donantes de células esplénicas se dividieron en 4 grupos: 1) portadores de tumor con dieta normal de Cu^{2+} (NCu).

2) portadores de tumor con dieta suplementada de Cu^{2+} (+Cu).

3) normales con dieta normal de Cu^{2+} (NCu).

4) normales con dieta suplementada de Cu^{2+} (+Cu).

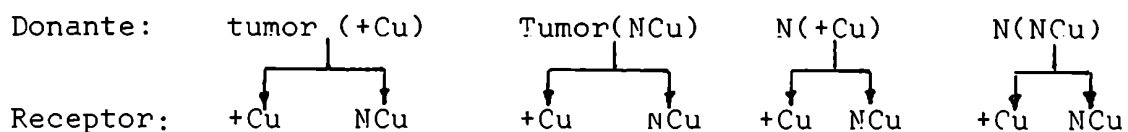
Los ratones portadores de tumor bebieron agua con Cu^{2+} durante 4 semanas antes del trasplante tumoral y continuaron hasta el día del sacrificio (total 60 días).

Las células de bazo de cada grupo anterior se inyectaron i.d. en 2 grupos de ratones recipientes .

a) ratones que recibieron dieta normal de Cu^{2+} 4 semanas previas al ensayo de SLIA (NCu).

b) ratones que recibieron dieta suplementada de Cu^{2+} 4 semanas previas al ensayo de SLIA (+Cu) (Fig. 2).

FIGURA 2: ESQUEMA DEL ENSAYO DE SLIA



1ºExperiencia: tumor M3

Resultados

TABLA V.2 EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE Cu²⁺ EN LA DIETA SOBRE EL ENSAYO DE SLIA.

Origen de células de bazo	Dieta		Densidad de vasos $\bar{X} \pm E.S$	Nº de Sitios inoculados
	D	R		
1- ratón portador de M3	NCu	NCu	2.85 \pm 0.19**	5
2- "	NCu	+Cu	2.29 \pm 0.07**#	6
3- "	+Cu	NCu	1.53 \pm 0.13	6
4- "	+Cu	+Cu	1.50 \pm 0.13	6
5 Control	NCu	NCu	1.56 \pm 0.07	4
6- Control	NCu	+Cu	1.62 \pm 0.16	5
7- Control	+Cu	NCu	1.60 \pm 0.14	8
8- Control	+Cu	+Cu	1.61 \pm 0.08	8

D: dador de esplenocitos

R: receptor de esplenocitos

** $p < 0.01$ respecto a su control.

$p < 0.02$ del grupo 1 con respecto al grupo 2.

De los resultados de la Tabla se observa que la res puesta vascular es positiva solo en los grupos 1 y 2 en los cuales los ratones dadores de esplenocitos no recibieron die ta suplementada con Cu^{2+} . Es interesante destacar que el el grupo 2 donde el receptor recibió un di eta suplementada con Cu^{2+} la respuesta disminuyó significativamente.

La respuesta angiogénica se negativiza en los gru- pos 3 y 4 donde hubo suplementación de Cu^{2+} en los ratones da dores.

Evidentemente existe una clara influencia de la su- ple mentación de Cu^{2+} sobre la inhibición de la angiogénesis inducida por linfocitos (97).

2° Experiencia: Tumor S13.

En esta experiencia se hace más evidente la influen cia de la suplementación con cobre sobre el receptor de es- plenocitos.

La diferencia observada en el comportamiento de los portadores de los tumores M3 y S13 indica que mientras en el caso del portador de M3 el SLIA se inhibe totalmente cuando el dador pertenece al grupo suplementado con cobre, en el ca so del portador de S13, donde la respuesta angiogénica es mu cho mayor, el SLIA disminuye pero no llega a desaparecer.

TABLA V.3 EFEECTO DE LA SUPLEMENTACION CON Cu SOBRE LA ANGIOGENESIS

Origen de células de bazo	Dieta		Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ E.S.	N° sitios inoculados
	D	R		
1- ratón portador de S13	NCu	NCu	3.81 + 0.25***	12
2-	NCu	+Cu	3.07 + 0,40***	9
3- "	+Cu	NCu	2.35 + 0,14*	12
4-	+Cu	+Cu	2.08 + 0,08**	8
5- "	NCu	NCu	1.69 + 0.19	4
6-	NCu	+Cu	1.91 + 0,21	4
7-	+Cu	NCu	1.98 + 0.11	8
8- "	+Cu	+Cu	1.53 + 0.12	6

D: dador de esplenocitos

R: receptor de esplenocitos

*** $p < 0,001$

$p < 0,002$

* $p < 0,005$

Con respecto a sus respectivos controles.

Si se comparan en términos de porcentajes se encuentran resultados similares para el SLIA en ambos grupos, M3 y S13 en relación a la suplementación con cobre es decir disminuyen con el mismo patrón. (Fig. 3)

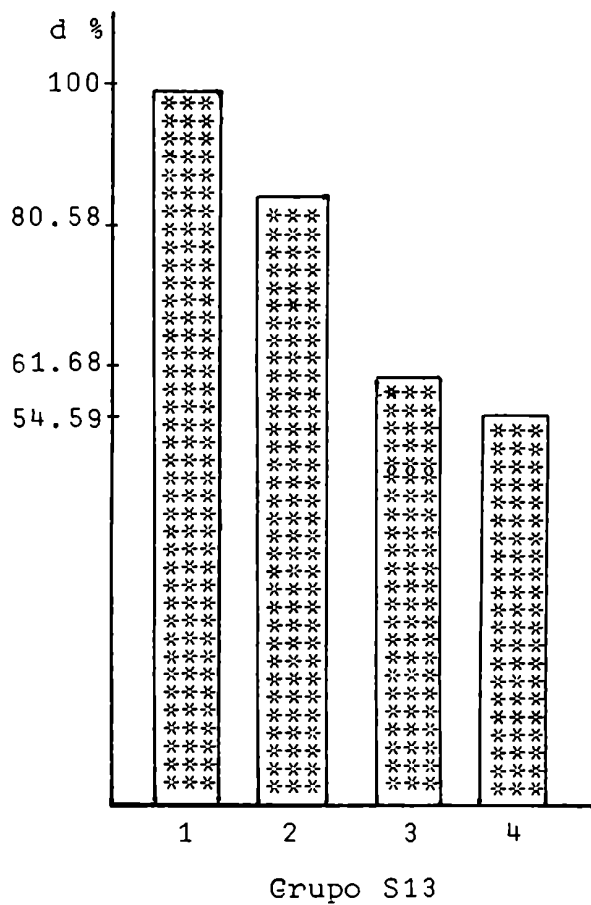
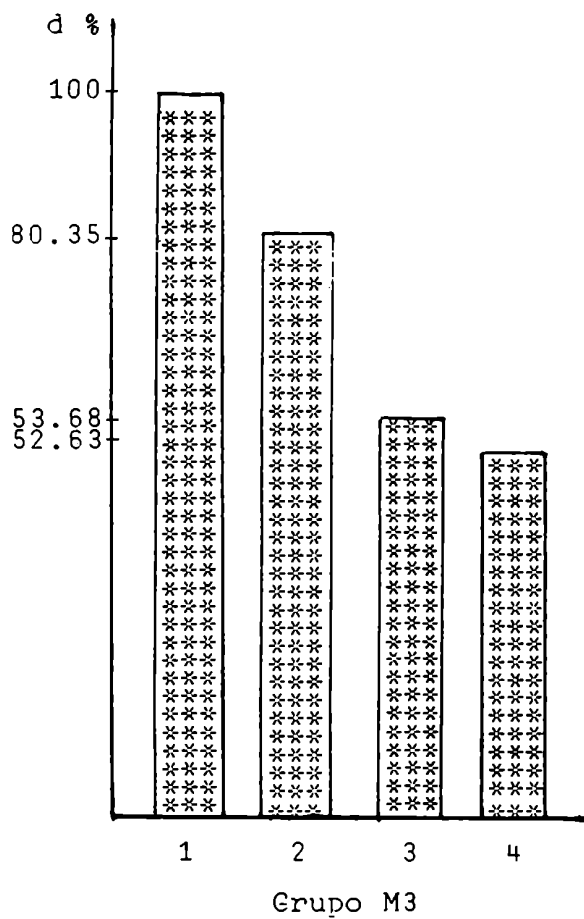
El 100% lo constituyen los grupos D (NCu)/R (NCu) de los ratones portadores de tumor correspondientes.

De todo esto surge que el Cu^{2+} modularía de algún modo la respuesta de los linfocitos en el dador y por otro lado influenciaría sobre la síntesis de PGs en el receptor ya que sabemos que la PGs están involucradas en el mecanismo de la respuesta angiogénica.

3.3. ACCION DEL rHu-TNF α SOBRE LA ANGIOGENESIS

Sabemos que el TNF presenta un comportamiento distinto sobre los vasos sanguíneos tumorales y normales. En el caso de animales con tumor se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral lesiona los vasos sanguíneos intratumorales. Sin embargo en los tejidos normales desempeña un papel fundamental en la angiogénesis. El grupo de Leibovich ha demostrado que el TNF induce el crecimiento de células endoteliales normales que se reúnen para formar nuevos vasos (66). Por otra parte el TNF de ratón como de conejo inhibe la proliferación de células endoteliales (65). Por ello nos resultó interesante estudiar su acción en la angiogénesis inducida por linfocitos.

Figura 3: VARIACION PORCENTUAL DE LA RESPUESTA NEOVASCULAR
CON EL TRATAMIENTO CON Cu^{2+} .



Materiales y Métodos

Animales

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

Tumor

Para este estudio se empleó el tumor S13 que se inculó por trócar en ratones normales BALB/c.

Cuantificación de la vascularización.

Se realizaron siguiendo la metodología ya descripta.

Factor de necrosis tumoral α , recombinante humano (rHu-TNF α).

El rHu-TNF α fue provisto por Genetech Inc. California (actividad específica 5×10^7 U/mg). Los ratones receptores de esplenocitos recibieron el mismo día de la inyección i.d. 1) 0,1 ml de PBS i.p.

2) 0,1 ml de rHu-TNF α (10.000 U) i.p.

3) 0,1 ml de rHu-TNF α (10.000 U) i.p., 48 horas después se repitió la misma dosis.

Resultados

TABLA V.4 EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE TNF α SOBRE LA ANGIO-
GENESIS.

Grupo	Densidad de vasos $\bar{X} \pm$ E.S.	Nº de Sitios inoculados
1	3.38 \pm 0.16	7
2	1.67 \pm 0.12***	10
3	1.78 \pm 0.14***	6

*** p < 0.001

Como se observa en la Tabla V.4 los esplenocitos de ratones portadores de tumor inducen una fuerte respuesta vascular en los receptores que no recibieron tratamiento (grupo 1). Esta fuerte respuesta angiogénica fue totalmente inhibida cuando los ratones receptores reciben 1 o 2 dosis de TNF α (grupo 2 y 3).

Por lo tanto, de estos resultados concluimos que el rHu-TNF α intervendría bloqueando la neovascularización inducida por los linfocitos de ratones portadores de tumor (98) Además en experiencias en marcha, observamos que el TNF induce una fuerte respuesta angiopénica cuando se inyecta i.d. pero cuando los linfocitos se incuban con TNF (previamente lavados) y se inoculan i.d. no se puede detectar respuesta

neovascular. Esto indicaría que la inhibición de SLIA podría deberse a un efecto directo del TNF α sobre los linfocitos T activados.

3.4. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SLIA

Las células adherentes depositan en cultivo una matriz extracelular (ME) que está formada por proteínas de distinto tipo: colágenos, laminina y fibronectina y glicosaminoglicanos. La composición de la ME depende del tipo de células y del grado de diferenciación (94). Las células tumorales degradan membranas basales para invadir los tejidos y de esta manera se produce liberación de fibronectina (FN) y fragmentos de esta glicoproteína adhesiva. Estos fragmentos de FN serían potenciales marcadores tumorales con actividad transformante aunque los estudios que han tratado de correlacionar la pérdida de FN de la matriz pericelular con la tumorigenicidad y metástasis, no siempre han dado resultados satisfactorios (100).

Por otra parte, contraponiéndose a su función de proteína de anclaje, la FN tiene una fuerte actividad quimiotáctica sobre células endoteliales (61).

En este trabajo, estudiamos los efectos de la FN y algunos de sus fragmentos sobre la angiogénesis.

Materiales y Métodos

Ratones endocriados, de la cepa BALB/c de 3 a 6 meses de edad, machos pertenecientes al Bioterio del Instituto "A.H. Poffo".

Tumor

Para este estudio se empleó tumor S13 inoçulado s.c. por trócar en ratones BALB/c.

Pretratamiento de esplenocitos normales y de portador de tumor.

A las 24 hs de portación de tumor, los ratones se sacrificaron y los bazos se extrajeron en forma estéril.

Se prepararon tanto suspensiones de esplenocitos normales como de portadores de tumor; 60×10^6 linfocitos fueron incubados durante 50' a 37°C con 1 ml de medio que contenía:

- 1) FN humana grado analítico (SEPVA).
- 2) Fragmento de FN; tetrapéptido (GRGD) (Gly-Arg-Gly-Asp) (SIGMA).
- 3) Fragmento de FN: pentapéptido GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) (SIGMA).
- 4) Colágeno tipo IV (SIGMA).
- 5) Medio de cultivo.

Las proteínas se ensayaron a 50-150 μ g/ml .

Luego de la incubación, se centrifuga y lava con medio. Finalmente se lleva a una concentración de 40×10^6 cel/ml para realizar el ensayo de SLIA.

Ensayo de SLIA. Cuantificación de la vascularización

Se realizó con la metodología ya descrita.

Resultados

TABLA V.5. ENSAYO DE SLIA CON LINFOCITOS NORMALES TRATADOS CON COMPONENTES DE LA ME.

Tratamiento de esplenocitos normales	Densidad de vasos $\bar{X} \pm E.S.$	Nº de sitios inoculados
1) FN	$1.54 \pm 0,40^a$	8
	$1,50 \pm 0,20^b$	7
2) Tetrapéptido	$1.62 \pm 0,06^a$	8
	$1,55 \pm 0,10^b$	8
3) Pentapéptido	$1,69 \pm 0,10^a$	8
	$1,70 \pm 0,20^b$	8
4) Colágeno	$1,70 \pm 0,30^a$	9
	$1,59 \pm 0,07^b$	6
5) Medio de Cultivo	$1,64 \pm 0,09^a$	8
	$1,69 \pm 0,08^b$	8

a: 50 $\mu\text{g/ml}$

b: 150 $\mu\text{g/ml}$.

En la Tabla V.5. observamos que el tratamiento in vitro de esplenocitos normales con FN, fragmentos de FN y colágeno no modifican la angiogénesis normal, ya que los valores de densidad de vasos no difieren del grupo control. Por lo tanto en el ensayo de SLIA, estos péptidos no son inductores de angiogénesis.

TABLA V.6 ENSAYO DE SLIA CON LINFOCITOS DE PORTADOR DE TUMOR TRATADOS CON COMPONENTES DE LA ME

Tratamiento de esplenocitos de portador de tumor ^a	Densidad de vasos X + E.S.	Nº de sitios inoculados
1) FN	1,49 ± 0,09***	5
2) Tetra	1,59 ± 0,11***	5
3) Penta	2,87 ± 0,17	6
4) Colágeno	2,40 ± 0,21	4
5) Medio de Cultivo	2,82 ± 0,12	6

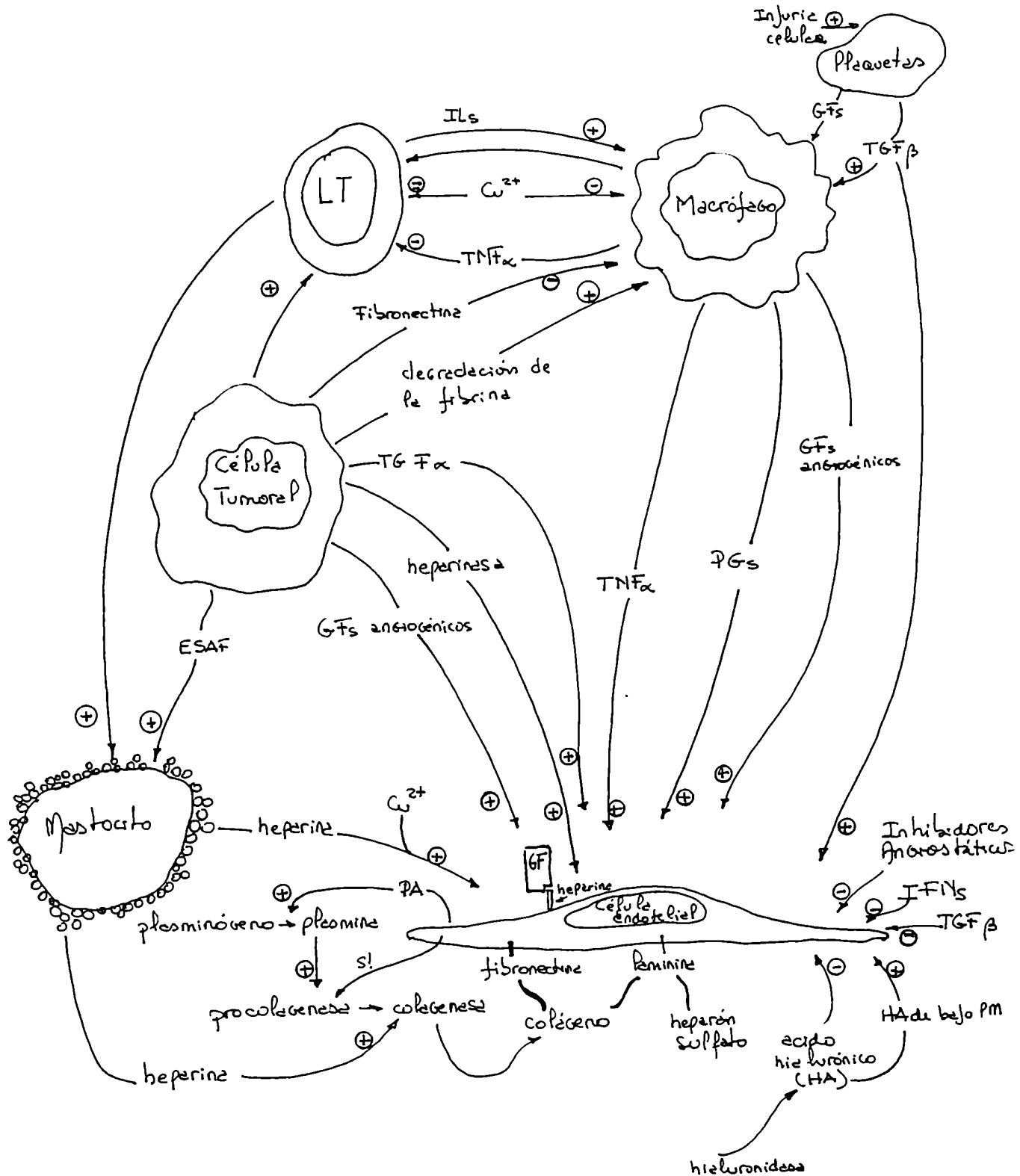
a: 50 µg/ml

*** p < 0,001 con respecto al control (grupo 5).

Los resultados de la Tabla V.6 muestran que la FN y el tetrapéptido utilizado inhiben la angiogénesis media da por linfocitos (101). Esto en parte estaría de acuerdo

con otros trabajos en los cuales tanto la FN como fragmentos derivados de ella actuarían inhibiendo las metástasis experimentales (102). Nosotros demostramos anteriormente una correlación directa entre angiogénesis y capacidad metastásica (103) y sabemos que el proceso metastásico necesita del fenómeno de angiogénesis para permitir la salida de células hacia lugares distantes. Por ello puede ser que esta inhibición de la respuesta vascular sea uno de los mecanismos por los cuales se inhiben las metástasis. Porqué el pentapéptido no posee el mismo efecto es un punto a dilucidar, pero posiblemente adopte una configuración diferente que le impide bloquear la respuesta.

MODELO PROPUESTO PARA EXPLICAR LAS INTERACCIONES ENTRE
LOS MODULADORES DE LA RESPUESTA ANGIOGENICA.



4. BIBLIOGRAFIA

1. 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).
2. Thomas K., Gimenez Gallego G.: Fibroblast growth factor; broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends Biochem. Sci.* 11: 81 (1986).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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: 23330,(1985).

7. 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).
8. Taylor J., Mitchell W., Cohen S.: Epidermal growth factor: Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 247: 5928,(1972).
9. Rall L., Scott J., Bell G.: Mouse pre-proepidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313: 228,(1985).
- 9'. Weber W., Bill G., Spiess J.: Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science* 224: 294, (1984).
10. 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).
11. 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).
12. Lee D., Kochford R., Todaro G., Villareal L.: Developmental expression of rat transforming growth factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3644,(1985).
13. Marguardt H., Hunkapiller M., Hood L., Todaro G.: Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223: 1079 (1984).

14. Schreiber A., Winkler M., Derynck R.: Transforming growth factor alpha: A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232: 1250, (1986).
15. Sporn M., Roberts A.: Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer. *J. Clin. Invest.* 78: 329, (1986).
16. 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).
17. Fráter-Schoder M., Muller G., Binchmeir W., Bohlen P.: Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 295, (1986).
18. 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).
19. Childs C., Proper J., Tucker R., Moses H.: Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 5312 (1982).
20. 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).

21. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig F.: Actividad angiogénica y tumor. *Medicina* 41: 369, (1981).
22. Folkman I., Merlen F., Abernathy C., Williams G.: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133: 275, (1971).
23. Klagsburn M., Knighton D., Folkman J.: Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* 36: 110, (1976).
24. Phillips P., Kumar S.: Tumor angiogenesis factor (TAF) and its neutralization by a xenogeneic antiserum. *Int. J. Cancer* 23: 82, (1979).
25. Schor A., Kumar S., Philips P.: Quantitation of extracts containing tumor angiogenesis factor (TAF) by radioimmunometric and radioimmunoassay. *Int. J. Cancer* 25: 773, (1980).
26. 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).
27. Weiss I.: Studies on a low molecular weight angiogenic factor. *Br. J. Ophthalmol.* 66: 165, (1982).
28. Brown R., Weiss I., Tomkinson I., Philips P., Kumar S.: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors. *Lancet* 682, (1980).
29. Weiss I., Hill C., Davis R., Mc Laughlin B., Sedowofia K., Brown R.: Activation of a procollagenase by low-molecular weight angiogenesis factor. *Biosci. Resp.* 3: 171, (1983).

30. 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).
31. Fett J., Strydom D., Lobb R., Alderman E., Lemuel-Bethune J., Riordan J., Vallee B.: Isolation and characterization of angiogenin and angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry 24: 5480, (1985)
32. 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).
33. Strydom D., Riordan I., Lobb R.: Characteristic ribonucleotidic activity of angiogenin. Biochemistry 25: 3527, (1986).
34. Bond M., Vallee B.: Isolation of bovine angiogenin using a placental ribonuclease inhibitor binding assay. Biochemistry 27(17): 6281 (1988).
35. Schulze-Osthoff K., Frühbeis B., Oserwien B., Hilfer B., Sorg C.: Purification and characterization of a novel human angiogenic factor (HAF). Biochem. Biophys. Res. Comm. 146 (3): 945 (1987).
36. Frühbeis B., Zwadlo G., Bsöcker E., Osthoff K., Hagemeyer H., Toppoll H., Sorg C.: Immunolocalization of an angiogenic factor (HAF) in normal inflammatory and tumor tissues. Int. J. Cancer 42: 207 (1988).
37. Hoffman H., McAuslan B., Robertson D., Burnett E.: An endothelial growth stimulating factor from salivary glands. Exp. Cell Res. 102: 269, (1976).

38. Goldsmith H., Griffith A., Kupferman A., Castipoolas N.: Lipid angiogenic factor from omentum. *J. Am. Med. Assoc.* 252: 2034, (1984).
39. Mc Auslan B., Hannan G., Reilly W.: Characterization of an endothelial cell proliferation factor from cultured 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 128: 95, (1980).
40. 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).
41. 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).
42. Frederick J., Hoa N., Preston D., Frederick J., Campeau J., Ono T., Dizerga G.: Initiation of angiogenesis by porcine follicular fluid. *Am. J. Obsteth. Gynecol.* 152: 1073, (1985).
43. Burgos H.: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Invest.* 13: 289, (1983).
44. West D., Hampson I., Arnold F., Kumar S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyalouronic acid. *Science* 228: 1324, (1985).
45. Caser B.: Structure and biological activity of heparin. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 43: 51 (1985).

46. 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).
47. Taylor S., Folkman I.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297: 307, (1982).
48. Shing Y., Folkman I., Sullivan P., Butterfield C., Murray J., Klagsburn M.: Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223: 1296.
49. Ben Ezra D.: Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am. J. Ophthalmol.* 86: 455, (1978).
50. Form D., Auerbach R.: PGE₂ and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172: 214 (1983).
51. McAuslan B., Reilly W.: Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions. *Exp. Cell Res.* 130: 147 (1980).
52. 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).
53. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 43: 1790, (1983).
54. Raju K., Alessandri G., Ziche M., Gullino P.: Ceruloplasmin copper ions and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 1183, (1982).

55. Gross J., Moscatelli D., Jaffe E., Rifkin D.: Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95: 974, (1982).
56. Lang N., Tokes Z., Benedict N., Sorgente N: Anchorage independent growth and plasminogen activator production by bovine endothelial cells". *J. Cell. Biol.* 84: 281 (1980).
57. Kadish I., Butterfield K., Fokman I.: The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tiss. Cell.* 11: 99 (1979).
58. 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)
59. Thompson W., Campbell R., Evans T.: Fibrin degradation and angiogenesis: Quantitative analysis of the angiogenic response in the CAM. *J. Pathol.* 145: 27 (1985).
60. Postlethwaite A., Keski-Oja I., Balian G., Kang A.: Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. *J. Exp. Med.* 153: 494,(1981)
- 61- Bowerson J., Sorgente N.: Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin. *Cancer Res.* 42: 2547, (1982).
62. Alessandri G., Raju K., Gullino P.: Interaction of gangliosides with fibronectin in the mobilization of capillary endothelium. *Inv. Met.* 6: 145, (1986).

63. Stolpen A., Guinan F., 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).
64. Sugarman B., Aggarwal B., HasP., 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).
65. 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).
66. 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).
67. Oppenheim J. Kovacs F., Matsushima K., Darum S. There is more than one interleukin- 1. *Immunol. Today* 7: 45 (1986).
68. Mantovani A., Dejana E.: Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol. Today* 10(11): 370 (1989).
69. Shing Y., Folkman J., Haudenschild C., Lund D., Crum. R., Klagsbrun M.: Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J. Cell Biochem.* 29:275 (1985).

78. Roberts A., Sporn M., Assoian P., Smith J., Roche N., Wakefield L., Heine U., Liotta L., Falanga V., Kehrl J., Fanci A.: Transforming growth factor beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4167 (1986).
79. Shipley G., Tucker R., Moses H.: Type B-transforming growth factor/growth inhibitor stimulated entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 4147 (1985).
80. Baird A., Burban T.: Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta transforming growth factor. Interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. Biochem Biophys. Res. Commun. 138: 476 (1986).
81. Whal S., Mc Cartney-Francis N., Mergenhagen S.: Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- β . Immunol. Today 10 (8): 258 (1989).
82. Hochkeppel H.: Recent developments in interferon research. Experientia 45: 500 (1989).
83. Sidky Y., Borden F.: Inhibition of angiogenesis by interferons: Effects on tumor and lymphocyte-induced vascular responses. Cancer Res. 47: 5155 (1987).
84. Crum R., Szato S., Folkman J.: A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. Science 230: 1375 (1985).

70. Potber J., Bevilacqua M., Mendrick D., Lapierre A. Fers W., Gimbrone M.: Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 136: 1680 (1986).
- 71- Brem H., Folkman J.: Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141: 427 (1975)
72. Litty G., Thompson D., Gallup J. Vitreous: An inhibitor of retinal-extract induced neovascularization. *Invest. Ophthalmol* 24: 52 (1983).
73. Williams G., Eisenstein R., Schuwacher B. : Inhibitor of vascular endothelial cell growth in the lens. *Am. J. Ophthalmol.* 97: 366 (1984).
74. Lee A., Langer P. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis.: *Science* 221: 1185 (1983).
75. Taylor S., Folkman J.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature (lond)* 297: 307 (1982).
76. Gross J., Azizkhan R., Biswas C., Bruns R., Hsieh D., Folkman J.: Inhibition of tumor growth, vascularization and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc. Natl. Acad. Sci* 78(2): 1176 (1981).
77. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E.: Efecto del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre un adenocarcinoma mamario murino. *Medicina* 42(6/2): 813 (1982).

85. 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).
86. 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).
87. Kalebic T., Garbisa S., Glaser B., Liotta L.: Basement membrane collagen: Degradation by migrating endothelial cells. *Science* 221: 281, (1983).
88. Madri I., Stenn K.: Aortic endothelial cell migration I. Matrix requirements and composition. *Am. J. Pathol.* 106: 180 (1982).
89. Hayman E., Pierschenbacher M., Ruoslathi E.: Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J. Cell Biol.* 100: 1948, 1985.
90. Skamoto N., Manoka M.: Effect of angiostatic steroid with or without glucocorticoid activity on metastasis. *Invasion Metastasis* 7: 208 (1987).
91. Folkman J. Weizz P., Joullie M., Li W., Fwing W.: Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243: 1490 (1989).
92. Ziche M., Jones J., Gullino P.: Role of PGE₂ and copper in angiogenesis. *J. Natl. Cancer Int.* 69(2):475 (1982).

92. Peterson H.I.: Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. *Invasion Metastasis* 3: 151 (1983).
94. Davel L., Miguez M., Sacerdote de Lustig E.: Evidence that indomethacin inhibits the lymphocyte-induced angiogenesis. *Transplantation* 39: 564 (1985).
95. Dollwet H., Schmidt A., Seeman R.: Antiinflammatory activity of implanted copper. In: Sorenson J. (eds) *Inflammatory Diseases and copper*. Humana Press. Clifton, New Jersey, p. 347 (1982).
96. Prohaska J., Lukasewycz O.: Copper deficiency suppresses the immune response of mice. *Science* 213: 559 (1981).
97. Fuchs A., Davel L., Miguez M., Carcagno A., Sacerdote de Lustig E.: Influencia de la suplementación de cobre en la dieta sobre la angiogénesis inducida por linfocitos. *Medicina* 48(6): 652 (1988).
98. Davel L., Schiavi G., Sacerdote de Lustig E. "Acción del rHu-TNF α sobre la angiogenesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA). *Medicina* 49(5): 475 (1989).
99. Alitalo K., Vaheri A.: Pericellular matrix in malignant transformation. *Adv. Cancer Res.* 37: 111 (1982).
100. Neri A., Rouslahti E., Nicolson G.: Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at primary and metastatic sites. *Cancer Res.* 41: 5082 (1981).

101. Eijan A., Davel L., Oisgold-Dagá S., Sacerdote de Lustig E.: Componentes de la matriz extracelular (ME) y angiogenesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA). *Medicina* 49(5): 427 (1989).
102. Mc Carthy J., Skubitz A., Palm S.: Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin. *J. Natl. Cancer Inst.* 80(2): 108 (1988).
103. Miguez M., Davel L., Sacerdote de Lustig E.: Lymphocyte induced angiogenesis. Correlation with the metastatic incidence of two murine mammary adenocarcinomas. *Invasion Metastasis*. 6:313 (1986).

CAPITULO VI DISCUSION Y CONCLUSIONES

INDICE	Pag.
1. Proceso angiogénico.....	188
2. Aportes del presente trabajo de Tesis al estudio de la angiogénesis.....	189
2.1. Angiogénesis tumoral.....	189
2.2. Angiogénesis linfocitaria.....	190
2.3. Actividad angiogénica de factores esplénicos Poblaciones celulares.....	193
2.4. Moduladores de la respuesta angiogénica.....	194

1. PROCESO ANGIOGENICO

La proliferación vascular constituye un proceso necesario para el crecimiento normal de los tejidos. En el adulto, la angiogénesis ocurre durante períodos relativamente breves y muy bien regulados. Por el contrario, la angiogénesis en condiciones patológicas evade los mecanismos de control hasta formar una red vascular anormal que frecuentemente agrava la evolución del cuadro clínico.

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.

El crecimiento de un tumor depende de una adecuada vascularización ya que la misma no solo facilita su desarrollo, sino que además acelera la diseminación celular. Dicha neovascularización ha sido atribuída en realidad, a factores solubles liberados por el tumor.

Por otra parte, 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 poseen actividad angiogénica.

Si bien en un principio se pensó que la angiogénesis resulta 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. La neovascularización

se activa por estímulos diversos, como los cambios metabólicos producidos en la diabetes, los productos de reacciones inflamatorias, la baja concentración de oxígeno, la disminución del pH en la cicatrización de heridas y en general los distintos factores angiogénicos liberados tanto desde tejidos normales como desde células tumorales.

Los estudios realizados en esta Tesis apuntaron a dilucidar en parte los mecanismos implicados en la angiogénesis y a analizar la modulación de la respuesta vascular por medio de modificadores biológicos. Como el proceso de neovascularización es uno de los tantos eventos que intervienen en la cascada metastásica, conocer a fondo este proceso, e interferir en él, es una de las búsquedas necesarias para poder inhibir el desarrollo tumoral.

2. APORTES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS AL ESTUDIO DE LA ANGIOGENESIS

2.1. ANGIOGENESIS TUMORAL

Demostramos que dos adenocarcinomas mamarios murinos (M3 y MM3) y las metástasis pulmonares respectivas, son fuertes inductores de angiogénesis mediante una técnica de evaluación sencilla in vivo. Aunque la técnica utilizada, ensayo de actividad angiogénica en MCA, 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 angio

génica 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. Pudimos demostrar que la fracción citoplasmática correspondiente a un PM aproximado de 90 kDa es la única capaz de inducir angiogénesis en MCA.

2.2. ANGIOGENESIS LINFOCITARIA

Fue muy interesante comprobar que los linfocitos es tán involucrados en el desarrollo vascular de los tumores. Para ello, establecimos un nuevo modelo de evaluación de la respuesta vascular.

Sabíamos que sólo los linfocitos alo o semialogénicos producen actividad angiogénica cuando se inoculan i.d. en la piel de un ratón y que esta respuesta es mayor, cuanto mayor es la diferencia en el CMH (H-2). Supusimos que los linfocitos de un portador de tumor debían estar activados para la respuesta vascular y para comprobarlo los inyectamos en ratones singeneicos. Estos últimos no pueden activar a los linfocitos dadores de la misma cepa, ya que no existen diferencias en el H-2. Los resultados de estos estudios, demostraron que los linfocitos singeneicos al ser estimulados por el tumor, producen un fuerte respuesta vascular en ratones normales.

Establecimos, así, un nuevo modelo de evaluación cuantitativa de la angiogénesis, que denominamos syngeneic lymphocyte-induced angiogénesis (SLIA).

Posteriormente, realizamos la reacción de SLIA en distintos tiempos de portación de tumor: desde las 24 hs de realizado el trasplante hasta los 30 días de portación, con el fin de estudiar si existían variaciones en la respuesta vascular. Como la respuesta angiogénica se mantuvo constante a lo largo del crecimiento del tumor los estudios posteriores se efectuaron a las 24-48 hs de portación.

El modelo experimental obtenido por el Dr. Colombo, en el Instituto de Oncología "A.H.Roffo" resultó muy útil para estudiar los distintos mecanismos relacionados con la aparición y desarrollo de las metástasis. Nos pareció 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.

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 promueven 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 un tumor altamente metastásico con el tumor de origen, de baja capacidad metastásica.

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.

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 en 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.

2.3. ACTIVIDAD ANGIOGENICA DE FACTORES ESPLÉNICOS. POBLACIONES CELULARES.

Nuestros resultados indican que los linfocitos estimulados por el tumor liberan factores solubles con actividad angiogénica. Por otro lado observamos una fuerte correlación entre actividad angiogénica y la exacerbación del crecimiento tumoral del medio condicionado de esplenocitos de portadores y ex-portadores de tumor.

Para determinar cual es la población esplénica que se activa en presencia del tumor deplecionamos de células T con un Ac. anti-Thy 1.2 o enriquecimos en células T por fraccionamiento a través de columna de nylon. Corroboramos que la población T es la responsable del SLIA utilizando ratones atómicos portadores de tumor.

La depleción de MØ con carrageenan, inhibe completamente el desarrollo de una respuesta angiogénica en los animales receptores de los LT. Esto indica que los MØ actúan como mediadores del mecanismo de angiogénesis posiblemente al activarse con los factores solubles liberados desde los linfocitos.

2.4. MODULADORES DE LA RESPUESTA ANGIOGENICA

Una vez que determinamos que los MØ constituían una de las células mediadoras de la angiogénesis nos interesó saber si las PGs, producidas por los mismos, están involucradas en la respuesta vascular. Probamos, entonces, el efecto de un conocido inhibidor de la síntesis de PGs en los ratones receptores de linfocitos estimulados por tumor y observamos el bloqueo de la respuesta vascular. Debido a ello, concluimos que los MØ activados liberan PGs las cuales inducen la proliferación de las células endoteliales y la aparición de la angiogénesis.

Como los iones Cu^{2+} estimulan la migración de las células endoteliales, modulan la producción de PGE y actúan sobre la respuesta inmune, estudiamos el efecto de una dieta suplementada con Cu^{2+} en el SLIA. De nuestros resultados surge que el Cu^{2+} modula de algún modo la respuesta de los linfocitos ya que la angiogénesis se inhibió.

Otro intermediario liberado por los MØ, el TNF actúa como mediador pleiotrópico con interesantes efectos sobre la citotoxicidad tumoral, la angiogénesis y las reacciones inmunológicas. Este factor cuando se inyecta directamente en la piel posee actividad angiogénica "in vivo" y un efecto antimitogénico sobre la proliferación de células endoteliales "in vitro".

Contrariamente a los efectos descriptos in vivo nosotros demostramos que el $\text{TNF}\alpha$ bloquea totalmente la respuesta angiogénica seguramente a través de una acción directa sobre los LT activados. Esta conclusión se debe a que la inhibición de la neovascularización se produjo tanto cuando el

tratamiento se realizó sobre los ratones receptores como cuando se hizo sobre los linfocitos inoculados.

La fibronectina es una de las moléculas de adhesión mejor caracterizada con respecto al comportamiento del endotelio frente a un estímulo angiogénico.

La característica de la FN de ser una proteína multifuncional deriva de sus diversos dominios que le permiten tener múltiples interacciones y de su susceptibilidad a proteasas que la reducen a péptidos activos con un efecto regulatorio sobre la FN intacta.

Las células tumorales degradan membranas basales para poder invadir los tejidos, de esa manera provocan liberación de FN y fragmentos de esta glicoproteína. En un principio pensamos que estos fragmentos podían inducir un aumento de la respuesta angiogénica, estimulando la movilización del endotelio capilar (teniendo en cuenta su actividad hapotáctica sobre las células endoteliales). Sin embargo observamos que el tratamiento con FN o su fragmento sobre linfocitos no estimulados por tumor, no modifica la vascularización que normalmente presenta la piel del ratón.

Evidentemente, los linfocitos tratados in vitro con estos péptidos no se activan para la respuesta neovascular.

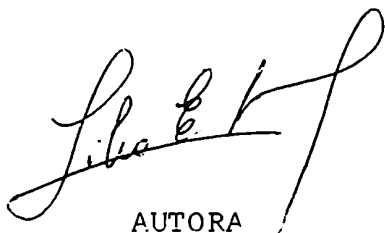
Como ya demostramos, es posible correlacionar la actividad angiogénica con la capacidad metastásica. Considerando que la FN y fragmentos derivados de ella pueden inhibir las metástasis experimentales, nos propusimos estudiar si esta inhibición se realiza también a través de la respuesta neovascular producida por linfocitos activados.

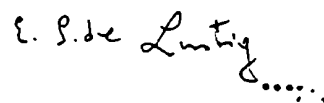
Los experimentos realizados nos permiten concluir que, entre los componentes de la matriz extracelular estudiados,

la FN y un tetrapéptido derivado de ella inhiben la angiogénesis.

Posiblemente, este bloqueo de la respuesta vascular sea una explicación de la inhibición de metástasis experimentales por FN y los péptidos derivados de ella.

Concluimos que la formación de un tumor requiere además de la multiplicación de la población celular patológica, la presencia de una gran extensión de red vascular. Esta neo vascularización es inducida directamente por factores tumorales e indirectamente por factores provenientes del sistema inmune a través de mecanismos complejos que involucran particularmente al MØ. Gracias a la acción de iones metálicos, glicoproteínas de adhesión y modificadores biológicos de la respuesta inmune pudimos bloquear el proceso angiogénico, paso importante en la modulación de la respuesta vascular.


AUTORA


DIRECTORA

