

## Tesis de Posgrado

# Factores reguladores de la angiogénesis en el fenómeno de resistencia antitumoral concomitante

Binda, María Mercedes

2002

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Binda, María Mercedes. (2002). Factores reguladores de la angiogénesis en el fenómeno de resistencia antitumoral concomitante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3435\\_Binda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3435_Binda.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Binda, María Mercedes. "Factores reguladores de la angiogénesis en el fenómeno de resistencia antitumoral concomitante". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3435\\_Binda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3435_Binda.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires*  
*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*



**Factores Reguladores de la  
Angiogénesis en el Fenómeno de  
Resistencia Antitumoral  
Concomitante**

Tesis presentada para optar por el título de  
*Doctor en Ciencias Biológicas*

*Autora: María Mercedes Binda*



Nº 3 4 3 5

**Director: Dr. R. Daniel Bonfil**  
**Lugar de Trabajo: Centro de Estudios  
Farmacológicos y Botánicos**

**Buenos Aires, 2002.**

# Indice

	Página
<b>Resúmenes</b>	
Resumen	2
Abstract	3
<b>Introducción</b>	
El problema del cáncer	6
Invasión y metástasis	7
Resistencia antitumoral concomitante	13
Angiogénesis o neovascularización	15
La cascada angiogénica	17
Mediadores angiogénicos	19
Factor de crecimiento endotelial vascular	20
Factor de crecimiento fibroblástico básico	21
Otras moléculas angiogénicas	23
Factores angiostáticos	24
Angiostatina	24
Endostatina	29
Otros factores angiostáticos	30
Terapia antiangiogénica	31
<b>Objetivos e Hipótesis de trabajo</b>	38
<b>Materiales y Métodos</b>	
Cultivos celulares	40
Animales	41
Preparación de medios condicionados	41
Ensayo de proliferación de las células endoteliales RV-EC	42
Ensayos de resistencia concomitante	
Ensayo de resistencia antitumoral concomitante	43
Ensayo de resistencia antimetastásica concomitante	45
Obtención de sueros	
Obtención de sueros de animales	45
Obtención de sueros de pacientes	46
Preparación de la fracción euglobina	46
Purificación de angiostatina a partir de sueros de animales y pacientes	47
Generación de angiostatina <i>in vitro</i>	48
Estudio de la generación de angiostatina con diferentes inhibidores de proteasas	48
Detección de angiostatina mediante la técnica de Western Blot	49

Análisis zimográfico	
Análisis zimográfico para metaloproteasas	51
Análisis zimográfico para activador de plasminógeno	52
Detección de los niveles de VEGF, bFGF y endostatina	53
Análisis estadístico	54
<b>Resultados</b>	
Ensayos de resistencia concomitante	
Ensayo de resistencia antitumoral concomitante	56
Ensayo de resistencia antimetastásica concomitante	62
Efecto sobre la proliferación de las células endoteliales RV-EC	
Efecto de los sueros de animales portadores sobre la proliferación de las células endoteliales RV-EC	64
Efecto de los MCs provenientes de los diferentes tumores sobre la proliferación de las células endoteliales RV-EC	69
Estudio de factores angiogénicos y angiostáticos	
Factores angiostáticos	71
Generación de angiostatina	
Análisis de angiostatina en sueros de ratones portadores de tumor	71
Generación de angiostatina <i>in vitro</i>	73
Estudio de la generación de angiostatina con diferentes inhibidores de proteasas	74
Análisis zimográfico	77
Producción de endostatina	
En suero de ratones portadores	79
En MCs	82
Factores angiogénicos	
Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	
En sueros de ratones portadores	83
En MCs	86
Factor de Crecimiento fibroblástico básico humano	87
Análisis de VEGF, bFGF, angiostatina y MMPs en sueros de pacientes con cáncer de mama	88
<b>Discusión</b>	94
<b>Referencias</b>	109

*a Carlitos.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a las siguientes personas y entidades porque gracias a su apoyo y generosidad contribuyeron en la realización de este trabajo:

Al Dr. R. Daniel Bonfil, por conducirme en este trabajo de investigación y transmitir sus conocimientos.

A Normita, por su cálida amistad y excelente asistencia técnica.

A toda la gente del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos que colaboraron con sugerencias, materiales de laboratorio y lo más importante, con toda su calidez: Maribela, Cristina Cerquetti, Ana Genaro, Gabriela Gorelik, Graciela, Mirian Wald, Ana Inés, Patricia, Isabel, Noemí, Ana Franchi, Marianele, María Laura, Maki, Diego, Maga, Alicia Falletti, Carolina, Alicia Motta, Tere, Alejandra, Alejandro, Alberto Capriolo, Andrea Lasserre y Silvina Perez Martinez.

A mi querida familia que siempre apoyó mis estudios y proyectos.

A la incondicional y valiosísima ayuda recibida por parte de los Drs. Juan Carlos Goin y Eduardo Scodeler que siempre estuvieron dispuestos a escucharme cuando alguna técnica no me salía y aportaron excelentísimas sugerencias.

A Graciela Teglia, una querida amiga.

A la Dra. Graciela Scharovsky, por el apoyo brindado como codirectora de esta tesis.

A la Fundación de Investigación del Cáncer, Liga Argentina de Lucha contra el Cáncer y CONICET que tuvieron la gentileza de otorgarme becas y gracias a ellas pude llevar a cabo este trabajo.

Al Dr Daniel Goldstein, un excelente profesor y el responsable de marcar mi camino en la ciencia poniendo en mis manos un trabajo de J. Folkman.

A todos ellos, muchas gracias.

# *Resúmenes*

# Resumen

## “Factores reguladores de la angiogénesis en el fenómeno de Resistencia Antitumoral Concomitante”

La resistencia antitumoral concomitante (RC) describe el fenómeno mediante el cual individuos portadores de un tumor son capaces de inhibir implantes tumorales secundarios o metástasis. En esta tesis se analizaron cinco modelos tumorales, tres derivados a partir de tumores mamarios murinos en ratones singenéticos y dos líneas de carcinoma de pulmón humano en ratones *nude*, con el objeto de saber\* que murinos frente a inóculos s.c. y endovenosos (i.v.) de sus respectivas células. Se analizaron dos inhibidores (angiostatina y endostatina) y dos inductores (factor de crecimiento fibroblástico básico o bFGF y factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF) de la angiogénesis, en sueros de animales portadores y en los medios condicionados (MCs) provenientes de los distintos tumores cultivados *in vitro*. Aunque no se pudo detectar angiostatina *in vivo* en los sueros de ratones portadores, sí se detectó la conversión de plasminógeno a angiostatina *in vitro* por MCs en aquellos casos que mostraban capacidad de generar RC. El estudio con diferentes tipos de inhibidores de proteasas demostró que la enzima involucrada en esta conversión era una serinoproteasa. El uso de inhibidores del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) inhibió la generación de angiostatina, a excepción de una de las líneas murinas (M3MC) que posiblemente utilice una serinoproteasa distinta de uPA.

Además, en general, se observó una baja concentración de VEGF y una alta concentración de endostatina en los sueros de animales portadores inductores de RC, respecto de sus controles y de los restantes grupos experimentales incapaces de desarrollar RC. Los resultados hallados permiten comprender más profundamente el mecanismo de RC, a la vez aportan información que podría ser de utilidad para un eventual futuro

el objeto de saber\* que factores angiogénicos/angiostáticos regulaban el fenómeno. Una de las líneas humanas generó una fuerte RC frente a un inóculo tumoral secundario subcutáneo (s.c.) en ratones *nude*, así como lo hicieron dos de los modelos tumorales] murinos frente a inóculos s.c. y endovenosos (i.v.) de



tratamiento del cáncer basado en el uso de reguladores de la angiogénesis tumoral.

## Abstract

### **“Angiogenesis Regulating Factors in the phenomenon of Concomitant Antitumoral Resistance”**

The term “concomitant antitumoral resistance” (CR) describes the phenomenon by which tumor-bearing hosts are capable of inhibiting secondary tumor implants or metastases. In order to elucidate whether the phenomenon under study is dependent on the capacity of tumor cells to generate different angiogenic and/or antiangiogenic factors, we used in this thesis three murine mammary adenocarcinomas and two human lung cancer cell lines. One of the human lung cancer cell lines revealed a strong CR against secondary subcutaneous (s.c.) tumor implants in *nude* mice, as well as two of the murine mammary tumors against secondary s.c. and intravenous (i.v.) tumor inoculations in syngeneic hosts did. Two angiogenesis inhibitors (angiostatin and endostatin) and two angiogenic inducers (basic fibroblast growth factor or bFGF and vascular endothelial growth factor or VEGF) were analyzed in tumor-bearing mice sera and in conditioned media (CM) derived from the different tumor cells grown *in vitro*. Angiostatin could not be detected in either of the tumor-bearing mice sera analyzed. However, the CMs derived from those tumor cells that were capable to induce CR, showed *in vitro* conversion of plasminogen into angiostatin. The use of different types of protease inhibitors revealed that the conversion could be due to a serine protease. The use of urokinase type plasminogen activator (uPA) inhibitors could abrogate the generation of angiostatin, except for one of the murine

mammary cancer cells lines, namely M3MC, that might utilize a serine protease other than uPA for the cleavage of plasminogen into angiostatin.

Furthermore, a low VEGF concentration and a high endostatin concentration were usually found in sera from tumor-bearing mice, with respect to their controls and other experimental groups that did not induce CR. The results found herein lead to a more profound understanding of the CR mechanism, providing new information that could be useful for a future treatment of cancer based on the use of angiogenesis regulators.

# *Introducción*

# Introducción

## El problema del cáncer

El cáncer constituye un grupo de enfermedades con características comunes. Antes de definirlo debemos definir qué es una neoplasia. Este término, para el cual habitualmente se usa como sinónimo la palabra tumor, describe al crecimiento celular relativamente autónomo donde las células se dividen sin respetar los mecanismos de control proliferativos normales. Las neoplasias pueden clasificarse de acuerdo a su comportamiento evolutivo en benignas o malignas, siendo el cáncer una neoplasia maligna. Las principales diferencias entre ambos grupos son que las neoplasias benignas se encuentran encapsuladas, no son invasivas, están muy diferenciadas, sufren mitosis con poca frecuencia, tienen un crecimiento lento y no producen metástasis. En cambio, en las neoplasias malignas ocurre todo lo contrario (Pitot H. C.1981)

Este grupo de enfermedades se ha convertido en la segunda causa de muerte en los países industrializados con una incidencia del 23,2% luego de ataques cardíacos (Landis S.H. et al., 1998; Greenlee R.T. et al., 2001). Según estadísticas hechas en los EEUU, los cánceres más frecuentes a desarrollar en la mujer son, en orden decreciente, los de pulmón y bronquio, mama, y colon y recto; en cambio, en el hombre los de pulmón y bronquio, próstata y colon y recto (Greenlee R. T. et al., 2001). En la actualidad se considera que una de cada cuatro personas puede padecer alguna de estas enfermedades a lo largo de su vida.

Las metástasis son colonias tumorales en órganos distantes derivadas del tumor primario. Es uno de los problemas más grandes en el tratamiento

del cáncer ya que es la principal causa de muerte entre los pacientes que sufren esta enfermedad (Ahmad A. et al., 1996). De hecho, de no existir este fenómeno, la remoción del tumor primario, por lo menos en tumores sólidos sería curativa.

Independientemente de su origen, multicausal y diferente en cada caso, el crecimiento de todo tumor depende de su neovascularización o angiogénesis. Definamos brevemente en este punto qué es la angiogénesis: se trata de la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un paso importante en la formación de un tumor ya que, sin el suministro de nutrientes y oxígeno, el tumor podría sólo crecer unos pocos mm de diámetro (Folkman J. 1971). Dado que al momento del diagnóstico este proceso ya ha tenido lugar en el tumor primario, el estudio de los factores angiogénicos y antiangiogénicos, así como de sus mecanismos regulatorios, es fundamental para el tratamiento de las metástasis, que también depende de la formación de una red vascular para su crecimiento.

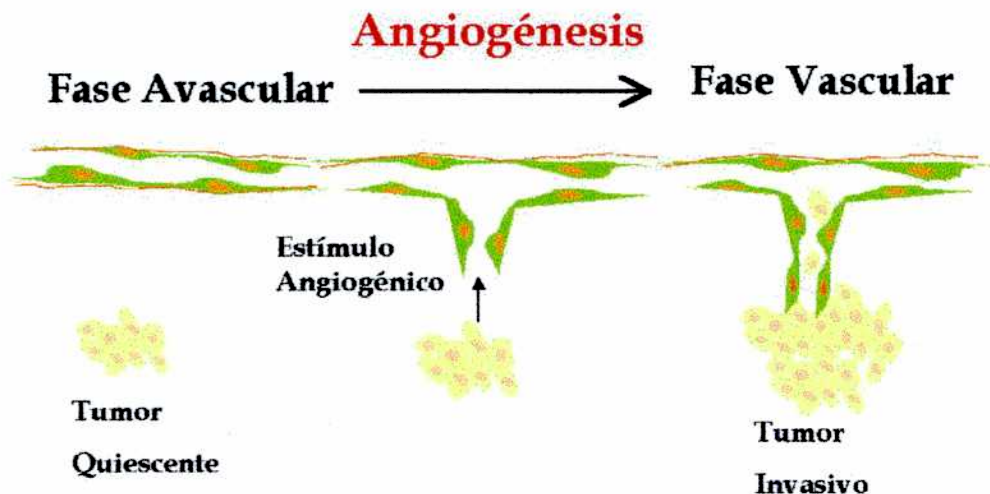
### **Invasión y metástasis**

Cuando una célula epitelial transformada comienza una división celular desregulada se forma una masa microscópica de unos pocos milímetros cúbicos llamada carcinoma *in situ*. Este pequeño tumor prescinde de la neovascularización, por lo que a esta etapa se la denomina fase prevascular o avascular. El crecimiento del tumor en esta etapa es muy lento y puede durar de meses a años. Sin embargo, esto no significa, necesariamente, que las células proliferan lentamente, sino que el balance entre proliferación y apoptosis está favoreciendo a esta última. Un paso crítico para que el carcinoma *in situ* progrese hacia un tumor sólido de mayor porte se da cuando un subgrupo de las células neoplásicas cambia a un fenotipo angiogénico. Esto implica una variación local entre la producción de

los mediadores endógenos positivos y negativos de la angiogénesis. Este cambio puede ser llevado a cabo por las células tumorales de diferentes maneras: sobreexpresando factores proangiogénicos y/o disminuyendo la producción de factores angiostáticos, reclutando macrófagos, los cuales producen sus propios factores angiogénicos, movilizand o proteínas angiogénicas de la matriz extracelular o por combinación de los procesos anteriores. Entonces, el tumor que ha empezado a neovascularizarse, va a crecer más rápidamente, invadir y aumentar su potencial metastásico (Figura 1). Esto es lo que se denomina fase vascular de tumor (Folkman J., 1995b).

**Figura 1**

**Fases avascular-vascular de un tumor.**



Durante la transición de un carcinoma *in situ* a uno invasor, las células tumorales deben invadir y acceder a la vasculatura del tumor primario. El proceso de invasión consta de los siguientes pasos: primero las células deben adherirse a la membrana basal, degradarla y moverse a través de ella, para así intravasarse y acceder al torrente sanguíneo. Allí, las células pueden viajar solas o asociadas a otras células tumorales (agregados homotípicos), a células del huésped como, por ejemplo, plaquetas, leucocitos (agregados heterotípicos), o a fibrina. Luego de ocurrido el proceso de diseminación a través del sistema circulatorio (sea hemático o linfático) u otras vías, la célula se detiene en un órgano definido y ocurre la extravasación, donde las células endoteliales se retraen y la célula tumoral debe degradar la membrana basal subendotelial para alcanzar así el parénquima del órgano blanco. Entonces, las células tumorales comienzan a proliferar utilizando los nutrientes que les llegan por difusión, generándose así micrometástasis (Bonfil R.D., 1998a).

Lo mismo que sucede en el tumor primario durante la fase avascular, ocurre en las micrometástasis que no han sido vascularizadas. Las micrometástasis pueden estar dormidas por años, probablemente porque el balance entre proliferación y muerte celular tiende hacia esta última. Como se explicó anteriormente, el tumor primario controlaría en muchos casos estas micrometástasis a distancia. Resultados experimentales avalan esta teoría (Holgrem L. et al., 1995; O'Reilly M.S. et al., 1996). Estas micrometástasis pueden dejar esta fase avascular, comenzar a vascularizarse y convertirse en metástasis macroscópicas y así volver a metastatizar.

Como se explicó anteriormente, las células tumorales que van a invadir deben **adherirse** a componentes de la matriz extracelular. Para lograr esto, dichas células deben previamente disminuir la adhesión intercelular en el tumor primario. Existen fundamentalmente dos grupos de moléculas

importantes en la adhesión intercelular: las caderinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas. La adhesión célula-matriz extracelular está dada por dos tipos de receptores de membrana: las integrinas y las CD44.

Luego de adherirse a la matriz extracelular, las células tumorales deben **degradar** la matriz extracelular. Para lo cual producen diferentes tipos de enzimas: serino, aspartil, cisteíno y metaloproteasas. Estas enzimas pueden ser secretadas por las células tumorales, estromales y/o leucocitos infiltrantes. Una de las enzimas más importantes que intervienen en este proceso son los metaloproteinasas (MMPs). Las MMPs son una familia de proteasas que constan de un mínimo de 15 miembros. Requieren zinc y calcio como cofactor; salvo MMP-11, se secretan inactivas como zimógenos, es decir, necesitan de la pérdida de un fragmento aminoterminal para activarse, y degradan diferentes componentes de la matriz extracelular. Como puede verse en la Tabla 1, existen diferentes tipos de MMPs cada una de ellas actúa sobre un sustrato específico.



**Tabla 1**  
**Clasificación de las Metaloproteinasas**

<b>Grupo</b>	<b>Nombre de la enzima</b>	<b>Sustrato principal</b>
Gelatinasas	MMP-2 (gelatinasa A, colagenasa tipo IV de 72 kDa)	Colágeno tipo IV, V, VII, X y XI, Gelatina, elastina, fibronectina y laminina
	MMP-9 (gelatinasa B, colagenasa tipo IV de 92 kDa)	Colágeno tipo I, II, IV y V Gelatina, elastina y proteoglicanos
Colagenasas	Colagenasa intersticial (MMP-1) Colagenasa de neutrófilos (MMP-8) Colagenasa 3 (MMP-13)	Colágenos fibrilares. Colágeno tipo I, II, III, VII, VIII y X, Gelatina.
Estromelisinias	MMP-3 (Estromelisinina 1)	Proteoglicanos, fibronectina, laminina, colágeno II, IV, V, IX y X
	MMP-10 (Estromelisinina 2)	Proteoglicanos, fibronectina, colágeno III, IV y V.
	MMP-11 (Estromelisinina 3)	Laminina y fibronectina (actividad débil)
Elastasas	MMP-7 (Matrilisinina)	Gelatina, proteoglicanos, colágeno IV, laminina y fibronectina.
	MMP-12 (metaloelastasa)	Elastina
MMP de membrana	MMP-14 (MT1-MMP)	ProMMP-2
	MMP-15 (MT2-MMP)	
	MMP-16 (MT3-MMP)	Desconocidos
	MMP-17 (MT4-MMP)	
	MMP-24 (MT5-MMP)	
MMP-26 (MT6-MMP)		

(Modificado a partir de Ahmad A. et al., 1996; Wojtowicz-Praga S.M. et al., 1997; Bonfil D., 1998a).

Las MMP-2 y 9 son componentes normales del plasma y son producidas por diferentes tipos celulares como neutrófilos, macrófagos y otras células que intervienen en los procesos inflamatorios que necesitan digerir la matriz extracelular para acceder al parénquima de los órganos. La actividad de las MMPs en plasma, suero y otros fluidos corporales de pacientes con cáncer ha sido correlacionada con la progresión metastásica y

con el mal pronóstico de la enfermedad (Farias E. et al, 2000; Sheen-Chen S., et al., 2001).

La actividad de las MMPs está regulada por los inhibidores tisulares de las MMPs o TIMPs (del inglés: *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*). Los TIMPs suelen formar un complejo estequiométrico no covalente con el zimógeno o con la forma activa de la enzima, inhibiendo así su actividad. En el caso de TIMP-4, él se une a la matriz extracelular y no se comprobó aún su asociación a MMPs. A su vez, se ha visto que TIMP-2 es esencial para la activación de pro-MMP-2 por MT1-MMP (Hernández-Barrates et al., 2000). La expresión de estas proteínas inhibe la degradación de la matrix extracelular y la invasión de diferentes líneas celulares *in vitro* e *in vivo* (Anand-Apte B. et al., 1996).

Las serinoproteasas son otras de las enzimas involucradas en el proceso de degradación de la matriz extracelular. Poseen una serina en su sitio activo y también se secretan como zimógenos. Un sistema proteolítico muy importante que interviene en este proceso es el sistema plasminógeno/plasmina, conocido por su rol en la fibrinólisis. El plasminógeno es activado a plasmina por la serinoproteasa activadora de plasminógeno (PA) que puede ser de tipo uroquinasa o tisular (uPA o tPA). La plasmina resultante es otra serinoproteasa de amplio espectro (degrada diferentes componentes de la matriz extracelular). La expresión de uPA se ha visto asociada a tumores invasivos y con mal pronóstico. La activación del zimógeno uPA se da por unión a sus receptores en la superficie celular (uPARs), capturando plasmina en la misma. Los PAs y la plasmina poseen inhibidores fisiológicos específicos presentes en suero. Mientras que los PAs suelen ser inhibidos por PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1*) y PAI-2, la plasmina, en cambio, es controlada por  $\alpha_2$  antiplasmina (Malonne H. et al, 1999).

Otras proteasas involucradas en el proceso de invasión son las cisteíno y las aspartil proteasas. Al primer grupo pertenecen la catepsina B y L y al segundo la catepsina D. Son proteasas lisosomales que degradan diferentes componentes de la matriz extracelular y su expresión también está correlacionada con un aumento de la capacidad metastásica.

Es importante destacar que el balance entre las proteasas y sus inhibidores va a determinar si el proceso de invasión tumoral va a ocurrir o no. De hecho, los resultados que se están obteniendo en distintas fases en ensayos clínicos con inhibidores de proteasas ratifican lo anterior con resultados promisorios.

Como puede verse, existe una estrecha relación entre el sistema proteolítico sanguíneo y el proceso de invasión y neovascularización (Wojtukiewicz M.Z. et al., 2001). También existe una similitud entre el proceso de invasión y la generación de un nuevo vaso sanguíneo, ya que en ambos casos las células (tumoraes y endoteliales, respectivamente) se activan, deben degradar la membrana basal para lo cual secretan proteasas, deben moverse y proliferar para formar un nuevo tumor o un neovaso. La similitud de ambos procesos es un punto muy importante a considerar para atacar ambos procesos a la vez.

### **Resistencia Antitumoral Concomitante**

En la clínica médica suele observarse que la remoción de un tumor trae aparejado, en muchos casos, un crecimiento exacerbado o "incendio" de metástasis en sitios anatómicos distantes (Sugarbaker E.V. et al., 1977;

Gorelik E., 1982). Por este motivo, y en base a estudios experimentales con resultados similares, se ha postulado que el tumor primario podría controlar, en ciertas ocasiones, el crecimiento de metástasis a distancia (O'Reilly M.S. et al., 1994).

El fenómeno mediante el cual un tumor primario inhibe o retarda el crecimiento de implantes secundarios, que podrían considerarse metástasis artificiales, ha sido observado por P. Ehrlich (Ehrlich P., 1906) y por E. Bashford (Bashford E. et al., 1908), a comienzos del siglo XX. Para entonces, se utilizaba el término "inmunidad concomitante" para explicar este fenómeno, que se evaluaba utilizando tumores inducidos por agentes carcinogénicos, con una fuerte respuesta inmunológica.

Luego se vio que este fenómeno ocurría también con tumores débilmente inmunogénicos o no inmunogénicos, demostrándose así que el sistema inmune no siempre estaría mediando esta inhibición (Yuhas J.M. et al., 1975; Ruggiero R.A. et al., 1985; Meiss R.P. et al., 1986; Bonfil R.D. et al., 1988). Por estas observaciones, se acuñó en 1986 el término de "resistencia concomitante" (RC) para explicar el mecanismo de control que realiza el tumor primario sobre tumores secundarios o metástasis, independientemente del mecanismo responsable (Meiss R.P. et al., 1986).

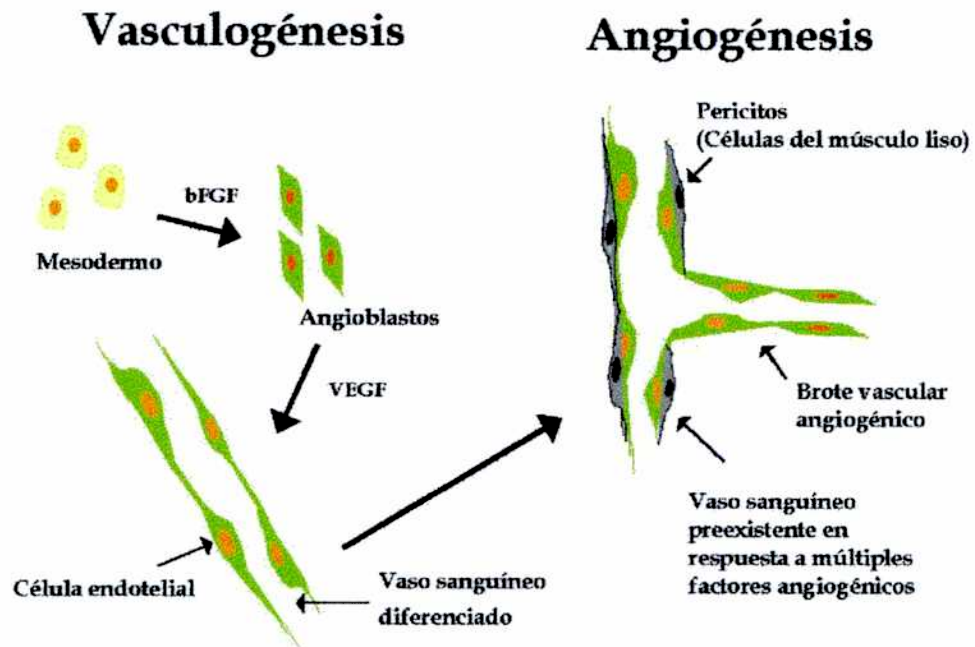
Se han propuesto varias hipótesis para explicar el fenómeno de resistencia antitumoral concomitante. La primera, descrita por P. Ehrlich, es la teoría de la atrepsis, la cual postula que el inóculo secundario no crecería debido a la depleción de nutrientes esenciales para su crecimiento por parte del tumor primario (Ehrlich P., 1906). En la segunda teoría, E. Bashford postula que el crecimiento de un tumor primario generaría una respuesta inmunológica que no sería suficientemente fuerte como para inhibir su propio crecimiento, pero sí para inhibir el de los implantes secundarios

(Bashford E. et al., 1908). La tercer teoría, propuesta por varios grupos de investigación, postula que esta resistencia dependería de factores circulantes inhibitorios del crecimiento de las metástasis, que serían producidos por el tumor y desaparecerían al ocurrir su remoción sea quirúrgica o por otro método terapéutico. Dentro de esta teoría podemos destacar a dos grupos, los que postulan que estos factores tendrían una actividad antitumoral (De Wyss W.D., 1972; Gorelik E., 1983; Ruggiero, R.A. et al., 1990) y los que explican este fenómeno mediante una inhibición de la angiogénesis tumoral (O'Reilly M.S. et al., 1994; Di Gianni P.D. et al., 1995; Chen C. et al., 1995; Volpert O.V. et al. 1998; Bonfil R.D. et al., 1998).

### **Angiogénesis o neovascularización**

El sistema vascular se forma a través de la combinación de dos procesos: **vasculogénesis** y **angiogénesis**. El primero de ellos se basa en la diferenciación *in situ* a partir de los angioblastos (precursores de las células endoteliales de origen mesodérmico que no han formado un lumen) y la asociación de los mismos para formar nuevos vasos sanguíneos. Ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario para formar el plexo vascular primario, aunque recientemente se ha visto que puede ocurrir también en el organismo adulto a partir de precursores endoteliales provenientes de la médula ósea (Asahara T., et al., 1997). La angiogénesis o neovascularización, en cambio, es la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, y ocurre en la embriogénesis tardía y durante la vida adulta (Beck L., et al., 1997) (Figura 2).

**Figura 2**  
**Vasculogénesis y Angiogénesis**



La angiogénesis es un proceso proliferativo que se da tanto en condiciones fisiológicas, así como en condiciones patológicas. En el adulto, en condiciones fisiológicas, la angiogénesis está estrictamente controlada y ocurre casi exclusivamente en el sistema reproductivo femenino (Smith S.K., 2001). La angiogénesis puede ser activada en el adulto en respuesta a un daño tisular o proceso inflamatorio como, por ejemplo, durante la cicatrización de una herida (Lembach M., 2001), una úlcera gástrica, o un infarto de miocardio (D'Amore P.A. et al., 1999).

Sin embargo, puede haber una inducción aberrante o patológica de la angiogénesis en casos tales como el crecimiento tumoral, la artritis reumatoidea, la aterosclerosis, enfermedades inflamatorias crónicas, hemangiomas, retinopatías diabéticas (Folkman J., 1995c) o endometriosis

(Healy D.L. et al., 1998). Como ya se explicó, la angiogénesis es esencial para el crecimiento tumoral y juega un paso crítico en el establecimiento, crecimiento y metástasis de tumores sólidos y cánceres hematológicos. El pasaje de un tumor de la forma avascular, quiescente, a la forma vascular, con la consecuente formación de metástasis, involucra el proceso de angiogénesis. Sin actividad angiogénica el crecimiento de un implante tumoral o de un tumor espontáneo *in situ* se limitaría a unos pocos millones de células en un volumen de unos pocos milímetros cúbicos (Folkman J., 1995b).

Desde que Judah Folkman, en 1971, propuso la inhibición de la angiogénesis tumoral como una nueva terapia contra el cáncer (Folkman J., 1971), los investigadores se hallan tratando de entender los mecanismos moleculares y celulares que median la angiogénesis fisiológica y patológica. Si se pudiera impedir la angiogénesis inducida por el tumor, tendríamos una nueva herramienta para atacar el cáncer (Folkman J., 1995a).

### **La cascada angiogénica**

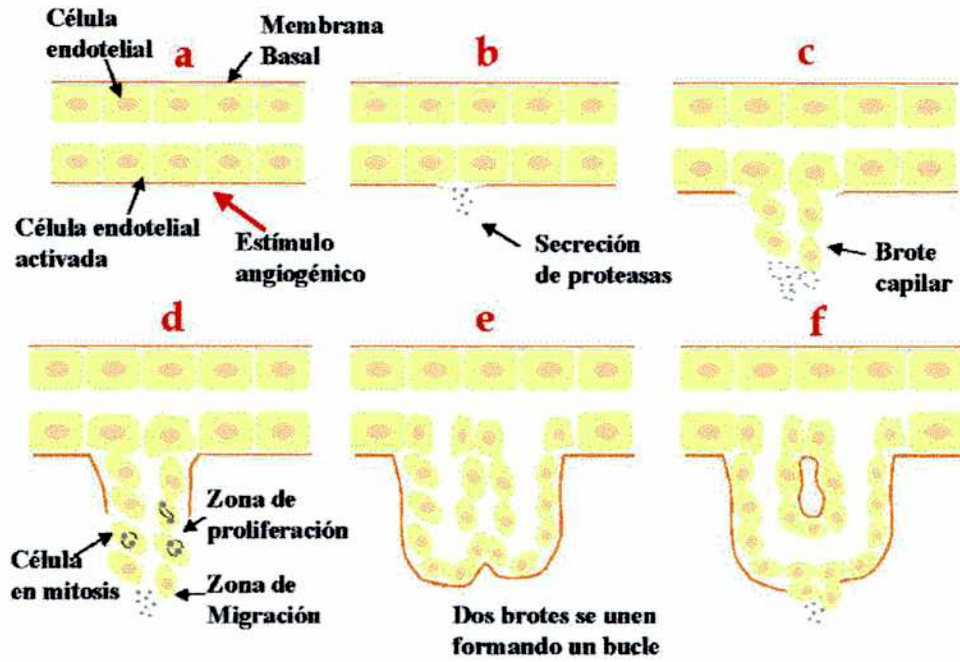
El proceso angiogénico está regulado por un delicado equilibrio de factores angiogénicos o que estimulan la angiogénesis, y factores angiostáticos, que la inhiben, que afectan directamente la proliferación de las células endoteliales. Se ha descrito que éstos son producidos por células tumorales, estromales e inflamatorias (Chen C. et al., 1995; Kong H.L. et al., 1998; Nguyen M., 1997). La angiogénesis puede ser tanto iniciada como desactivada en un corto espacio de tiempo. Los principales estímulos a nivel molecular que activarían la cascada angiogénica son la inflamación y la hipoxia, procesos que producirían la liberación de factores angiogénicos

como por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Pötgens A.J.G. et al., 1995).

La formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso que ocurriría en varios pasos (Figura 3). Primero las células endoteliales reciben una **inducción**, a través de un estímulo que puede ser producido por citoquinas liberadas por el tumor y/o por células infiltrantes, como macrófagos y fibroblastos. Las células endoteliales, que se hallaban quiescentes, se activan y adquieren características de angioblastos embrionales. Secretan proteasas como, por ejemplo, colagenasas, para disolver de la membrana basal subendotelial y luego, comienzan a **migrar** desde la pared vascular hacia la matriz extracelular y **proliferan**. La matriz extracelular también actúa como un reservorio de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento fibroblástico ácido o básico (aFGF, bFGF). Se genera así un brote vascular sólido. Un cambio en la polarización de las células endoteliales, la formación de la membrana basal y la aparición de los pericitos alrededor del brote, establecen un nuevo vaso sanguíneo funcional. Se desarrolla un lumen y aparecen uniones intercelulares. Dos brotes cercanos pueden fusionarse formando bucles por anastomosis, por los que comienza la circulación sanguínea (Colville-Nash P.R. et al., 1997).



Figura 3  
La Cascada Angiogénica



### Mediadores angiogénicos

Entre los factores angiogénicos secretados por el tumor, los más estudiados son el factor de crecimiento fibroblástico básico o bFGF, y el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Kong H.L. et al., 1998; Nguyen M., 1997; Folkman J. et al., 1987). Me referiré brevemente a ellos.

## Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de entre 34 y 46 kDa con acción mitogénica específica de las células endoteliales. También es conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF) pues causa hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos, permitiendo así la extravasación de proteínas e induciendo la actividad procoaguladora y la formación de ascitis en determinados procesos cancerosos (Dvorak H.F. et al., 1995). Es producido normalmente durante la embriogénesis y en la vida adulta en procesos normales y patológicos, incluyendo el desarrollo del tumor.

Existen cinco isoformas de VEGF, resultado del *splicing* alternativo de un único gen (Houck KA et al., 1992). Sus nombres derivan del número de aminoácidos que comprende cada isoforma: 121, 145, 165, 189 y 206. Mientras dos de ellas son secretadas (VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>189</sub>), las tres restantes se hallan principalmente asociadas a heparina y al proteoglicano heparán sulfato en la superficie de la célula o en la matriz extracelular. Estos VEGFs ligados a otras moléculas constituyen un reservorio del factor, liberándose a través de la cascada proteolítica del activador del plasminógeno (Achen M.G. et al., 1998).

Hasta el momento se han identificado dos receptores de alta afinidad para este factor: VEGF-R1 o Flt-1, VEGF-R2 o Flk-1/KDR y VEGF-R3 o flt-4, que son receptores tirosinas quinasas transmembrana (Beck L., et al., 1997). Se ha clonado una forma soluble del VEGF-R1 y se demostró que produciría una inhibición de la actividad mitogénica en células endoteliales ya que impediría que el VEGF secretado se una a su receptor (Kendall R.L. et al., 1993).

La mayoría de los tumores sobreexpresan este factor. La hipoxia que suele darse en tumores malignos y en heridas, aumenta la transcripción del gen que codifica para VEGF y hace al ARN mensajero más estable una vez que se produjo. Durante la hipoxia, se produce una molécula llamada factor de transcripción 1 inducible por hipoxia (HIF-1) que se transloca al núcleo y se pega a una secuencia nucleotídica llamada elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) localizada en la región 5' promotora del gen de VEGF. La unión del HIF-1 al HRE inicia la transcripción del gen (Minchenko A. et al., 1994). Los tumores sólidos suelen crecer hasta 1 mm de diámetro, llegándoles los nutrientes por difusión simple. Más allá de ese volumen, la difusión simple no es suficiente y se genera hipoxia en el centro del tumor, aumentando así la expresión de VEGF. La producción de este factor produce el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor.

Diversos trabajos han demostrado que este factor se halla elevado en el suero de pacientes con diferentes tipos de cánceres respecto del de personas sanas (Kondo S. et al., 1994; Yamamoto Y. et al., 1996; Takigawa N. et al., 1998; Morelli D. et al., 1998; Belgore F.M. et al., 2001; Tabone M.D. et al., 2001).

### **Factor de crecimiento Fibroblástico básico**

Otro péptido angiogénico es el bFGF (también llamado FGF-2). Es un potente mitógeno que se expresa fisiológicamente y en un gran número de tumores para inducir su propia neovascularización (Nguyen M., 1997; Boquete A. et al., 1998). Este factor exhibe secuencias aminoacídicas homólogas a las de algunos productos oncogénicos tales como INT-2 y HST-

1 (Moore R. et al., 1986; Taira M. et al., 1987), comparándose a través del uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes su rol promotor de la angiogénesis (Hori A. et al., 1991).

Se ha visto que este factor también se asocia a la heparina, y con mayor afinidad que el VEGF. La administración de anticuerpos neutralizantes contra FGF-2, inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos experimentales (Matsuzaki K. et al., 1989). También se ha detectado la presencia de bFGF en suero y orina de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Nguyen M. et al., 1993; Nguyen M. et al., 1994; Fujimoto K. et al., 1991).

Se ha descrito un gran número de moléculas proangiogénicas además de la mencionadas que se incluyen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Otras moléculas angiogénicas

Sustancias Proangiogénicas	Función sobre las células endoteliales
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Estimula la proliferación, migración y formación del tubo. Mitógeno específico. Induce la angiogénesis <i>in vivo</i> y aumenta la permeabilidad vascular.
Factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF o FGF-1) Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o FGF-2)	Estimula la proliferación, migración y formación del tubo. Induce la angiogénesis <i>in vivo</i> .
Factor de crecimiento transformante $\alpha$ ( $\alpha$ -TGF)	Actúa en la proliferación y migración.
Factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 ( $\beta$ 1-TGF)	Es producido por macrófagos y plaquetas activadas. Es un agente quimiotáctico para macrófagos. Facilita la reparación de una herida acelerando el proceso de deposición y maduración del colágeno.
Factor estimulante de colonias de granulocitos	Estimula la proliferación y migración <i>in vivo</i> .
Factor de crecimiento similar a la insulina-1 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Migración y formación del tubo. Es un factor de crecimiento mitogénico. Estimula la angiogénesis <i>in vivo</i> y la migración de las células endoteliales <i>in vitro</i> .
Integrinas vasculares ( $\alpha$ v $\beta$ 3 y $\alpha$ v $\beta$ 5), Fibrina, fibronectina.	Facilitan la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Juegan un rol importante en la quimiotaxis de la célula endotelial.
Factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ )	Es un factor angiogénico derivado de los macrófagos ( <i>in vivo</i> ).
Angiogenina	Estimula la angiogénesis <i>in vivo</i> , solamente. No se vieron efectos <i>in vitro</i> .
Prostaglandina E1 y E2.	Estimula la proliferación de las células endoteliales.
Interleuquina 8 (IL-8)	Estimula la angiogénesis <i>in vivo</i> y la proliferación y migración <i>in vitro</i> .
Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF)	Se encuentra en plaquetas y es liberado durante la cascada de coagulación de la sangre. Es un mitógeno de la célula endotelial <i>in vitro</i> . Promueve la migración y facilita la diferenciación de la célula endotelial. Estimula la angiogénesis <i>in vivo</i> .
Endotoxina o lipopolisacáridos Metaloproteinasas	Estimula a los macrófagos a producir sustancias angiogénicas. Secretadas por las células endoteliales activadas para degradar la membrana basal y migrar.
Activador de Plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) Estrógeno	Induce la angiogénesis Estimula la proliferación, migración y formación del tubo.
Proteína ácida secretada rica en cisteína (SPARC)	Formación de capilares <i>in vitro</i> .

(McNamara D.A. et al., 1998; Kong H. L. et al., 1998)

## Factores angiostáticos

Entre los factores angiostáticos más estudiados se encuentran la angiostatina y la endostatina aisladas por el grupo de Folkman (O'Reilly M.S. et al., 1994; O'Reilly M.S et al.,1997b). Me referiré brevemente a ellas.

### Angiostatina

Es la molécula antiangiogénica más estudiada. Fue aislada inicialmente de orina y suero de animales portadores del carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) (O'Reilly M. S. et al., 1994). La angiostatina murina es un fragmento proteolítico de 38 kDa derivado del plasminógeno. Este a su vez, es una glicoproteína de 92 kDa que consiste de 791 aminoácidos, circula en sangre y es la proenzima de la plasmina, una serino proteasa que interviene en el proceso coagulatorio. El plasminógeno está formado por una única cadena con un dominio de preactivación, cinco *kringles* (dominios de aproximadamente 80 aminoácidos con forma de rulo unido por tres puentes disulfuro) y un dominio catalítico (Figura 4).

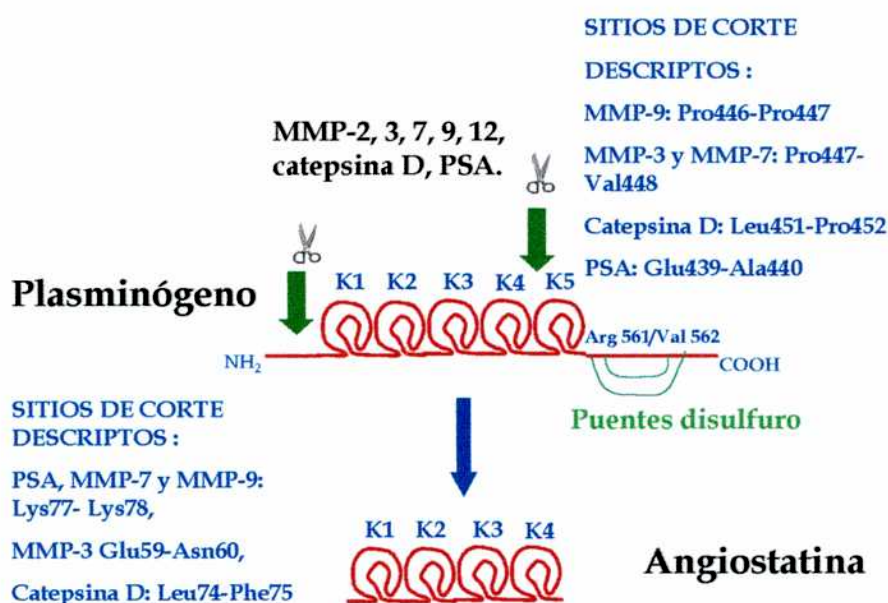
A través de estudios *in vitro* se ha visto que la angiostatina es generada a partir del plasminógeno por enzimas secretadas por las células tumorales y/o macrofágicas preservando los *kringles* 1-4 de la molécula precursora. Aún se desconocen los mecanismos de generación de angiostatina que operan *in vivo*. Sólo un grupo ha demostrado que la transfección de células de melanoma con el gen de la metaloelastasa macrofágica produciría una inhibición del crecimiento del tumor primario *in vivo*, la cual se cree que se debería a la generación de angiostatina mediada por esta enzima (Gorrin-Rivas M.J. et al., 2000). Sin embargo, dicha observación no prueba la generación de angiostatina *in vivo* en huéspedes portadores de tumores.

Como puede verse en la Figura 4 las enzimas hasta ahora involucradas en el procesamiento del plasminógeno incluyen a: metaloproteinasas, como la MMP-2 o gelatinasa A (O'Reilly M.S., et al., 1999), MMP-3 o estromelisina-1 (Lijnen H.R. et al., 1998), MMP-7 o matrilisina (Patterson B.C. et al., 1997), MMP-9 o gelatinasa B (Patterson B.C. et al., 1997), MMP-12 o elastasa macrofágica (Dong Z., et al., 1997), serinoproteasas (Gately S. et al., 1996) como la plasmina (Stathakis P. et al., 1997), el antígeno prostático específico (Heidtmann H.H. et al., 1999) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa o tisular (Gately S. et al., 1997; O'Mahony C.A. et al., 1998; Westphal J.R. et al., 2000a) y proteasas aspárticas como la catepsina D (Morikawa W. et al., 2000).

**Figura 4**

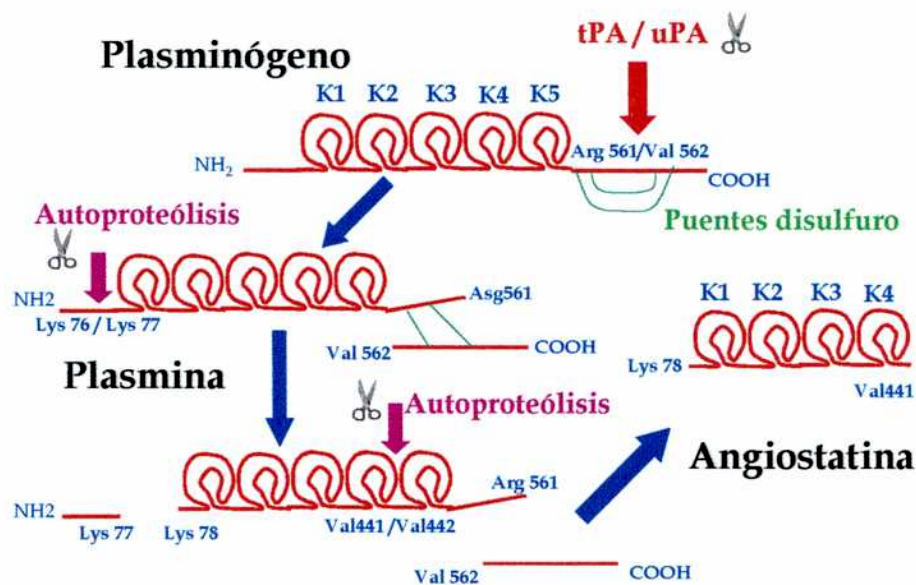
**Mecanismos de generación de angiotatina *in vitro***

**Mecanismo A**



PSA: antígeno prostático específico, K: kringle, NH<sub>2</sub>: extremo amino terminal, MMP: metaloproteasa, COOH: extremo carboxilo terminal.

**Figura 4**  
**Mecanismos de generación de angiotatina *in vitro***  
**Mecanismo B**



uPA: Activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, tPA: activador de plasminógeno de tipo tisular, NH<sub>2</sub>: extremo amino terminal, K: kringle, COOH: extremo carboxilo terminal

La generación de angiotatina vía metaloproteinasas, PSA y catepsina D ocurre mediante un corte entre los *kringles* 4-5 y otro en una unión peptídica cercana al extremo amino terminal. Dichos cortes varían según cual sea la enzima (ver Figura 4, mecanismo A). En cambio, el proceso que involucra a serinoproteinasas sería un poco más complejo (Figura 4, mecanismo B). Dos serinoproteasas que intervienen en el proceso de fibrinólisis, el activador de



plasminógeno de tipo uroquinasa o de tipo tisular, pueden activar al plasminógeno a través de un corte entre los aminoácidos Arg 561 y Val 562, generando así dos cadenas que se mantienen unidas por dos puentes disulfuros (cadena pesada y cadena liviana). Cuando esto ocurre, el dominio de preactivación sufre una autoproteólisis y es cortado. La molécula resultante es la plasmina. Luego ocurre una reducción de los puentes disulfuro por una plasmina reductasa, separándose las dos cadenas, y una autoproteólisis entre el *kringle* 4 y el 5, generándose finalmente la angiostatina (Stathakis P. et al., 1997). El plasminógeno humano y el de conejo existen en circulación en dos formas con diferente grado de glicosilación, que difieren sólo en la presencia o ausencia de un N-glicano en la Asn 288. Hatton et al. demostraron que se generarían dos tipos de moléculas de angiostatina con diferente glicosilación, y con diferente actividad antiangiogénica en un modelo en conejo. Ellos consideran también que podría ocurrir lo mismo para la angiostatina humana (Hatton M.W. et al., 2001).

La angiostatina funciona como un potente inhibidor de la angiogénesis *in vivo*. Ha mostrado ser capaz de inhibir el crecimiento de tumores primarios y el desarrollo de metástasis en diferentes modelos experimentales al administrarse exógenamente (Holgrem L., et al., 1995; O'Reilly M.S. et al., 1996; O'Reilly M.S. et al., 1997a; Wu Z. et al., 1997; Sim B.K. et al., 1997; Lannutti B.J. et al., 1997; Yokoyama Y. et al., 2000). Este factor endógeno actuaría como uno de los tantos inhibidores que podría explicar por qué la extirpación quirúrgica del tumor primario a veces resulta en un crecimiento metastásico acelerado. Se ha demostrado recientemente en un modelo de LLC que el tumor primario estaría generando angiostatina y que la presencia de esta molécula no se puede detectar en sangre luego de cinco días de la extirpación del tumor (Li T.S. et al. 2001).

También se ha caracterizado la actividad antiangiogénica *in vitro* de los diferentes *kringles* de la angiostatina. Los *kringles* 1 a 3 poseen una fuerte actividad antiproliferativa, en contraste con el *kringle* 4 que es inefectivo para inhibir la proliferación de las células endoteliales. En cambio, el *kringle* 5 del plasminógeno parecería ser más potente que la angiostatina para inhibir la angiogénesis *in vitro* (Cao Y. et al., 1996; Cao Y. et al., 1997).

No se ha descubierto un receptor específico para esta molécula, pero se han encontrado varias moléculas a las cuales la angiostatina se asociaría. El grupo de T.L. Moser descubrió que la angiostatina se uniría a la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima ATPasa sobre la superficie de las células endoteliales humanas HUVEC (Moser T.L. et al., 1999), suprimiendo las actividades ATP sintasa y ATPasa de esta enzima, e inhibiendo de esta manera la angiogénesis (Moser T.L. et al., 2001). En cambio, el grupo de T. Tarui descubrió que la angiostatina se uniría a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en las células endoteliales de arteria bovina, BAE, y esto podría mediar su acción antiangiogénica (Tarui T. et al., 2001). Por su parte, B. Troyanovsky y colaboradores hallaron una molécula que denominaron angiomotina, cuya expresión provocaría la migración de las células endoteliales. La angiostatina se pegaría a la angiomotina interfiriendo con su acción angiogénica al inhibir la motilidad endotelial (Troyanovsky B. et al., 2001).

Aunque se ha encontrado angiostatina en fluido espinal de pacientes con tumores cerebrales (Westphal J.R. et al., 1999) y recientemente en orina (Cao Y. et al., 2000) y en suero de pacientes con cáncer (Lijnen H.R. et al., 2001), se la ha detectado también en el citoplasma celular mediante la técnica de inmunohistoquímica (Migita T., et al., 2001). Llama la atención este hallazgo por cuanto, como ya se explicó, estudios *in vitro* demostraron la generación de angiostatina a partir del plasminógeno, el cual se halla en circulación.

La angiostatina se halla en fase I en ensayos clínicos para tumores sólidos. Actualmente, se está comenzando con los primeros estudios combinado esta molécula y terapia radiante (<http://www.entremed.com>).

## **Endostatina**

Otra molécula angiostática que se está investigando intensamente es la endostatina. Es un fragmento proteolítico del colágeno tipo XVIII de 20 kDa y es un potente inhibidor de la neovascularización (O'Reilly M.S. et al., 1997b). Se la aisló del medio condicionado proveniente del hemangioendotelioma murino EOMA, y también se la detectó en sueros humanos (Ständker L. et al., 1997). La endostatina recombinante murina inhibe la proliferación de las células endoteliales indirectamente a través de la inducción de su apoptosis (Dhanabal M. et al., 1999). También se ha visto que la administración *in vivo* de endostatina produjo la regresión tumoral total en diferentes modelos experimentales (O'Reilly M.S. et al., 1997b; Boehm T. et al., 1997). Se demostró que la endostatina utilizada en la misma concentración usada en los ensayos *in vivo* con animales disminuye la expresión de genes relacionados con el crecimiento de las células endoteliales, por ejemplo, genes de respuesta temprana, genes que regulan el ciclo celular, genes inhibidores de la apoptosis, etc. (Shichiri M. et al., 2001). También se ha visto que su administración combinada con angiostatina tuvo un efecto sinérgico en un modelo de carcinoma de ovario (Yokoyama Y. et al., 2000). La endostatina se halla en fase I, en ensayos clínicos para tumores sólidos (<http://www.clinicaltrials.nci.nih.gov>).

En la siguiente tabla se muestran otros factores inhibidores de la angiogénesis (Tabla 3).

**Tabla 3**  
**Otros factores angiostáticos**

<b>Factor</b>	<b>Función</b>
Angiostatina	Inhibe la proliferación de las células endoteliales <i>in vitro</i> y la angiogénesis <i>in vivo</i> .
<b>Endostatina</b>	<b>Inhibe la angiogénesis <i>in vivo</i>.</b>
Trombospondina (TSP-1)	Inhibe la angiogénesis <i>in vivo</i> . Inhibe la proliferación de las células endoteliales <i>in vitro</i> .
<b>Interferón-<math>\beta</math>, <math>\gamma</math>, <math>\mu</math>. (IFN-<math>\beta</math>, <math>\gamma</math>, <math>\mu</math>).</b>	<b>Inhiben la proliferación de las células endoteliales.</b>
Interferón- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )	Inhiben la proliferación y migración. Se usa en tratamientos de hemangiomas.
<b>Interleuquina 12 (IL-12)</b>	<b>Induce la producción de interferón <math>\gamma</math>.</b>
Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)	Inhiben la proliferación y migración de las células endoteliales. Inhiben las colagenasas.
<b>Factor de crecimiento transformante (TGF-<math>\beta</math>1)</b>	<b>Bloquea la movilidad de las células endoteliales.</b>
Factor de plaquetas-4	Inhibe la angiogénesis <i>in vivo</i> . Inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales <i>in vitro</i> . Inhibe las colagenasas. Disminuye el receptor de FGF-a.
<b>Factor de necrosis tumoral (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>Inhibe la proliferación <i>in vitro</i>.</b>
Proteína ácida secretada rica en cisteína (SPARC)	Inhibe la proliferación inducida por bFGF, <i>in vitro</i> .
<b>2-metoxiestradiol</b>	<b>Inhibe la migración. Inhibe al uPA.</b>
Fragmento de 16 kDa de la prolactina	Inhibe la proliferación de las células endoteliales.

Extraído de las mismas revisiones que la tabla anterior.

## Terapia antiangiogénica

El objetivo de una estrategia antiangiogénica no apunta a matar a la célula tumoral sino a evitar el crecimiento del tumor limitando su abastecimiento sanguíneo mediante la inhibición del crecimiento de las células endoteliales. Una de las ventajas más importantes de esta terapia es la gran estabilidad genética de las células endoteliales, en las que, hasta el momento no se ha observado resistencia a drogas (Kerbel R.S., 1991; Boehm T. et al., 1997). Otra ventaja es que las células endoteliales son más accesibles que las tumorales a los agentes enviados por el torrente sanguíneo. Por último, se vio que los endotelios de diferentes tipos tumorales mostraron fenotipos similares, pudiendo ser tratados con un único reactivo (Griffioen A.W. et al., 1998). Sin embargo, hay que considerar que una terapia antiangiogénica podría interferir con procesos fisiológicos donde se necesita neovascularización, por ejemplo, la cicatrización de una herida, la ovulación y el desarrollo del feto.

Existen varias estrategias para interferir en la formación del vaso sanguíneo. La primera es inhibir directamente la proliferación de las células endoteliales usando, por ejemplo, moléculas antiangiogénicas endógenas como la angiostatina y la endostatina. La administración *in vivo* de estos factores produjo la regresión de tumores sólidos en ratones, dejando al tumor en un estado de latencia (O'Reilly M.S. et al., 1996; O'Reilly M.S. et al., 1997b). Otra posibilidad es el uso de agentes como el AGM-1470 (TNP-470), un análogo semisintético de la fumagilina (antibiótico derivado del hongo *Aspergillus fumigatus*). Este agente se halla en fase clínica II para el Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA, y evita que las células endoteliales entren en la fase G1 del ciclo celular, resultando así en una disminución de la

proliferación de las mismas. También se demostró que inhibe la angiogenesis *in vivo* (Klauber N., et al., 1997).

Otra droga que se está utilizando por su actividad antiangiogénica es el IFN- $\alpha$ . Se usa con resultados muy efectivos para el tratamiento de hemangiomas en niños (lesiones vasculares benignas caracterizadas por una proliferación de los vasos sanguíneos) y está en fase clínica para el tratamiento del cáncer (<http://www.cancertrials.nci.nih.gov>).

Otra manera de inhibir la angiogénesis es interfiriendo con la asociación de los factores angiogénicos a sus receptores. Como el VEGF es el inductor más específico y potente de la angiogénesis, este factor y su receptor son los candidatos más apropiados para esta terapia. Se demostró que el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra VEGF y contra bFGF inhibe el crecimiento tumoral en ratones (Kim K.J. et al., 1993; Hori A. et al., 1991). El estudio de estos anticuerpos con fines terapéuticos para tumores sólidos se halla en fase II (<http://www.cancertrials.nci.nih.gov>). La función del VEGF también puede ser bloqueada con receptores solubles para este factor, con anticuerpos dirigidos contra su receptor o con la técnica de antisentido, evitando así su expresión. El uso de VEGF conjugado con la toxina diftérica se está estudiando en fase II en ensayos clínicos. Cuando el factor asociado a la toxina se une a su receptor produciría un daño en la vasculatura limitando así el crecimiento del tumor (Griffioen A.W. et al., 1998).

La tercera manera de inhibir la angiogénesis es evitar las interacciones de la célula endotelial con la matriz extracelular. La integrina  $\alpha_v\beta_3$  es una proteína de membrana de la célula endotelial y es el receptor para la vitronectina, un componente de la matriz extracelular. La utilización de péptidos antagonistas (Brooks P.C et al., 1994) o anticuerpos anti-integrinas llevaría a la apoptosis de la célula endotelial. Los anticuerpos anti-integrina

se están evaluando en ensayos clínicos fase II (<http://www.cancertrials.nci.nih.gov>).

Dentro de las terapias antiangiogénicas también se encuentra el uso de inhibidores de MMPs. Como ya se explicó anteriormente, existe una gran similitud entre el proceso de invasión tumoral y el de angiogénesis. Las metaloproteasas pueden ser secretadas por la célula endotelial y/o tumoral y se encargan de degradar la matriz extracelular facilitando la migración de las mismas, por ende, están involucradas en el proceso de invasión y en la cascada angiogénica. El uso de inhibidores de MMPs representa un atractivo enfoque terapéutico para atacar ambos procesos a la vez. El Batimastat (BB-94) y el Marimastat (BB-2516) son inhibidores sintéticos de bajo peso molecular de las MMPs. Tienen un esqueleto simil colágeno que le facilita el pegado al sitio activo de las MMPs y posee una estructura hidroxamato que quela el zinc del mismo (Wojtowicz-Praga S.M. et al., 1997). Inhiben el crecimiento de un tumor y la formación de metástasis *in vivo*. Su estudio se halla en fase clínica III para diferentes tipos de cánceres (Tabla 4). A pesar de ello, los resultados obtenidos con marimastat, AG3340 y BAY-12-9566, no fueron los esperados en tumores avanzados, al no mostrar ser clínicamente eficaces. El uso de estos inhibidores se recomendaría para tumores que se encuentran en estadios tempranos, donde se necesitan MMPs para que ocurra la progresión tumoral, y también en combinación con quimioterapia (Zucker S. et al., 2000).

Como puede verse en la Tabla 4, existen otros inhibidores angiogénicos que se encuentran actualmente en Ensayos Clínicos.

Tabla D  
Inhibidores angiogénicos en Ensayos Clínicos

<b>Droga</b>	<b>Fase Clínica</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>
Batimastat (BB-49)	III	Inhibidor sintético de las MMPs
Marimastat (BB-2516)	III para tumores de células pequeñas, pulmón y mama.	Inhibidor sintético de las MMPs
AG3340	III	Inhibidor sintético de las MMPs
Neovastat	III para tumores de células renales y células no pequeñas	Inhibidor natural de las MMPs
TNP-470 (AGM-1470)	II	Inhibe la proliferación de las células endoteliales
Anticuerpo anti VEGF	I y II para diferentes tipos de tumores	Anticuerpo monoclonal contra VEGF
SU5416	I, II y III para diferentes tipos de tumores	Bloquea el receptor de VEGF
CMC-101/ZDO-101	II	Toxina bacteriana que interactúa con receptores en el endotelio proliferante (tumoral) e induce inflamación del endotelio.
Factor plaquetario 4 (PF4)	I	Inhibe la proliferación de las células endoteliales
IL-12	I y II para Sarcoma de Kaposi	Aumenta la producción de IFN- $\gamma$ e IL-10.
Combretastatina	II	Induce la apoptosis de la célula endotelial
Anticuerpo anti-integrina $\alpha_v\beta_3$	II	Induce la apoptosis de la célula endotelial
Thalidomida	I, II y III para diferentes tipos de tumores.	Inhibe la angiogénesis. Antagonista del TNF- $\alpha$ .
Suramina	II	Interfiere con la asociación de los factores de crecimiento a sus receptores. Inhibe la angiogenesis tumoral
IFN- $\alpha$	II y III	Inhibe la producción de VEGF y bFGF
Endostatina	I para tumores sólidos	Inhibe la proliferación de las células endoteliales

(Gradishar W.J., 1997; Malonne H. et al., 1999; Zucker S. et al., 2000; <http://www.clinicaltrials.nci.nih.gov>, <http://www.entremed.com>)



Otra estrategia posible es la terapia génica, por ejemplo la transferencia de genes que codifiquen para proteínas antiangiogénicas. Se transfectó la línea de melanoma B16F10 con el cDNA que codifica para la región kringle 1-4 de la angiostatina y se vio una inhibición del crecimiento del tumor *in vivo* pero no *in vitro* (Ambs S. et al., 1999). Otra manera realizada por el grupo de M. Hampl fue la administración intraperitoneal de vectores adenovirales codificando para diferentes proteínas antiangiogénicas, tales como angiostatina, endostatina y factor plaquetario-4, observándose que disminuía el tamaño tumoral (o la formación de ascitis), su vasculatura y se prolongaba la supervivencia del huésped (Hampl M. et al., 2001). También se transfectó el melanoma B16-BL6 con la metaloelastasa macrófaga de ratón y esto logró una disminución del crecimiento tumoral ya que aumentó la producción de angiostatina mediada por esta enzima (Gorrin-Rivas M.J. et al., 2000). La ventaja de esta estrategia es que la transferencia de genes, y por ende la producción de la proteína antiangiogénica, sería un evento localizado, logrando altas concentraciones en el sitio de interés y evitando así un efecto sistémico. Otra ventaja de este tipo de estrategia sería el posible uso de promotores inducibles con el objeto de regular la producción de estos factores según el estado clínico del paciente. Otra posibilidad sería bloquear la expresión de un gen que codifica para una proteína angiogénica mediante la técnica de antisentido. Esto se hizo para el gen de VEGF en un modelo de glioblastoma en ratones *nude*, resultando en una reducida tumorigenicidad (Kong H.L. et al., 1998).

Muchas de las estrategias postuladas podrían ser de utilidad en corto plazo, ya sea administradas individualmente o asociadas a otros tratamientos clásicos. De hecho, en estudios preclínicos se ha visto que la terapia

antiangiogénica combinada con agentes citotóxicos ha sido más efectiva que cada agente por separado (Kakeji Y. et al, 1997).

La terapia antiangiogénica para el tratamiento del cáncer sería una terapia crónica o de por vida, los agentes antiangiogénicos deberían ser administrados continuamente para así mantener al tumor y a las metástasis en un estado de quiescencia.

El estudio de los mecanismos que están involucrados en la angiogénesis tumoral brindaría una herramienta importante para desarrollar nuevas drogas antiangiogénicas, y así lograr la regresión de tumores establecidos e inducir un estado de latencia.

Cabe destacar que las aplicaciones clínicas de la investigación en este tema no se limitan solamente al tratamiento del cáncer. Otras enfermedades como por ejemplo la artritis, psoriasis, retinopatías diabéticas, etc., podrían potencialmente ser tratadas con inhibidores de la angiogénesis. También se podrían usar estimuladores de la misma para tratar úlceras gástricas, infartos de miocardio, isquemias y otros desórdenes (Patterson C. et al., 1999). Por lo tanto, la angiogénesis es un tópico muy importante para seguir investigando.

# *Objetivos e Hipótesis*

## **Objetivos del trabajo**

El objetivo de esta tesis fue investigar el rol de diferentes factores reguladores de la angiogénesis en la inducción del fenómeno de RC. Para ello se estudió la capacidad de cinco líneas celulares cancerosas para generar RC *in vivo*, para luego evaluar en ellas la producción *in vitro* de factores angiogénicos y antiangiogénicos. A su vez, se analizaron estos factores en los sueros de los ratones portadores de los tumores. En base a la bibliografía actual, la investigación propuesta es la primera en la cual se estudiaron factores angiogénicos y angiostáticos en forma conjunta con el objeto de explicar los mecanismos de acción responsables de la resistencia antitumoral concomitante, y por ende, de control de las metástasis.

## **Hipótesis de trabajo**

Esperamos hallar una asociación entre la capacidad de las líneas tumorales para generar el fenómeno de RC *in vivo* y un aumento de factores angiostáticos y/o una disminución de factores angiogénicos en los sueros de los ratones portadores del tumor *in vivo* y/o en los medios condicionados producidos por estas líneas celulares *in vitro*.

En las muestras humanas esperamos, también, hallar una asociación entre un mejor pronóstico y la disminución de factores angiogénicos y/o un aumento de la producción de factores angiostáticos.

# *Materiales y Métodos*

# Materiales y Métodos

## Cultivos celulares

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de tumores de pulmón humano: Calu-6 y H460, ambas obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection), y la línea M3MC (Lucero Gritti, M.F. et al., 1994) derivada del adenocarcinoma mamario murino M3 surgido espontáneamente en el Instituto de Oncología Angel Roffo en ratones BALB/c (Colombo L.L. et al., 1980). También se usaron cultivos primarios de los adenocarcinomas mamarios murinos M234m y M234p. El tumor M234p surgió espontáneamente en un ratón hembra BALB/c del Bioterio del Instituto de Genética Experimental, Universidad Nacional de Rosario, mientras que M234m es una variante del anterior a partir del pasaje subcutáneo de sus metástasis.

Los cultivos primarios de los tumores M234m y M234p se realizaron por el método de explantos. Ello consiste en quitar el tumor del animal portador en condiciones de esterilidad, cortarlo en fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>, luego ubicarlos en placas de cultivo celular donde se realizaron previamente pequeños cortes en el plástico. Entonces el tumor se adhiere a esta zona y comienzan a crecer células a partir de él.

La línea Calu-6 y el cultivo primario M234m se crecieron con medio MEM EAGLE (Sigma, EEUU), y las líneas H460, M3MC y el cultivo de M234p con RPMI 1640 (Sigma, EEUU).

Se utilizó también la línea RV-EC, derivada de endotelio de cerebro de rata (Diglio C.A. et al., 1993). Esta línea fue mantenida en DMEM low Glucosa (Gibco, EEUU).

Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino, SFB, (Gen SA, Buenos Aires, Argentina) y antibiótico-antimicótico (Gibco, EEUU), salvo el cultivo de M234m que utilizó 20% de SFB. Todas las líneas fueron incubadas en estufa gaseada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

## **Animales**

Dado que el tumor M3MC se originó en el Instituto de Oncología Angel Roffo y los tumores M234m y M234p en el Instituto de Genética de la Universidad de Rosario, decidimos usar para hacer el ensayo de RC los ratones provenientes de cada instituto para cada tumor. Se ambos casos, se utilizaron ratones BALB/c hembras de dos meses de edad y se mantuvieron en ambiente controlado a 23°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs, alimento y agua *ad libitum*.

Se utilizaron también ratones atímicos *nude* N:NIH(S) machos provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica y la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata. Estos fueron mantenidos en estrictas condiciones de asepsia con jaulas: cajas, alimento y agua estériles. Los animales se alojaron en cabinas con flujo de aire estéril y ambiente controlado en cuanto a temperatura constante de 23°C y ciclos de luz-oscuridad de 12 hs. (Flufranace, Wissous, France).

## **Preparación de medios condicionados**

Se prepararon medios condicionados (MC) de todas las líneas analizadas de la siguiente manera: cuando el cultivo celular llegó al 70-80 %

de confluencia se retiró el medio de crecimiento y se lavó dos veces con PBS (solución salina) para retirar el SFB, y se colocó su respectivo medio de cultivo sin el agregado de suero. Luego de 24-48 hrs, se recolectó este medio y se centrifugó para eliminar posibles células despegadas. Los MCs de las diferentes líneas y cultivos fueron normalizados a igual número de células para luego utilizarlos en los experimentos.

Para los tumores M234m y M234p se prepararon los MCs de cultivos primarios como se explicó anteriormente sin haber realizado ningún pasaje, con el objeto de obtener condiciones similares a las del tumor que le dio origen.

### **Ensayo de proliferación de las células endoteliales RV-EC**

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células RV-EC en 50  $\mu$ l medio de cultivo suplementado con 2% de SFB en placas de 96 pocillos. A las dos horas, se colocaron diferentes volúmenes de los MCs o de los sueros a ensayar (50, 25, 12.5, 6.25, 3.1 y 1.5  $\mu$ l) y se completó con medio de cultivo sin SFB hasta 100  $\mu$ l, consiguiendo así diluciones de los MCs o sueros de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64, respectivamente para hacer una curva dosis respuesta (Bonfil R.D. et al., 1998b). Al grupo control se le colocó 50  $\mu$ l de medio sin SFB. A las 48 hrs se realizó el ensayo colorimétrico de MTT (Sigma, EEUU), que permite cuantificar viabilidad celular. Este método utiliza la sal de tetrazolio que al estar disuelta posee un color amarillo. Las enzimas dehidrogenasas mitocondriales clivan el anillo de esta sal y la convierten en formazan, un compuesto azulado insoluble en agua cuya absorbancia a 570 nm es directamente proporcional a su concentración. Brevemente, se agregan 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml en PBS) por cada 100  $\mu$ l de medio en cada pocillo y se incuban las placas por 3-4 hr a 37°C en estufa gaseada. Luego de la



incubación el colorante que está contenido dentro de las células se debe solubilizar, entonces se retira el medio y se agrega alcohol 96°. Luego de 15-30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lee la absorbancia en un lector de ELISA a 570 nm. Los porcentajes de inhibición o estimulación de la proliferación se calcularon con respecto al control, dividiendo el valor de absorbancia obtenida para cada muestra por la media de la absorbancia del grupo control y multiplicando luego por 100 (Gude R.P. et al., 1999).

## **Ensayos de Resistencia Concomitante**

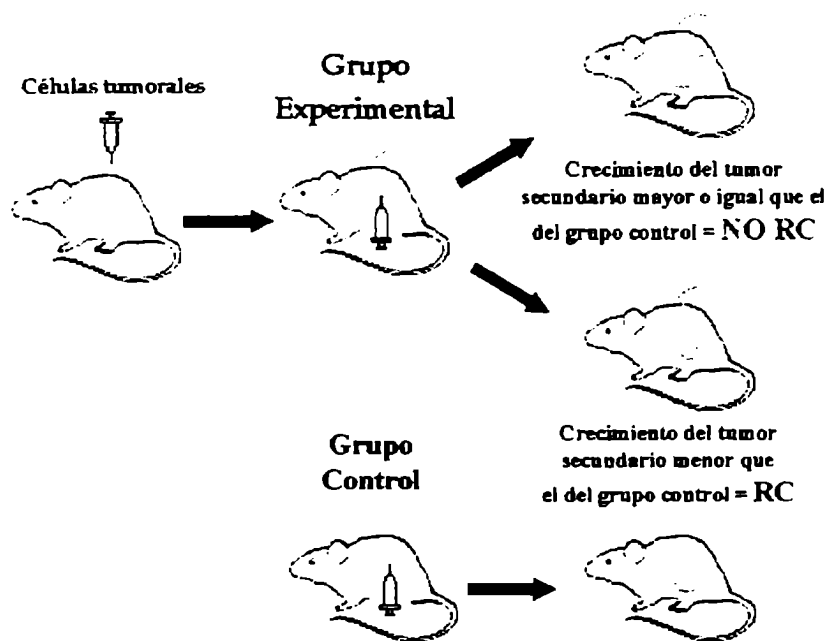
### **Ensayo de Resistencia Antitumoral Concomitante**

Se realizó el ensayo de Resistencia Concomitante Antitumoral (RC) de la siguiente manera, se inyectaron 6 ratones *nude* N:NIH con  $2 \times 10^6$  células de las líneas humanas Calu-6 o H460 subcutáneamente en el flanco derecho. En el caso de las líneas murinas se utilizaron ratones hembras BALB/c inoculándose en ese flanco  $2 \times 10^6$  células de la línea M3MC o un fragmento de alrededor de  $1 \text{ mm}^3$  de los adenocarcinomas M234m y M234p (aproximadamente  $10^6$  células) por trocar. Se midió periódicamente el crecimiento tumoral a través de calibre calculando el volumen tumoral según el método de Attia y Weiss, de la siguiente manera:  $0.4 \cdot a \cdot b^2$ , siendo  $a$  y  $b$  el diámetro mayor y menor, respectivamente (Attia and Weiss, 1966). Cuando el volumen tumoral alcanzó alrededor de  $600 \text{ mm}^3$ , se inyectó el mismo número de células que se había inoculado en cada caso en el flanco derecho, pero ahora en el flanco contralateral. En ese momento, el grupo control (6 ratones) recibió el mismo número de células tumorales sólo en el flanco contralateral izquierdo. La RC se hizo evidente como un crecimiento del tumor secundario menor, nulo o retrasado, respecto del grupo control (Ruggiero R.A. et al., 1985; Meiss R.P. et al., 1986; Bonfil R.D., et al., 1988;

Ruggiero R.A., et al., 1990) y fue evaluada como la inhibición del volumen tumoral (IVT) usando la siguiente fórmula:  $IVT(\%) = \{1 - (VT/VC)\} \cdot 100$ , donde  $VT$  es la mediana del volumen del tumor surgido a partir del implante secundario en los ratones con tumor primario y  $VC$  es la mediana del volumen del único tumor del grupo control (Figura 5).

Para el tumor M234p se realizó además un ensayo como se explicó anteriormente pero en ratones *nude*.

**Figura 5**  
**Modelo de Resistencia Concomitante Antitumoral**



## **Resistencia antimetastásica concomitante**

Con el objeto de evaluar la capacidad inhibitoria de cada tumor primario sobre metástasis pulmonares experimentales, el ensayo se llevó a cabo de igual manera que el anterior pero con la diferencia de que el inóculo secundario de  $10^6$  células tumorales se realizó en forma intravenosa (i.v.). El grupo control (6 ratones) recibió sólo este inóculo i.v. La RC fue evaluada como la inhibición de la incidencia metastásica (I.I.M.) usando la siguiente fórmula:  $I.I.M.(%) = \{1 - (M.E./M.C.)\} \cdot 100$ , donde *M.E* es la mediana del número de metástasis pulmonares en el grupo experimental y *M.C.* es la mediana del número de metástasis en el grupo control.

Para el tumor M234p también se realizó este ensayo en ratones *nude*.

## **Obtención de los sueros**

### **Obtención de los sueros de animales**

Los animales portadores de tumor, así como los controles, fueron anestesiados con éter etílico, sangrándose a blanco con una pipeta pasteur por el seno retroorbital del ojo. La sangre extraída se incubó a 37°C por una hora para permitir la formación del coágulo y luego fue centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y si era necesario eliminar posibles células sanguíneas en el suero se volvía a centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos. Los sueros obtenidos se congelaron a -70°C hasta su uso. Para el ensayo de proliferación, los sueros fueron decomplementados a 56°C por media hora.

## **Obtención de los sueros de pacientes con cáncer**

Se obtuvieron 30 sueros de pacientes con cáncer de mama y 7 sueros de mujeres sanas del Hospital Municipal de Oncología María Curie, gracias a la colaboración de la Dra. Claudia Waldner. Los sueros fueron obtenidos bajo consentimiento de los pacientes y fueron conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las historias clínicas fueron analizadas siguiendo las indicaciones del "Cancer Staging Manual" (American Joint Committee on Cancer, Cancer Staging Manual, 1997) y divididas en diferentes grupos para su posterior análisis: axila positiva /negativa, estadios (I, II, III y IV), tamaño tumoral considerando su mayor tamaño (<2 cm, entre 2 y 5 cm y >5 cm), receptor de estrógeno positivo / negativo y receptor de progesterona positivo / negativo.

Los sueros fueron utilizados para detectar la presencia de VEGF, bFGF, angiostatina y la producción de metaloproteinasas, como se explicará a continuación.

## **Preparación de la fracción euglobina de los sueros de pacientes para concentrar MMPs.**

La fracción euglobina se logra por precipitación con ácido acético de las proteínas del plasma. Brevemente, se mezcló 0.1 ml de suero o plasma y se agregaron 0.9 ml de agua bidestilada fría, luego se acidificó con 40  $\mu\text{l}$  de ácido acético 1% (v/v) a pH 5.5. La mezcla se incubó entre 30 y 60 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El pellet así obtenido se disolvió en 1 ml de PBS pH 7.4 (Farías E. et al., 2000). Esta precipitación

concentra las proteínas presentes en el plasma, incluyendo a las MMPs que se analizaron por zimografía como se explica más adelante.

### **Purificación de angiostatina a partir de sueros de animales y pacientes**

La angiostatina y la plasmina son fragmentos proteolíticos derivados del plasminógeno, y poseen una zona en común que son los *kringles* 1-4. Estos poseen un sitio de asociación al aminoácido lisina, y son responsables de pegar el plasminógeno a la fibrina durante el proceso de coagulación sanguínea (Wiman, B. et al, 1978). Para purificar estas tres proteínas, con especial interés focalizado en la angiostatina, se utilizó lisina sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU). Este reactivo consta de un sustrato, la sefarosa 4B, que tiene acoplado el aminoácido L-lisina vía su grupo  $\alpha$ -amino, dejando los grupos  $\alpha$ -carboxil y  $\epsilon$ -amino libres para reaccionar. La angiostatina, la plasmina y el plasminógeno se pegarían a través de su zona de afinidad por la lisina, a los  $\epsilon$ -amino libres. Para despegarlos de allí se usa el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico que tiene sitios  $\epsilon$ -amino libres que desplazaría a estas tres moléculas compitiendo por la asociación a la lisina. Brevemente, se usaron 14 mg de Lisina-sefarosa, se hidrató y lavó con TBS cuatro veces y se incubó con 200  $\mu$ l de la muestra a purificar por 1.5 hora a temperatura ambiente en rollerbank. Se centrifugó, y el pellet resultante se lavó 3 veces con PBS. Luego se incubó el pellet 1 hr. con 80  $\mu$ l de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 0.2 M (Sigma, EEUU), con agitación suave. Se centrifugó y el sobrenadante resultante se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso (Westphal J.R. et al., 2000b).

Se purificaron los sueros de ratones portadores de los tumores Calu-6, M3MC, H460, M234m y M234p y sueros de animales normales BALB/c y *nude* (sin tumor). Como control positivo de la purificación se utilizó

angiostatina recombinante humana que se agregó a un suero de un ratón normal, el cual se purificó de igual manera que los sueros de los ratones portadores. También se purificaron de la misma manera sueros de pacientes con cáncer de mama e individuos sanos. Se evaluó la producción de angiostatina mediante la técnica de Western blot como se describirá a continuación.

### **Generación de angiostatina *in vitro***

Se prepararon medios condicionados de las líneas celulares y de los cultivos primarios como se explicó anteriormente. Se incubaron 100  $\mu$ l de cada MC con 2,8  $\mu$ g de plasminógeno humano (Sigma, EEUU) por 48 hrs a 37°C, y luego se evaluó la producción de angiostatina mediante la técnica de Western Blot, explicada a continuación (Gately S. et al., 1996). Los controles negativos consistieron en medio de cultivo incubado con plasminógeno en las mismas condiciones.

### **Estudio de la generación de angiostatina con diferentes inhibidores de proteasas**

Se estudió la generación de angiostatina en los MC como se explicó anteriormente, pero incubándolos antes de exponerlos al plasminógeno con diferentes inhibidores proteásicos durante una hora a 37°C. Los inhibidores y las concentraciones utilizados fueron aprotinina 100  $\mu$ M (Sigma, EEUU), leupeptina 5  $\mu$ M (Sigma, EEUU), 100  $\mu$ g/ml SBTI (inhibidor de tripsina del poroto de soja) (Sigma, EEUU), EDTA 5 mM (Sigma, EEUU). Se utilizaron además dos inhibidores fisiológicos de las MMPs: TIMP-1 y TIMP-2 (0.01, 0.1, 1  $\mu$ g/ml) (gentilmente provistos por el Dr. R. Fridman, Wayne State

University, EEUU) y un inhibidor fisiológico de la plasmina, la  $\alpha$ 2-antiplasmina (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ gr/ml) (Sigma, EEUU). Se usaron también anticuerpos neutralizantes anti uPA (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ gr/ml) (American Diagnostica, Bethesda, MD). Transcurrida la preincubación con los inhibidores, e agregó el plasminógeno, se incubó por 48 hrs a 37°C y se detectó la producción de angioestatina mediante la técnica de Western Blot como se describe a continuación.

### **Detección de angioestatina mediante la técnica de Western Blot**

Las muestras de los MCs y sueros se corrieron en una electroforesis discontinua: un gel concentrador de poliacrilamida al 4% y luego un gel separador al 12% conteniendo SDS (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras (Laemmli U.K., 1970). Brevemente, se sembraron 50  $\mu$ l de muestra diluida en buffer muestra (concentración final: 2% SDS, 10% Glicerol, 0.06% azul de Bromophenol, Tris-HCl 10 mM) y se realizó la corrida utilizando un buffer Tris-HCl 25 mM, glicina 0.2 M, 0.1% SDS. Luego de realizada la corrida, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu$ m (Sigma, EEUU), usando buffer de transferencia (Tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM, 20% metanol, pH 8.8) por 16 hrs. a 40 V y 4°C. La asociación a sitios inespecíficos de la membrana se bloqueó con una solución 1% de albúmina bovina sérica (Sigma, EEUU) en TBS (NaCl 139 mM, KCl 2.6 mM, Tris HCl 25 mM, pH 7.4) por 1 hr a temperatura ambiente, con agitación horizontal. Se incubó por 1 hr a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-*kringles* 1-3 del plasminógeno (Enzyme Research Laboratories Inc, Indiana, EEUU,) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Luego de 4 lavados de 5 minutos c/u con Tween 0.05% en TBS y 3 lavados con TBS, se incubó durante

30 minutos con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, diluido 1:10.000 en solución de bloqueo (Sigma, EEUU). Se lavó procediendo como se explicó anteriormente, y se reveló con el sustrato para la enzima 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato/nitroblue tetrazolio, BCIP/NBT, (Sigma, EEUU). La reacción se detuvo con agua destilada. Se utilizó como control positivo la angiostatina pura obtenida comercialmente (Angiogenesis Research Industries Inc, Chicago, EEUU) y se usó un standard de peso molecular preteñido (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU), sobre la base del cual se calcularon los pesos moleculares de las bandas inmunodetectadas utilizando el programa SigmaGel™ (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, EEUU).

Para algunos casos donde se necesitaba mayor sensibilidad en el método, por ejemplo cuando se purificó angiostatina de sueros de ratones portadores y pacientes, se procedió de igual manera salvo que se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma, EEUU) en una concentración 1:80.000 y se reveló por el método de Enhance ChemiLuminiscence o E.C.L., (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) que es muchísimo más sensible que el método anterior. Este método se basa en la reacción del sistema peroxidasa/peróxido de hidrógeno que cataliza la oxidación del reactivo luminol (una diacilhidrazida cíclica) en condiciones alcalinas. Luego de la oxidación, el luminol se excita y al decaer emite luz que al impactar en un film fotográfico (Kodak, EEUU) da una señal. Se deja en contacto el film y la membrana hasta 15 minutos y luego se revela con revelador y fijador fotográfico (Kodak, EEUU).

Cuando se purificaron con lisina sefarosa los sueros de ratones portadores de tumores, se utilizó para detectar la angiostatina murina el anticuerpo monoclonal anti *kringles* 1-3 humano mencionado anteriormente, así como un anticuerpo policlonal hecho en conejo desarrollado contra el



residuo aminoacídico 1-19 de la angiostatina murina (Affinity Bioreagents, Inc., EEUU), que era más específico que el anterior para la detección de la misma. Este se usó en una concentración de 5 µg/ml en buffer de bloqueo, y se incubó por dos horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario usado en este caso fue un anti-IgG de conejo hecho en cabra, conjugado a la enzima peroxidasa 1:2000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EEUU), incubándose por una hora a temperatura ambiente. El método de detección fue E.C.L.

### **Análisis zimográfico**

#### **Análisis zimográfico para metaloproteasas**

Se analizó la presencia de metaloproteasas gelatinolíticas en los medios condicionados de las cinco líneas en estudio. Se corrieron 20 µl de las muestras en un sistema discontinuo: un gel concentrador 4% y un gel separador 7.5% conteniendo SDS (SDS-PAGE) (Gude R.P. et al, 1998). El gel separador estaba copolimerizado con gelatina (Sigma, EEUU), sustrato de las gelatinasas, a una concentración final 0.1% (p/v). Luego de concentrar las proteínas en el gel al 4% a 40 V, se corrieron a 110 V en el gel separador. Se hicieron dos lavados de media hora en un buffer que contenía 2.5 % (v/v) de Triton X-100 (Anedra, Argentina) con agitación horizontal para retirar el SDS (esto permite que las proteínas se renaturalicen). Le siguieron tres lavados con agitación horizontal por 5 minutos con un buffer Tris HCl 50 mM para eliminar el tritón y se incubó a 37°C por 48-72 hrs en un buffer que contenía las condiciones óptimas para que las metaloproteasas degradaran la gelatina (Tris-HCl 50 mM, ClNa 0.15 M y Cl<sub>2</sub>Ca 10 mM). Luego de la incubación el gel se tiñó con una solución conteniendo 0.25% (p/v) Coomassie Blue (Sigma, EEUU) que tiñe proteínas. La presencia de gelatinasas se evidenció como bandas de

degradación a la altura de su peso molecular específico. El gel teñido se escaneó utilizando el transiluminador UVP y el programa GRAB-it Annotating Grabber 2.55 (Ultra Violet Products Ltd, Cambridge, UK) y sus bandas fueron analizadas en el programa UN-SCAN-it Automated Digitizing System, versión 5.1 (Silk Scientific Corporation, USA). Ha sido reportado por varios autores que el tratamiento ácido o la adición de SDS a las muestras al correrse en un zimograma convierten a las formas latentes de las MMPs en sus respectivas formas activas sin el clivaje proteolítico de la secuencia N-terminal (Kato et al., 1992). Por este motivo en los zimogramas se pueden detectar las formas activa y zimógeno de las MMPs.

Para las muestras de sueros humanos purificados por el método de la fracción euglobina se incubó con el buffer de incubación por un tiempo menor, 16 hrs, se midieron los pixeles totales de degradación y se relativizaron respecto de un suero control sembrado en cada gel como control inter-ensayo.

### **Análisis zimográfico para activador de plasminógeno**

Para detectar la enzima activador de plasminógeno de tipo uroquinasa se corrieron los MCs en un gel discontinuo concentrador 4% y un gel separador 11% en condiciones no reductoras conteniendo SDS (SDS-PAGE), gelatina (Sigma, EEUU) a una concentración final de 0.1% (p/v) y 12 µg/ml plasminógeno que es el sustrato de uPA (Sigma, EEUU) (Heussen C. et al., 1980; Gude. R.P., et al., 2001). La enzima activador de plasminógeno actúa sobre su sustrato, el plasminógeno, generando así plasmina. A su vez esta enzima degrada la gelatina, dando bandas de lisis donde el uPA está presente. Los pasos siguientes son similares a la técnica de zimografía para MMPs salvo que el buffer de incubación específico para esta enzima que es Glicina 0.1M, pH

8.3 y el tiempo de incubación fue de 16 hrs a 37°C. Se realizó el control negativo de la técnica que consistió en correr las muestras en iguales condiciones salvo que el gel separador no contenía plasminógeno. En el caso de obtener bandas de lisis en este control, las mismas se deberían a una degradación inespecífica de la gelatina por los MCs, y no por acción de la enzima activador de plasminógeno que necesita de la presencia de plasminógeno para actuar. En dicho caso, las bandas obtenidas inespecíficamente serían descontadas al gel que contenía gelatina y plasminógeno. Se usó como control positivo de la técnica uroquinasa humana (Sigma, EEUU).

#### **Detección de los niveles de VEGF, bFGF y endostatina**

Se midieron VEGF y endostatina murinos en los MCs y en los sueros de los ratones sanos y portadores de tumores, y VEGF y bFGF humanos en los MC de las líneas humanas y sueros de pacientes. Se usaron los kits comerciales Quantikine™ (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EEUU) para la detección de VEGF y bFGF y Cytelisa™ (Cytimmune Sciences Inc, College Park, MD, EEUU) para la detección de endostatina. Ambos emplean el sistema de EIA (Enzimo Inmuno Ensayo), que consiste en capturar entre dos anticuerpos (uno pegado a la placa y el otro en solución) el reactivo a cuantificar. Brevemente, se sembraron las diferentes diluciones de cada factor provisto por el kit (endostatina, VEGF o bFGF) e igual volumen de las muestras biológicas a evaluar (algunas de ellas diluidas), en placas conteniendo adsorbidos los anticuerpos contra estos diferentes factores hechos en conejo. Se incubó por 2 ó 3 hrs a temperatura ambiente para permitir la unión del factor al anticuerpo. Luego de varios lavados, se agregaron los respectivos anticuerpos contra los diferentes factores conjugados con una enzima, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente,

luego de la cual se hicieron varios lavados para eliminar los anticuerpos unidos inespecíficamente. Finalmente, se agregó el sustrato de la enzima y se incubó a temperatura ambiente. La reacción se detuvo y se leyó en un lector de placas a 492 nm. Con los datos obtenidos se realizó una curva standard graficando absorbancias versus las diferentes concentraciones del factor, y se extrapoló de esta curva la cantidad de endostatina, VEGF o bFGF de las muestras incógnitas (Paciotti G. F. et al., 1999; Salven P. et al., 1998; Fujimoto K. et al., 1991). El kit para la detección de endostatina murina tiene una sensibilidad de 0.91 pg/ml, una variación intraensayo de  $\pm 7.1\%$  e interensayo de  $\pm 10.4\%$ . Para el VEGF murino la sensibilidad es de 3.0 pg/ml, con variaciones intra e inter-ensayos de  $\pm 5.73\%$ ,  $\pm 6.83\%$ , respectivamente. En cambio, para el VEGF humano estos valores son de 5 y 9 pg/ml (para MC y sueros, respectivamente), y variaciones intra e inter-ensayos de  $\pm 6\%$  y  $\pm 5\%$ , y para el bFGF humano 3.0 pg/ml y variaciones intra e inter ensayo de  $\pm 5.26\%$ ,  $\pm 8.03\%$ .

### **Análisis estadístico**

Se calcularon las medias y errores standard o medianas y rango de los valores obtenidos en los distintos ensayos, según correspondiera. Se utilizó el programa Graph Pad Instat versión 3.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego CA, USA). La significancia y las diferencias entre dos grupos independientes se determinó mediante el test de t-student o el de Mann-Whitney, dependiendo de que sigan una distribución normal o no respectivamente, y entre más de dos grupos por ANOVA (datos paramétricos) o Kruskal-Wallis (no paramétricos). Para comparar proporciones se utilizó la prueba de  $\chi^2$ . Se consideraron significativas aquellas diferencias con un valor de  $p < 0.05$ .

# Resultados

# Resultados

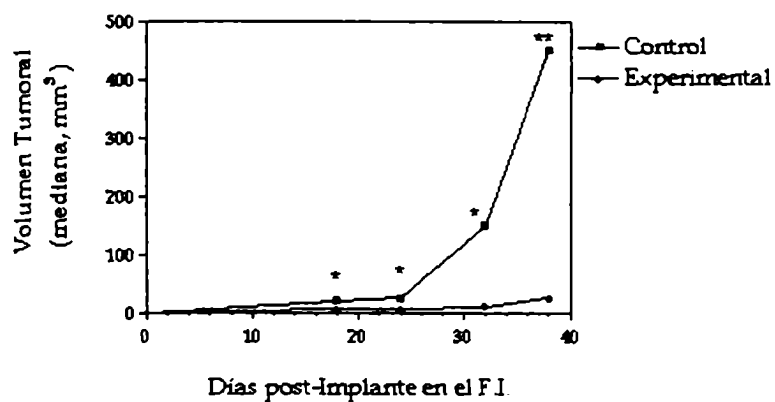
## Ensayo de Resistencia Concomitante

### Ensayo de Resistencia Antitumoral Concomitante

Se evaluó el fenómeno de RC en diferentes líneas celulares cancerosas y tumores espontáneos, como se explicó en Materiales y Métodos. En la Figura 6 se representa el crecimiento de los tumores generados por el inóculo secundario de las líneas de cáncer de pulmón humano en ratones *nude*. Si comparamos el crecimiento del inóculo secundario del grupo experimental (animales que portaban un tumor primario previo) con el único tumor del grupo control, podemos ver que la línea Calu-6 mostró una fuerte resistencia concomitante antitumoral (Figura 6A), mientras que H460 no (Figura 6B). Es decir, la presencia del tumor Calu-6 inhibió significativamente el crecimiento del implante secundario ( $p < 0.05$  entre el día 18 y 32,  $p < 0.001$  para el día 34 post inoculación en el F.I., Mann Whitney Test). Los resultados obtenidos con Calu-6 confirman los previamente reportados por nuestro grupo (Bonfil R.D. et al. 1998b). El porcentaje de inhibición del volumen tumoral (IVT) para Calu-6 varió desde 75.0 hasta 94.4 % entre los días 18 y 38 post implante del inóculo secundario.

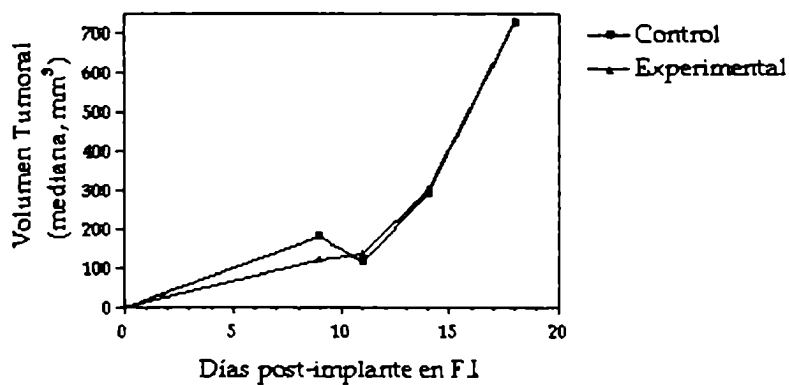
Figura 6

Figura 6A Resistencia Concomitante Antitumoral inducida por la línea de pulmón humana Calu-6



Test de Mann Whitney: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

Figura 6B Resistencia Concomitante Antitumoral inducida por la línea de cáncer de pulmón humana H460



Con respecto a los tumores mamarios murinos estudiados, M3MC y M234p mostraron una fuerte inhibición del crecimiento del implante secundario en ratones BALB/c que portaban un tumor primario. En ambos casos se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de los inóculos realizados en segundo término entre el grupo control y el experimental, desde el día 14 en adelante (Figuras 7A y 7B).

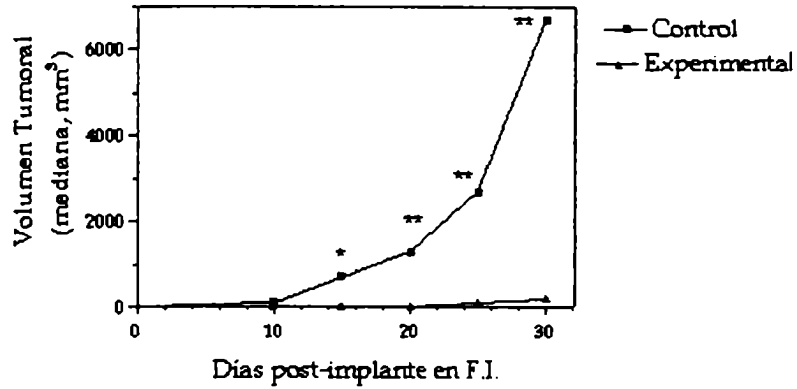
La IVT de M3MC varió desde 95.5 hasta 96.5% entre los días 15 y 30 después de la inoculación de implante secundario. En el tumor M234p, la IVT fue del 100 % desde el día 14 ya que la mediana del volumen tumoral del inóculo secundario de los ratones portadores fue 0. No solo el volumen del implante tumoral inoculado en segundo término en portadores de M234p fue significativamente menor que en los controles, sino también la incidencia tumoral en el flanco izquierdo. Se observó que en el grupo experimental sólo el 16.6% (1/6) de los ratones portadores del tumor M234p desarrollaron el tumor secundario, mientras que el 100% (6/6) de los tumores implantados en los ratones del grupo control crecieron ( $p= 0.01917$ ,  $\chi^2$  Test) (Tabla 5).

Por el contrario, el tumor M234m no mostró resistencia antitumoral concomitante, es decir, no hubo diferencias significativas del crecimiento de los inóculos secundarios entre los animales del grupo experimental y los únicos inóculos realizados en el mismo momento que los anteriores en el grupo control (Figura 7C).



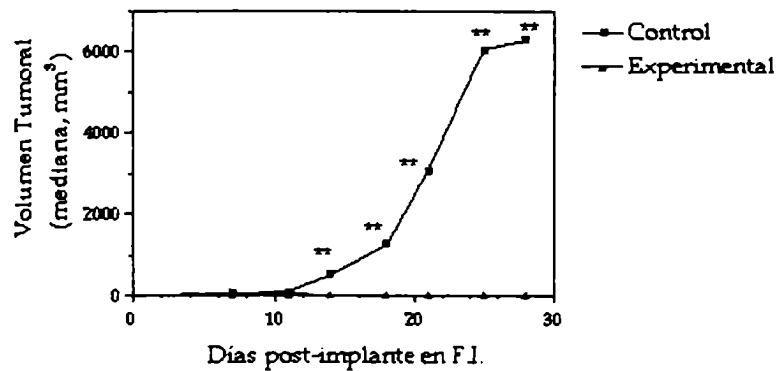
Figura 7

Figura 7A Resistencia Concomitante Antitumoral inducida por el adenocarcinoma mamario murino M3MC



Test de Mann Whitney: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p = 0.0022$

Figura 7B Resistencia Concomitante Antitumoral inducida por el adenocarcinoma mamario murino M234p



Test de Mann Whitney, \*\*  $p < 0.0022$

Figura 7C Resistencia Concomitante Antitumoral inducida por el adenocarcinoma mamario murino M234m

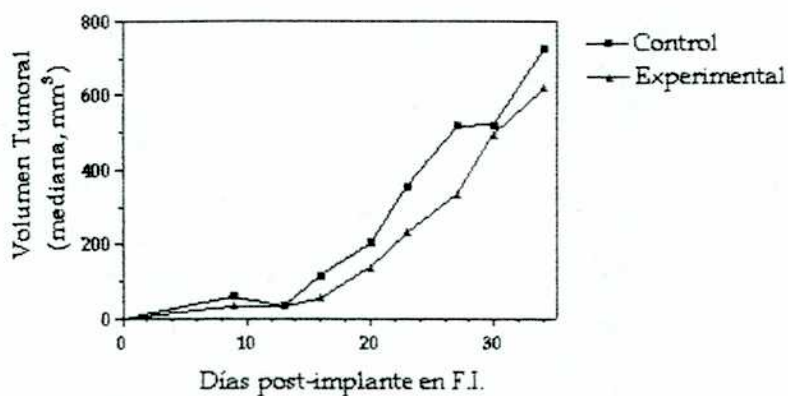


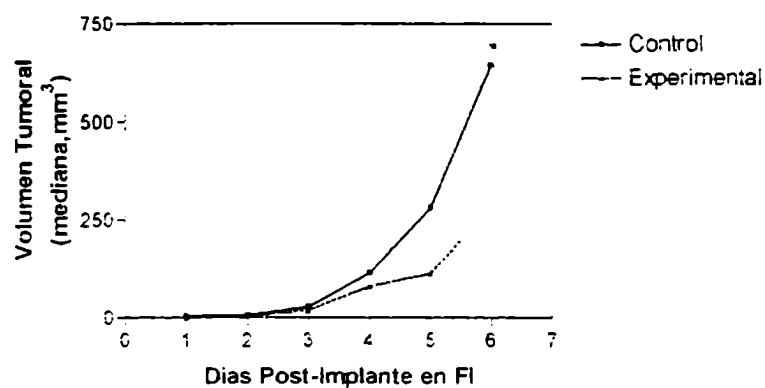
Tabla 5

Tumor	Días después de la implantación en el flanco izquierdo	Incidencia tumoral en flanco izquierdo (%)	
		Grupo Control	Grupo Experimental
M234p	7	6/6 (100)	5/6 (83)
	11	6/6 (100)	6/6 (100)
	14	6/6 (100)	1/6 (16.6)*
	18	6/6 (100)	1/6 (16.6)*
	21	6/6 (100)	1/6 (16.6)*
	25	6/6 (100)	1/6 (16.6)*
	28	6/6 (100)	1/6 (16.6)*
M234m	9	5/5 (100)	5/5 (100)
	13	5/5 (100)	5/5 (100)
	16	5/5 (100)	4/4 (100)
	20	5/5 (100)	4/4 (100)
	23	4/5 (80)	4/4 (100)
	27	4/5 (80)	4/4 (100)
	30	4/5 (80)	4/4 (100)
	34	4/5 (80)	4/4 (100)

Test de  $\chi^2$ , \*p = 0.01917

Con el objeto de saber si esta inhibición era debida a un fenómeno inmunológico se repitió el ensayo de RC pero usando ratones *nude*, timoprivos. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 8.

**Figura 8**  
**Resistencia Concomitante Antitumoral inducida**  
**por el adenocarcinoma mamario murino M234p en ratones *nude***



Test de Mann Whitney: \*  $p = 0.0476$ .

Como puede observarse en la figura anterior el tumor M234p generó el fenómeno de RC en ratones *nude* pero dando una inhibición parcial. Si comparamos los I.V.T. del último día del experimento en ratones inmunocompetentes con los ratones *nude* observamos que la inhibición es

100% en el primer grupo y 52.5% en el segundo grupo, por este motivo concluimos que la inhibición del inóculo secundario se debería en parte a una respuesta inmunológica generada por el tumor primario en el huésped. Esto también puede verse en la incidencia tumoral del inóculo secundario en los ratones inmunocompetentes BALB/c (Tabla 5), ya que en el grupo experimental la incidencia tumoral de M234p fue significativamente menor que la del grupo control (16.6% versus 100%), mientras que en los ratones *nude* fue del 100% en ambos grupos. A pesar de que en los días previos no pudo detectarse una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento tumoral entre ambos grupos en los ratones *nude*, en los animales del grupo experimental hubo siempre un menor crecimiento que se mantuvo a lo largo del estudio. Esto podría sugerir la participación de algún otro mecanismo secundario que podría sumarse al inmunológico observado en animales inmunocompetentes.

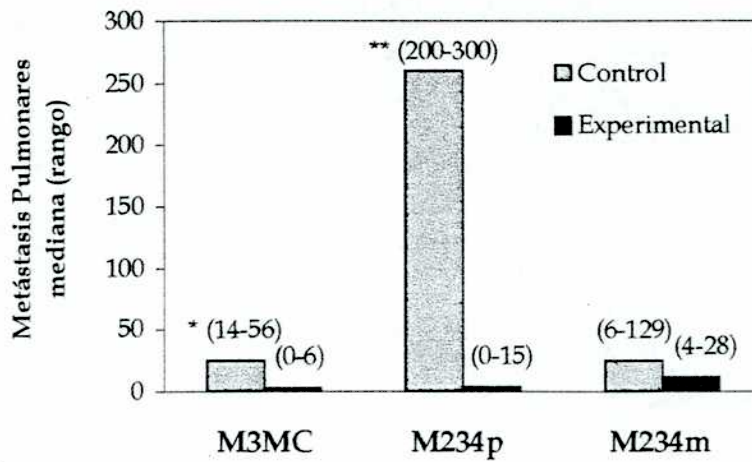
### **Resistencia Antimetastásica Concomitante**

Con el objetivo de verificar si la capacidad de inducir resistencia concomitante también ocurría frente a inóculos endovenosos, se realizó el ensayo de metástasis experimentales con los tres tumores murinos. Ratones portadores y no portadores de un tumor primario (grupo experimental y control) fueron inoculados endovenosamente con los tumores M3MC, M234p y M234m, respectivamente. Como puede verse en la Figura 9, la presencia del tumor primario inhibió la formación de nódulos metastásicos pulmonares en los casos de M3MC y M234p. El tumor M3MC generó una inhibición de la incidencia metastásica (I.I.M.) de 98.65 %, M234p un 83% mientras que el tumor M234m no mostró diferencias entre el grupo control y

el experimental. Este ensayo confirma el ensayo de RC antitumoral realizado previamente (Figura 7).

Figura 9

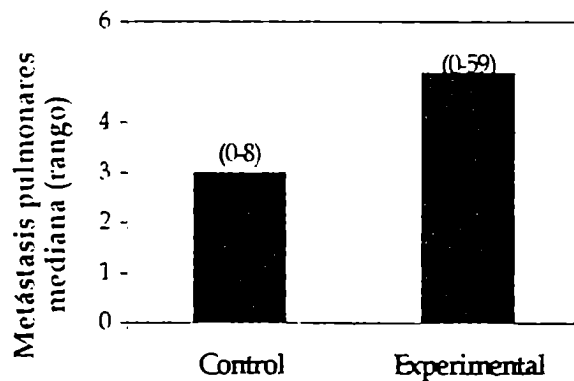
Ensayo de Resistencia Antimetastásica Concomitante en ratones BALB/c inducida por los tumores murinos M3MC, M234p y M234m.



Test de Mann Whitney: \* $p < 0.002$ , \*\* $p < 0.0012$ .

Se repitió el ensayo de resistencia antimetastásica concomitante en ratones *nude* sólo para el tumor M234p que generó RC, con el objetivo de reconfirmar el rol de la inmunidad en la generación del fenómeno. El inóculo endovenoso fue realizado a los 17 días de haber inoculado el tumor primario. Como puede observarse en la Figura 10, no existen diferencias significativas entre ambos grupos, ratificando una explicación inmunológica para el fenómeno de RC generado por M234p.

**Figura 10**  
**Ensayo de Resistencia Antimetastásica Concomitante**  
**en ratones *nude* inducida por el tumor M234p**



**Efecto sobre la proliferación de las células endoteliales RVEC de los MCs provenientes de los diferentes tumores y de los sueros de ratones portadores**

Con el objeto de investigar si existía alguna asociación entre la generación de RC y una inhibición de la angiogénesis *in vitro*, decidimos medir la actividad de los MCs y de los sueros de animales portadores sobre la proliferación de las células de endotelio de rata RVEC.

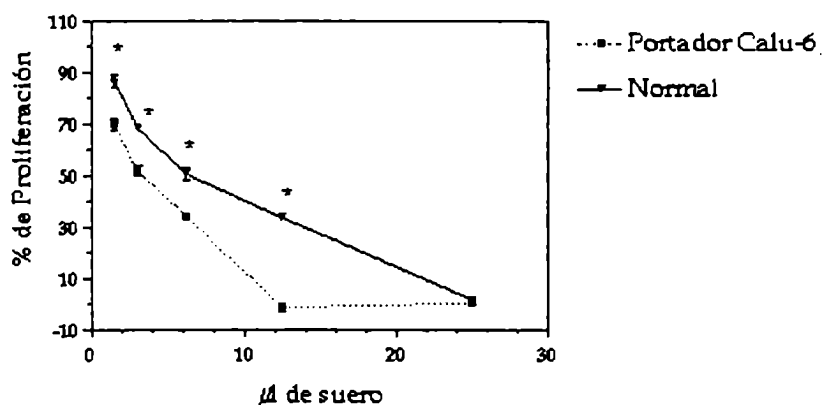
**Efecto de los sueros de animales portadores sobre la proliferación de células endoteliales RVEC**

Como puede verse en la Figura 11A, el suero de ratones *nude* portadores del tumor Calu-6 inhibió la proliferación de las células RVEC. Las

curvas fueron paralelas y el volumen de suero agregado tuvo un efecto dosis respuesta; también la curva del suero de portadores está desplazada hacia la izquierda con respecto a la del suero normal, es decir para lograr un mismo efecto inhibitorio sobre las células endoteliales se debe colocar menos cantidad de suero de portadores que de suero normal. Como puede extrapolarse de las curvas, el porcentaje de inhibición producido por el suero de portadores Calu-6 con respecto a su respectivo suero normal, fue para un volumen de suero agregado de 12.5  $\mu$ l casi un 40%, y para 6.25  $\mu$ l, 3.13  $\mu$ l y 1.5  $\mu$ l cercana al 20% (las diferencias fueron estadísticamente significativas en todas las dosis).

Figura 11

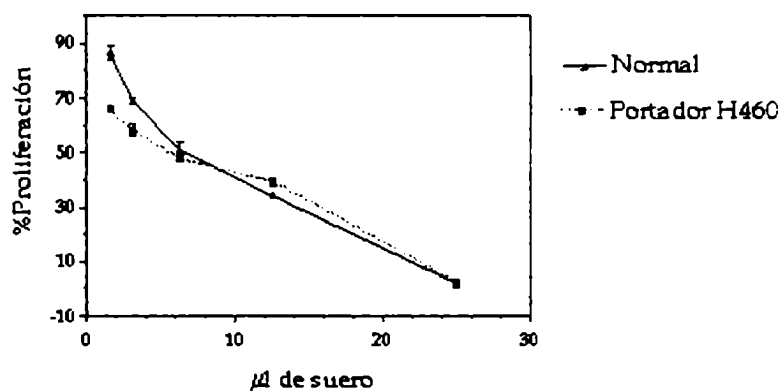
Figura 11A Efecto del suero de ratones *nude* portadores Calu-6 sobre la proliferación de células endoteliales RVEC



Test t de Student. Se comparó porcentaje de proliferación del suero de ratones portadores Calu-6 con el suero normal sobre las células RVEC para cada dilución:  $p < 0.0001$  para 12.5  $\mu$ l,  $p < 0.0037$  para 6.25  $\mu$ l,  $p < 0.0028$  para 3.13  $\mu$ l y  $p < 0.0010$  para 1.5  $\mu$ l.

Con respecto al suero proveniente de ratones portadores H460, el mismo no mostró diferencias con respecto al suero normal, siendo las curvas de ambos similares (Figura 11B). Destaquemos que 25 y 50  $\mu$ l de suero *nude* normal tuvo un efecto citotóxico sobre RVEC, como surge de las observaciones microscópicas previas a la medición en lector de placas.

**Figura 11B**  
**Efecto sobre la proliferación de células endoteliales RVEC**  
**del suero de ratones *nude* portadores H460**

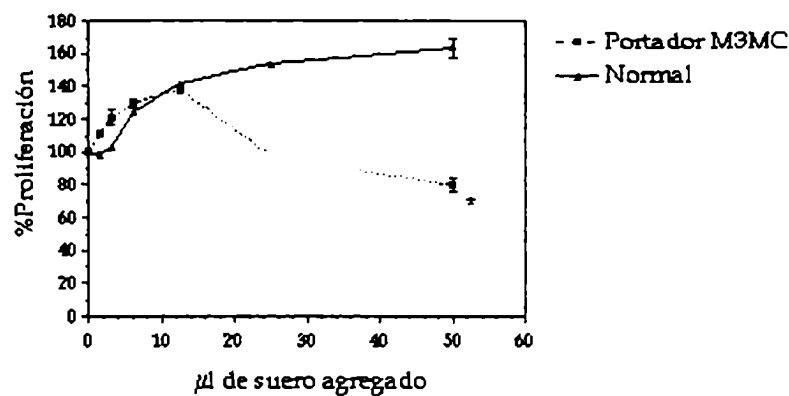


En el caso del tumor M3MC, se comparó el efecto de sueros de ratones portadores con su respectivo suero normal BALB/c. Como puede verse en la Figura 11C, el suero de ratones normales tuvo un efecto proliferativo dosis respuesta sobre el crecimiento de RVEC; en cambio, el suero de animales portadores M3MC tuvo un efecto proliferativo a bajas dosis y similar al suero normal y luego, a partir de los 12.5  $\mu$ l un efecto inhibitorio significativamente



distinto si lo comparamos con el suero normal ( $p < 0.0001$ , Test t de Student). Si comparamos el efecto del suero de animales portadores con suero normal vemos que para 50  $\mu\text{l}$  de suero agregado, se produjo un 80% de inhibición de la proliferación y para 25  $\mu\text{l}$  la inhibición fue de un 50%.

**Figura 11C**  
**Efecto del suero de ratones BALB/c portadores M3MC**  
**sobre la proliferación de células endoteliales RVEC**

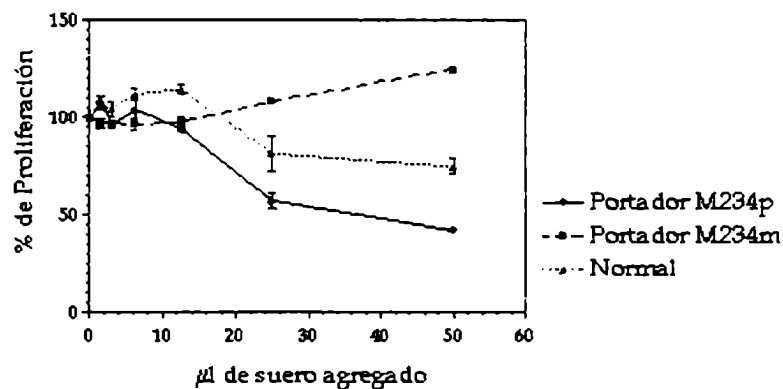


\* $p < 0.0001$ , Test t de Student.

En el caso del adenocarcinoma mamario murino M234m, el suero de animales portadores mostró un efecto positivo sobre la proliferación de RVEC si lo comparamos con la curva de su respectivo suero BALB/c normal control (procedentes del Instituto de Genética Experimental de Rosario) (Figura 11D). Con 50  $\mu\text{l}$  el suero de portadores produjo aproximadamente un 50% de estímulo de la proliferación, si lo comparamos con su respectivo

suero normal; con 25  $\mu\text{l}$  el efecto fue 30% de estímulo. Para ambos puntos analizados, las diferencias fueron estadísticamente significativas (Test t de Student, ver Figura 11D). La curva mostrada por el suero de los portadores M234p fue paralela a la de sueros normales y mostró una inhibición significativa de la proliferación en comparación con ellos del 30% y 20% para 50  $\mu\text{l}$  y 25  $\mu\text{l}$ , respectivamente. Cabe destacar que altas concentraciones del suero de ratones BALB/c (25 y 50  $\mu\text{l}$ ) no resultaron citotóxicas, como lo fueron las de los sueros de los ratones *nude*.

**Figura 11D**  
**Efecto del suero de ratones BALB/c portadores M234m y M234p**  
**sobre la proliferación de células endoteliales RVEC**



Test t de Student. Se comparó porcentaje de proliferación del suero de ratones portadores M234m con el suero normal sobre las células RVEC para cada dilución ( $p < 0.0002$  para 50  $\mu\text{l}$ ,  $p < 0.0289$  para 25  $\mu\text{l}$ ), M234p con suero normal ( $p < 0.001$  para 50  $\mu\text{l}$  y  $p < 0.0266$  para 25  $\mu\text{l}$ ) y M234m con M234p ( $p < 0.0001$  para 50  $\mu\text{l}$  y  $p < 0.0002$  para 25  $\mu\text{l}$ )

## Efecto sobre la proliferación de células endoteliales RVEC de los MCs provenientes de los diferentes tumores

En la Figura 12, se representa el efecto de los diferentes MCs sobre el crecimiento de la línea endotelial RVEC. Como puede verse, los MCs de las líneas que generan RC (Calu-6, M234p y M3MC), tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de RVEC y dosis respuesta (Figura 12A, B y D). En cambio, los MCs de M234m y H460, que no generaron RC mostraron una leve estimulación de la proliferación de las células endoteliales y no se vio un efecto dosis respuesta (Figura 12C y E).

**Figura 12**

**Figura 12A Efecto del MC de Calu-6 sobre la proliferación de la línea endotelial RVEC**

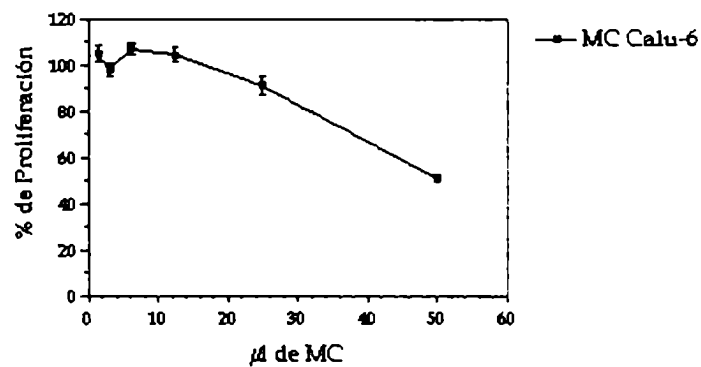


Figura 12B Efecto del MC de M3MC sobre la proliferación de la línea endotelial RVEC

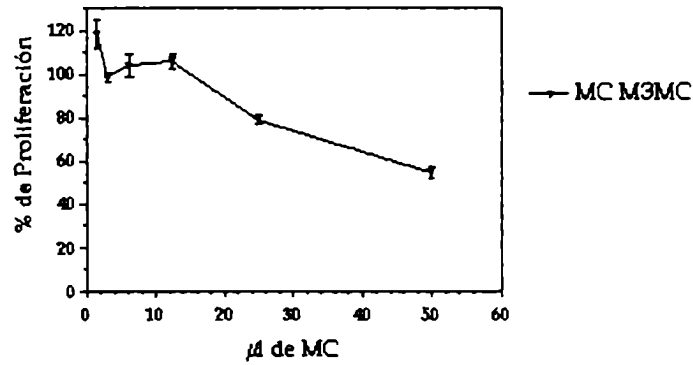


Figura 12C Efecto del MC de H460 sobre la proliferación de la línea endotelial RVEC

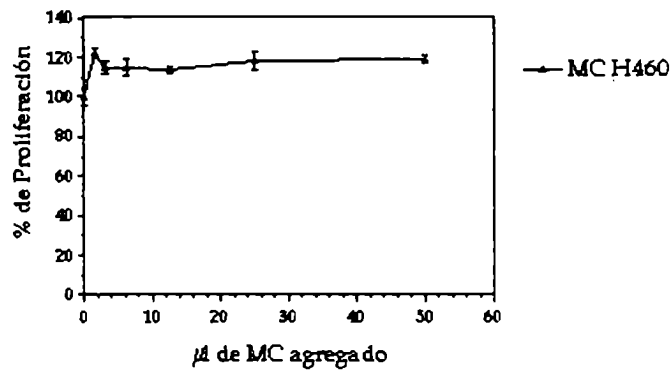
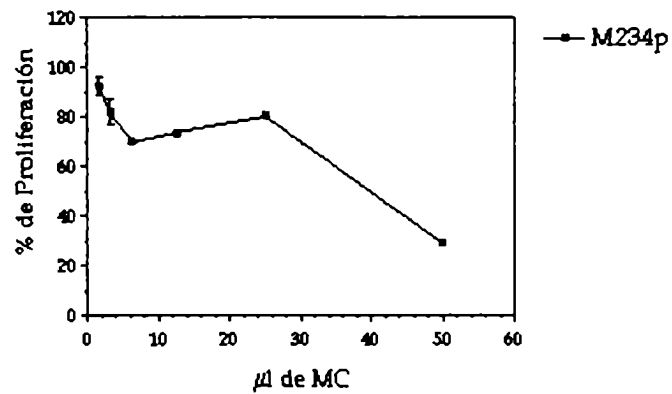
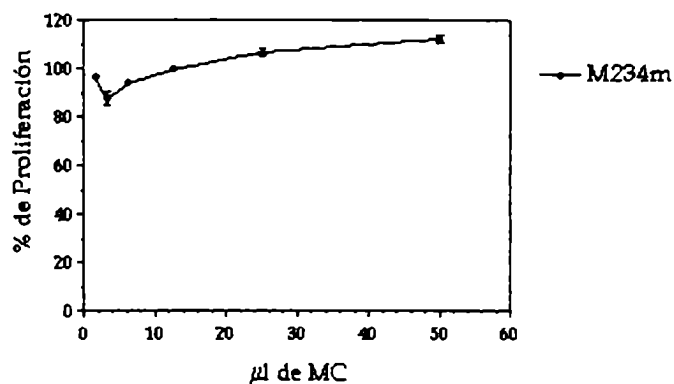


Figura 12D Efecto del MC de M234p sobre la proliferación de la línea endotelial RVEC



**Figura 12E Efecto del MC de M234m sobre la proliferación de la línea endotelial RVEC**



### **Estudio de factores angiogénicos y angiostáticos**

El siguiente paso fue evaluar la presencia de diferentes factores angiogénicos y angiostáticos, con el objetivo de averiguar si la capacidad de generar RC y de inhibir la proliferación de las células RVEC, se asociaba con un aumento en la producción de factores angiostáticos y/o una disminución en los factores angiogénicos. Se procedió entonces a la detección o cuantificación de los mismos en los MCs procedentes de los cinco tumores utilizados y en los sueros de animales portadores.

### **Factores angiostáticos**

### **Generación de angiostatina**

### **Análisis de angiostatina en sueros de ratones portadores de tumores**

Con el objetivo de saber si la capacidad de generar RC estaba asociada a la producción de angiostatina, nos propusimos investigar la presencia de este

inhibidor de la angiogénesis en los sueros de animales portadores. Como no pudimos detectarla sembrando directamente en el SDS PAGE hasta 200  $\mu$ g de proteína (dato no mostrado), decidimos purificar esta molécula, en base a su afinidad por la lisina, de los sueros de ratones portadores de los cinco tumores (grupo control y experimental) y ratones sin tumor (normales). Como puede observarse en la Figura 13, no se pudo detectar la presencia de angiostatina en ninguno de los casos. Sólo se detectó el plasminógeno sérico cuya concentración es mucho más elevada que la angiostatina. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos, uno de ellos monoclonal anti-kringles 1-3 del plasminógeno humano (que cruza con el plasminógeno murino) detectado por un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, y un anticuerpo policlonal hecho específicamente contra el residuo aminoacídico 1-19 de la angiostatina murina y revelado por el método de quimioluminiscencia que es más sensible que el método anterior (Figura 13A y 13B, respectivamente). El control positivo usado fue angiostatina humana comercial (0,45  $\mu$ l por pocillo).

Figura 13

Figura 13A Detección de angiostatina en sueros de animales portadores detectado con anticuerpo monoclonal anti-kringles 1-3 del plasminógeno humano

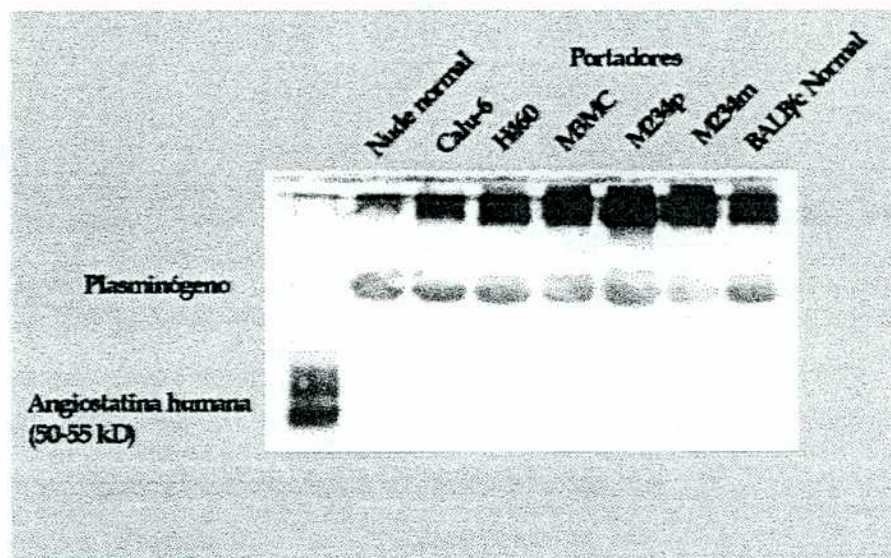
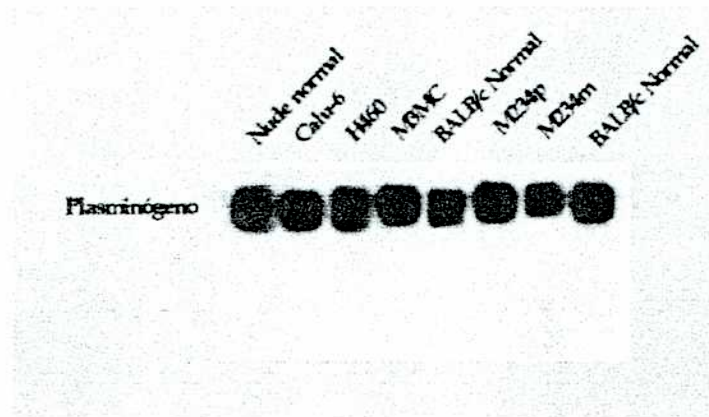


Figura 13B

Detección de angiostatina en sueros de animales portadores detectado con anticuerpo policlonal anti-angiostatina murina

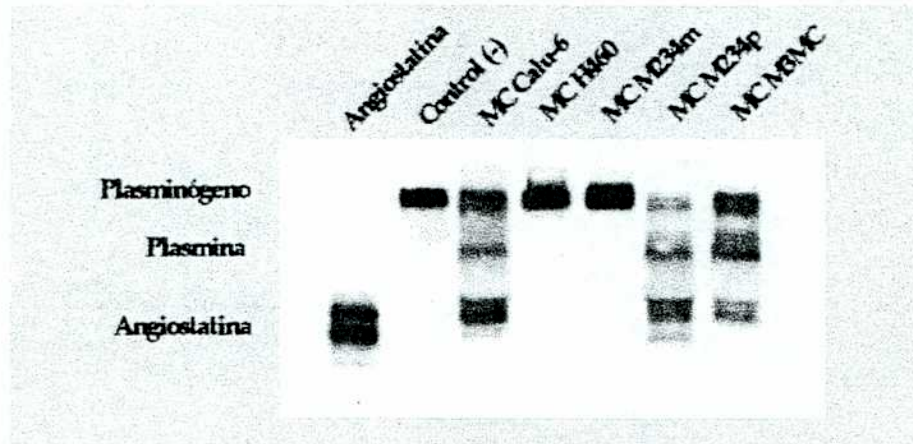


#### Generación de angiostatina *in vitro*

Dado que no pudimos detectar angiostatina en los sueros de los ratones portadores, decidimos ver que ocurría con la producción de la misma *in vitro*. Se realizó entonces la incubación de los MCs de las cinco líneas con plasminógeno humano. Un MC es el sobrenadante del cultivo de células al que las células secretan diferentes clases de moléculas, entre ellas proteasas que podrían mediar el procesamiento del plasminógeno para generar angiostatina. La producción de angiostatina fue evaluada mediante la técnica de Western Blot. Como puede verse en la Figura 14, las tres líneas que generan RC *in vivo*, Calu-6, M3MC y M234p, poseen enzimas capaces de procesar al plasminógeno y generar angiostatina *in vitro*. En cambio, las líneas que no generaron RC, H460 y M234m, no poseen esa capacidad.

Figura 14

Generación de angiotatina *in vitro* por los MCs  
de Calu-6, H460, M3MC, M234m y M234p



#### Estudio de la generación de angiotatina con diferentes inhibidores de proteasas

Se preincubaron los MCs que poseían la capacidad de generar angiotatina con diferentes inhibidores enzimáticos, para saber qué clase de enzima contenida en los MCs estaba involucrada en este proceso. Como puede verse en la Tabla 6, el procesamiento de plasminógeno para generar angiotatina podría ser debido a una serinoproteasa para los tres casos positivos analizados, ya que la generación de angiotatina se vio inhibida por inhibidores de este tipo de enzima. El EDTA, un inhibidor de metaloproteasas, no produjo inhibición, al igual que su inhibidor fisiológico, los TIMPs (los TIMPs mostraron una leve inhibición en la dosis mayor).



Tabla 6

Efecto de diferentes inhibidores enzimáticos de amplio espectro y específicos en la generación de angiostatina

Inhibidor De Proteasa	Especificidad	Concentración usada	Generación de angiostatina por los MC obtenidos de		
			Calu-6	M3MC	M234p
-	-	-	+++	+++	+++
Aprotinina	Inhíbe serino proteasas	5 $\mu$ M	-	-	-
Leupeptina	Inhíbe serino y cisteino proteasas	200 $\mu$ M	-	+/-	-
SBTI	Inhíbe tripsina y plasmina	100 $\mu$ g/ml	-	-	-
EDTA	Inhíbe Metaloproteasas	5 mM	+++	+++	+++
TIMP-1	Forma complejos con las formas activa y latente de MMPs, preferencialmente de MMP-9	0.01 $\mu$ gr/ml	+++	+++	+++
		0.1 $\mu$ gr/ml	+++	+++	+++
		1 $\mu$ gr/ml	++	++	++
TIMP-2	Forma complejos con las formas activa y latente de MMPs, preferencialmente de MMP-2	0.01 $\mu$ gr/ml	+++	+++	+++
		0.1 $\mu$ gr/ml	+++	+++	+++
		1 $\mu$ gr/ml	++	++	++
$\alpha$ 2 antiplasmina	Inhibidor fisiológico de la plasmina. También evita la formación de plasmina a partir del plasminógeno por uPA	0.01 $\mu$ gr/ml	++	+++	+++
		0.1 $\mu$ gr/ml	+	+++	+++
		1 $\mu$ gr/ml	-	+++	-
		10 $\mu$ gr/ml	-	++	-
Anticuerpo neutralizante anti uPA	Neutraliza La actividad de uPA	0.01 $\mu$ gr/ml	++	+++	+
		0.1 $\mu$ gr/ml	+	+++	-
		1 $\mu$ gr/ml	-	+++	-
		10 $\mu$ gr/ml	-	+++	-

En la Figura 15, a modo de ejemplo, se muestra lo antedicho para la línea Calu-6. Cabe destacarse que el MC de M3MC fue el único que prácticamente no fue inhibido por anticuerpos neutralizantes para uPA (Tabla 6), por lo que creemos que, mientras en las otras dos líneas podría ser uPA la enzima responsable de la generación de angioestatina *in vitro*, en M3MC sería otra serinoproteasa la involucrada.

Figura 15

Figura 15A Efecto de inhibidores inespecíficos sobre la generación de angioestatina en el MC de Calu-6

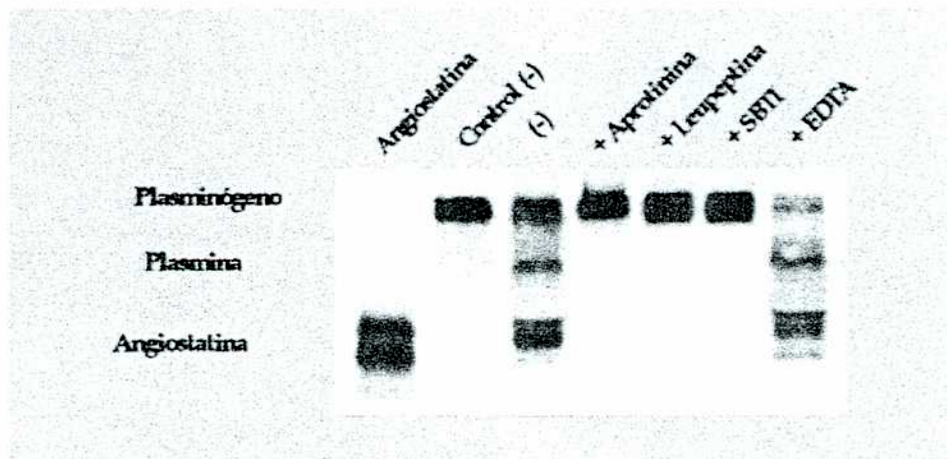
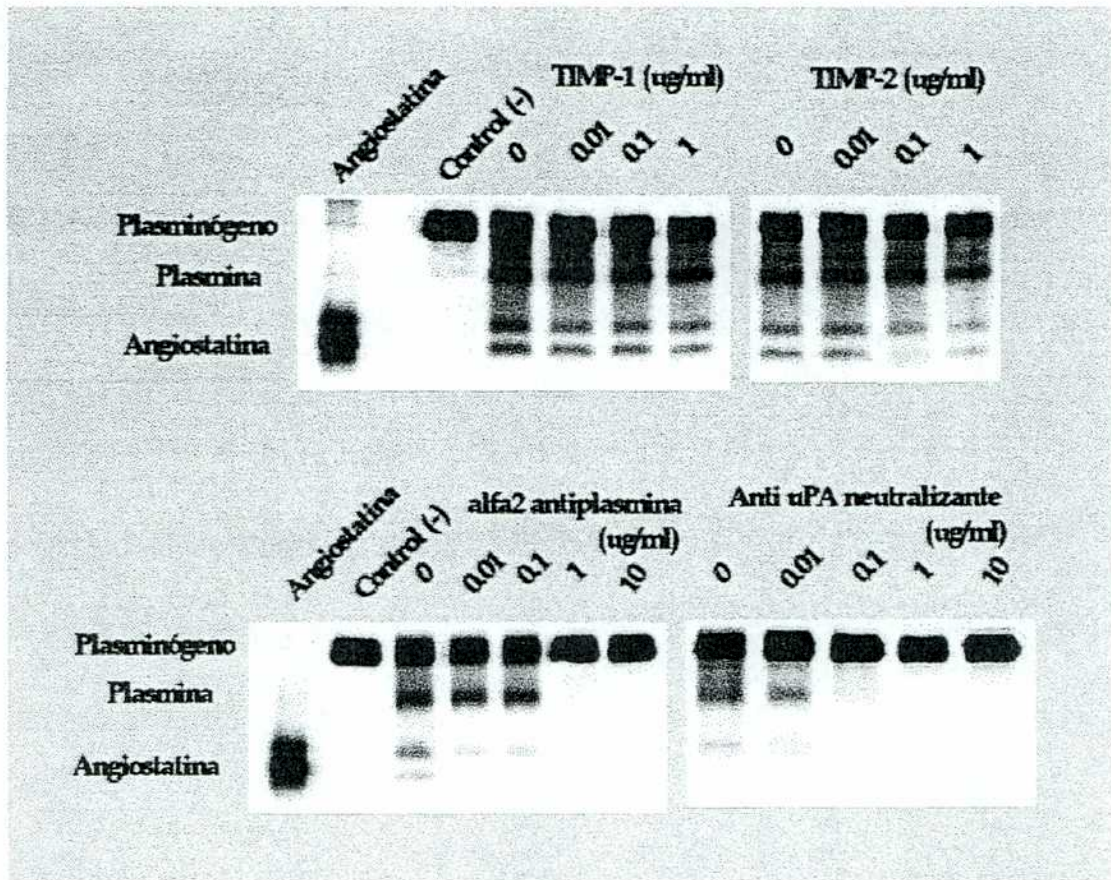


Figura 15B Efecto de inhibidores específicos en la generación de angiostatina en el MC de Calu-6



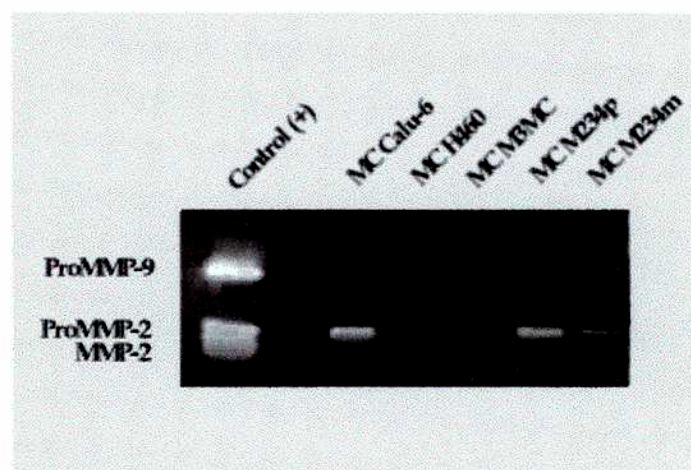
### Análisis zimográfico

Como se demostró previamente, las MMPs no estaban involucradas en el procesamiento del plasminógeno para generar angiostatina en aquellas células tumorales analizadas capaces de hacerlo. Sin embargo, quisimos ver si esto coincidía con la producción de MMPs. Entonces se realizó la técnica de zimografía para detectar la presencia de las mismas. Como puede verse en la Figura 16, ninguno de los MCs de las cinco líneas celulares producen las formas activas de MMP-9 ni MMP-2. Sólo los MCs de las líneas Calu-6,

M234m y M234p mostraron secretar el zimógeno de MMP-2, la proMMP-2. A su vez, ello no se hallaba asociado a la capacidad de generar angioestatina *in vitro*.

**Figura 16**

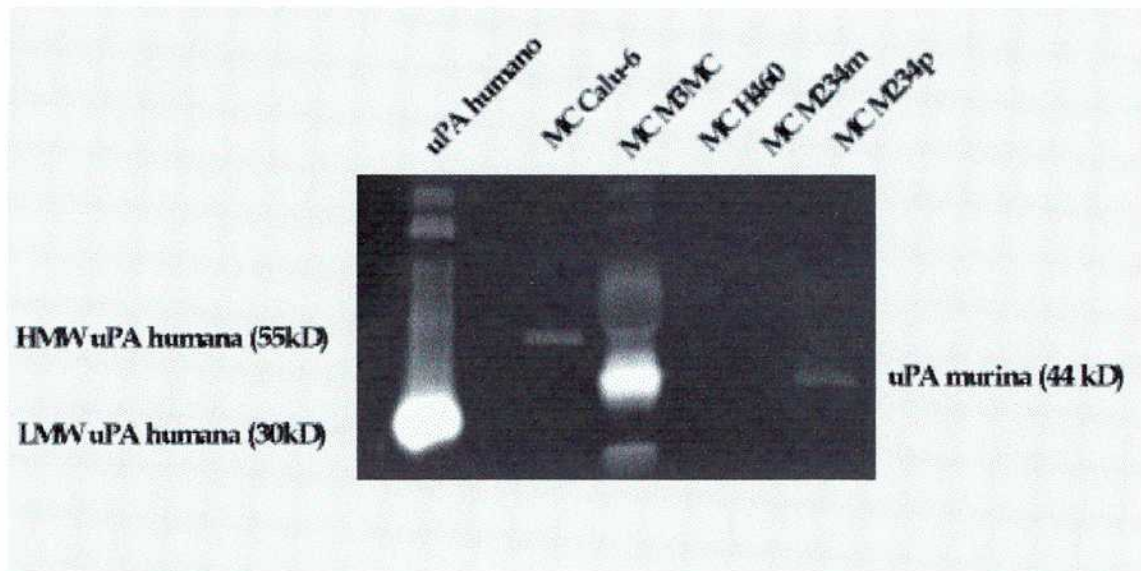
**Detección de Metaloproteinasas por la técnica de zimografía**



Por el estudio realizado con diferentes inhibidores dedujimos que la enzima involucrada en el procesamiento del plasminógeno para generar angioestatina era una serinoproteasa. Como la producción de angioestatina de los MCs de Calu-6 y M234p fue inhibida por anticuerpos neutralizantes contra el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, creíamos que la enzima involucrada en esa proteólisis podría ser uPA. Entonces realizamos un zimograma para detectar la presencia de la misma en los MCs. Como puede verse en la Figura 17, los MCs de las líneas Calu-6, M3MC y M234p, que tienen la capacidad de generar angioestatina, producen uPA en su forma de alto peso molecular que posee actividad catalítica.

**Figura 17**

**Detección de la enzima Activador de Plasminógeno de tipo uroquinasa por la técnica de zimografía**



**Producción de endostatina**

Luego se procedió a evaluar otro factor angiostático, la endostatina. Para tal fin se utilizó un kit comercial para la detección de endostatina murina libre en suero de animales portadores y en MC de las líneas murinas.

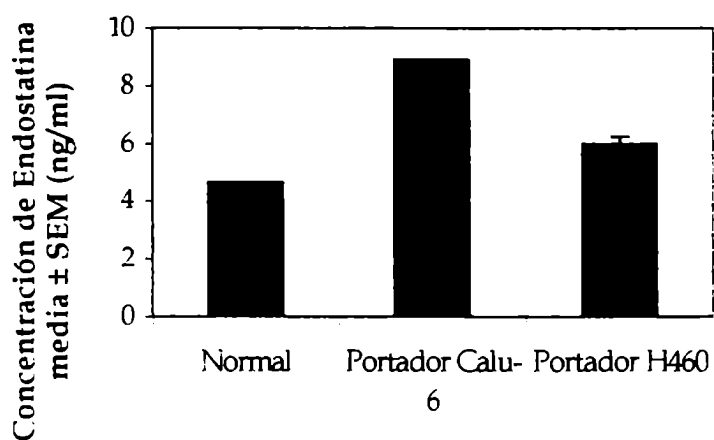
**Medición de endostatina en los sueros de ratones portadores de los diferentes tumores**

Como puede verse en la Figura 18A, los sueros de ratones portadores Calu-6 tienen una concentración significativamente mayor de endostatina que los sueros de ratones portadores H460, y estos dos últimos, a su vez,

poseen también una concentración de endostatina significativamente mayor que los sueros de ratones normales.

**Figura 18**

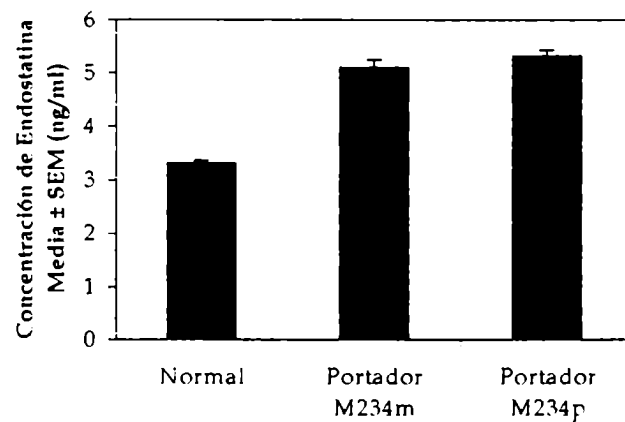
**Figura 18A Detección de endostatina en suero de portadores Calu-6 y H460**



Anova:  $p < 0.0001$ , Prueba de comparaciones múltiple de Tukey-Kramer:  $p < 0.05$  portador H460 vs Normal,  $p < 0.001$  portador Calu-6 vs Normal y  $p < 0.001$  portador H460 vs Calu-6.

Los sueros de animales portadores de los tumores M234m y M234p, mostraron una concentración de endostatina significativamente mayor que el suero de ratones normales ( $p < 0.001$ , Anova, Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test), pero no mostraron diferencias significativas entre ellos (Figura 18B).

**Figura 18B Detección de endostatina en suero de portadores M234m y M234p**

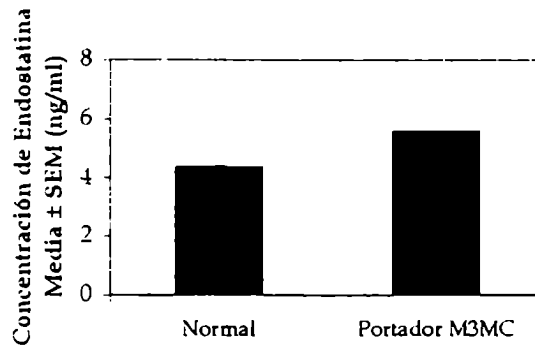


Anova:  $p < 0.0001$ , Prueba de comparación múltiple de Turkey-Kramer: portador M234m y M234p vs Normal  $p < 0.001$

Para el tumor M3MC, los sueros de ratones portadores tenían una concentración aunque levemente mayor, pero significativamente distinta que los ratones normales ( $p < 0.001$ , Test t de Student para datos no apareados) (Figura 18C).

Figura 18C

Concentración de endostatina en suero de portadores M3MC



$p < 0.001$  Test t de Student para datos no apareados

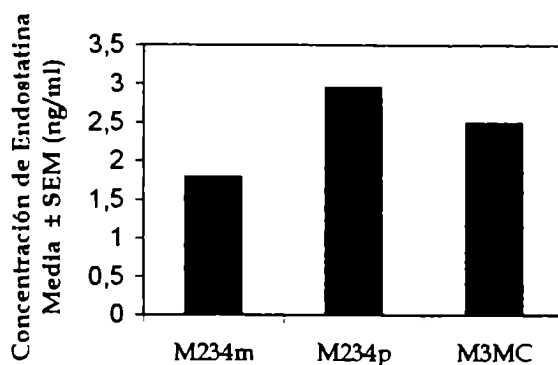
**Medición de endostatina en los MC de los tumores murinos**

Se midió endostatina murina en los MCs procedentes de los tumores murinos. Como puede verse en la Figura 19, los MCs de los tumores M3MC y M234p, que mostraron RC, poseen una concentración de endostatina significativamente mayor que el MC de M234m que no generó el fenómeno.



Figura 19

**Concentración de endostatina en los MC de tumores murinos**



Anova:  $p < 0.0065$ , Prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer: MC M234p vs MC M234m y MC M3MC vs MC M234m  $p < 0.001$ . Los MCs usados para el ensayo fueron relativizados a  $2.5 \times 10^4$  células/ ml de MC.

**Factores angiogénicos**

**Producción del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)**

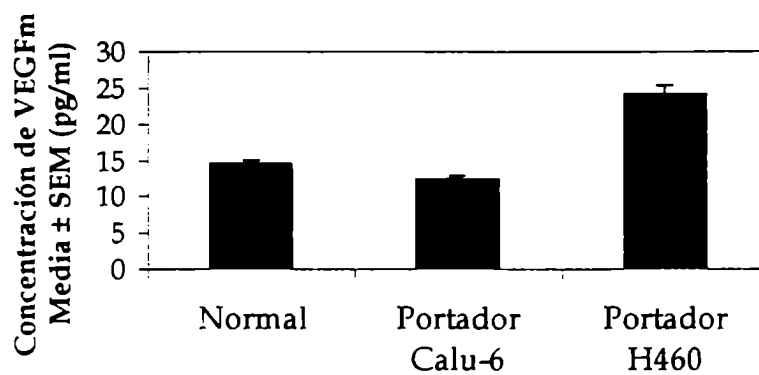
Con el objeto de seguir investigando que otros factores podrían regular el fenómeno de RC, se midió VEGF en MC y suero de animales portadores.

**Medición de VEGF murino en los sueros de ratones portadores de los diferentes tumores**

Como puede observarse en la Figura 20A, la concentración de VEGF murino en los sueros de ratones portadores de H460, que no generó el fenómeno de RC, fue significativamente mayor que los portadores Calu-6,

que mostró RC. También hubo diferencias significativas entre los portadores H460 y los ratones normales *nude*, pero no entre estos últimos y los portadores del tumor Calu-6.

**Figura 20A**  
**Concentración de VEGF murino en suero**  
**de ratones *nude* portadores de los tumores humanos**

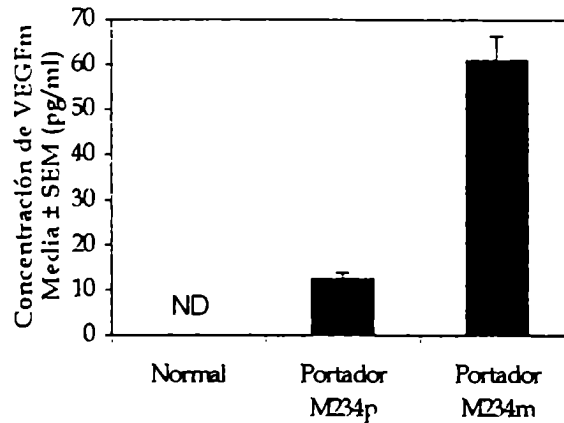


Anova:  $p < 0.0001$ , Prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer: portador Calu-6 vs H460 y portador H460 vs normal,  $p < 0.001$ .

La concentración de VEGF en el suero de portadores M234m, que no mostraron RC, fue seis veces mayor que la concentración en sueros de portadores M234p, que si mostraron RC. Los sueros de M234m y de M234p tenían una concentración de VEGF significativamente mayor que el de los ratones normales que dieron por debajo del límite de detección de la técnica (Figura 20B).

Figura 20B

Concentración de VEGF murino en suero de animales portadores de M234m y M234p

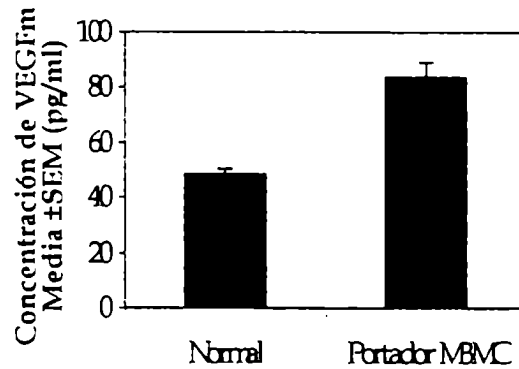


Anova:  $p < 0.0001$ , Prueba de múltiples comparaciones de Tukey-Kramer: portador M234m vs portador M234p  $p < 0.001$ , Portador M234m vs Normal  $p < 0.001$  y portador M234p vs Normal  $p < 0.05$ .

ND no detectado

En cuanto al tumor M3MC, se comparó la concentración de este factor en suero de ratones portadores con el respectivo suero de ratones BALB/c normales procedentes del Instituto de Oncología Angel Roffo. Los sueros de ratones portadores M3MC tenían una concentración de VEGF significativamente mayor que los sueros normales ( $p < 0.0013$ , Test t de Student para datos no apareados) (Figura 20C).

**Figura 20C**  
**Concentración de VEGF murino**  
**en suero de animales portadores de M3MC**



$p < 0.0013$  Test t Student para datos no apareados.

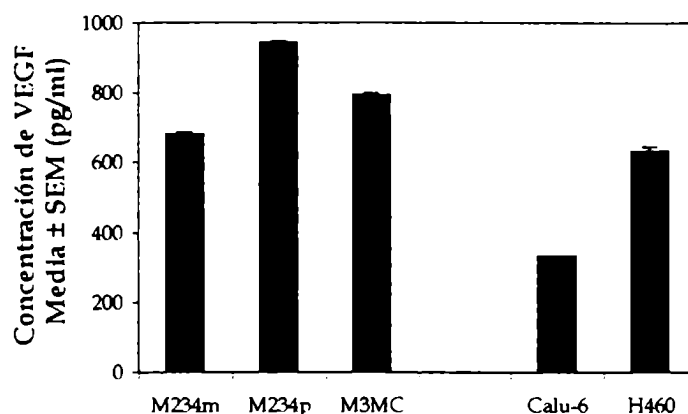
### **Medición de VEGF en los MC de los diferentes tumores**

En los MCs de los tumores humanos se analizó específicamente VEGF humano, mientras que en los MCs de tumores murinos VEGF murino usando los kits respectivos.

Analizando por un lado los MCs provenientes de tumores humanos, la concentración de VEGF humano de H460 fue dos veces mayor que la presente en el MC de Calu-6 ( $p < 0.001$ , Test t de Student). En cuanto a los MCs provenientes de los tumores murinos, el MC de M234p posee una mayor concentración de VEGFm que los MC de M3MC y M234m (Figura 21).

Figura 21

Medición de VEGF en MCs de los diferentes tumores



$p=0.0013$  Test t de Student Calu-6 vs H460.

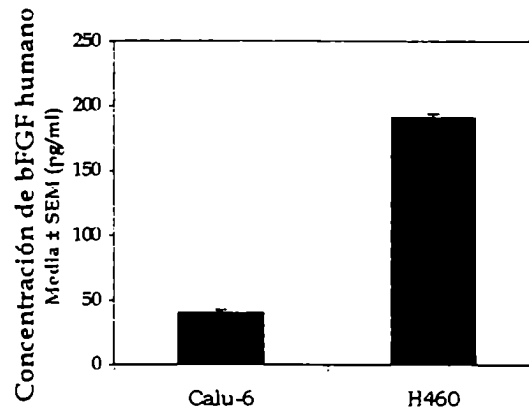
Anova:  $p<0.0001$ , Prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer:  $p<0.001$  M234p vs M234m y M234p vs M3MC. Los MCs murinos usados para el ensayo fueron relativizados a  $3.5 \times 10^5$  células/ ml de MC, y los humanos a  $1.6 \times 10^6$  células/ ml de MC.

**Producción del Factor de Crecimiento Fibroblástico básico humano**

Dado que actualmente se dispone sólo del Kit Comercial para la detección de bFGF humano y no murino, medimos la concentración de este factor únicamente en los MCs de las líneas celulares derivadas de tumores humanos (Calu-6 y H460). Como puede verse en la Figura 22, el tumor H460, que no mostró RC, produce 4.67 veces más bFGF que el tumor Calu-6, que dio RC.

**Figura 22**

**Producción de bFGF humano por las líneas de cáncer pulmonares humanas**



$p < 0.0001$  Test t-Student, datos no apareados. Los MCs usados para el ensayo fueron relativizados a  $1.6 \times 10^6$  células/ ml de MC

**Análisis de VEGF, bFGF, angiostatina y metaloproteinasas en sueros de pacientes con cáncer de mama**

Luego de trabajar con un modelo animal en este fenómeno, quisimos saber ahora que ocurría con la producción de factores angiogénicos/angiostáticos en pacientes con cáncer. En realidad no intentamos asociar la expresión de esos factores con la progresión de la enfermedad de cada paciente, lo cual hubiera significado hacer un seguimiento de un mayor número de pacientes por un período de 5 a 10 años, tiempo que excede al de esta tesis. En vez de ello, y a modo de acercamiento a este objetivo, se analizó la asociación entre la producción de VEGF, bFGF, angiostatina y MMPs y parámetros relacionados con el pronóstico (por ejemplo: tamaño tumoral, estadio, receptores para hormonas,

presencia o no de metástasis y/o recurrencia, axila positiva-negativa). Para tal fin se utilizaron kits comerciales de ELISA para medir las concentraciones de VEGF y bFGF humanos en sueros de 30 pacientes con cáncer de mama y en sueros controles de mujeres sanas.

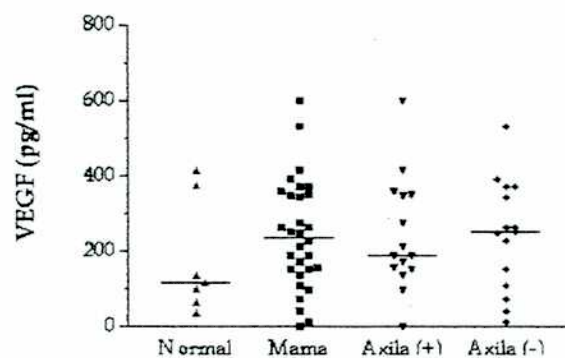
En primer lugar, las muestras fueron agrupadas de acuerdo a que la paciente presentara infiltración en ganglios axilares o no (axila positivas y negativas, respectivamente). En base a numerosos estudios clínicos, se asocia a las pacientes axilas positivas con un peor pronóstico en cáncer de mama. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en las Figuras 23 A y B.

Tabla 7

Factor	Control (pg/ml) Mediana (rango)	Cáncer de mama (pg/ml) Mediana (rango)	Axila positiva (pg/ml) Mediana (rango)	Axila negativa (pg/ml) Mediana (rango)
VEGF	124.6 (35.1 - 413.8)	236.5 (0.52-598.7)	187.75 (0.52-598.71)	249.39 (8.69-531.19)
BFGF	5.42 (0.97-19.17)	9.68 (0.19-30.41)	14.33 (0.19-30.41)	9.102 (2.32-29.65)

Figura 23A

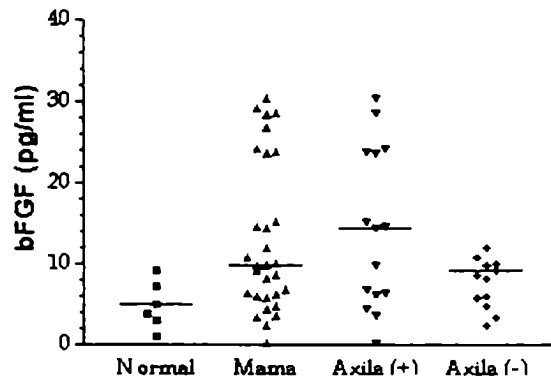
Producción de VEGF en sueros de pacientes con cáncer de mama



Cada punto corresponde a un valor individual y el segmento trazado indica la mediana de cada grupo.

Figura 23B

Producción de bFGF en sueros de pacientes con cáncer de mama



Cada punto corresponde a un valor individual y el segmento trazado indica la mediana de cada grupo.

A pesar que se observaron diferencias entre el grupo control y los demás grupos, éstas no fueron significativas para los dos parámetros analizados. Cabe destacar que la medición de VEGF en las pacientes axilas positivas, que teóricamente tienen un peor pronóstico, mostraron valores menores que las de axila negativa.

Los datos también fueron agrupados y analizados considerando el estadio tumoral (I, II, III y IV), el tamaño tumoral teniendo en cuenta el largo mayor (<2 cm, entre 2 y 5 cm y >5 cm), si eran receptor positivo o negativo para estrógeno y progesterona, respectivamente, y si había presencia o no de metástasis. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos debido principalmente al tamaño pequeño de la muestra analizada (dato no mostrado).



Se intentó purificar angiostatina en los sueros con el uso de lisina sefarosa y revelando con la técnica de western blot pero no se la pudo detectar en ninguna de las muestras, al igual que las muestras murinas solo se detectó plasminógeno.

Luego medimos la producción de MMPs purificando con el método de la fracción euglobina, realizando luego la técnica de zimografía y analizando la intensidad de las bandas de degradación obtenidas (Tabla 8 y Figura 24). El grupo de pacientes con cáncer de mama dio bandas de degradación de MMP-9 significativamente mayores que el grupo control. El grupo axila positiva posee también una mayor cantidad de MMP-9 que el grupo control, en cambio, el grupo axila negativa no mostró diferencia con el mismo. No se vieron diferencias significativas entre los grupos para la producción de MMP-2. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los otros parámetros relacionados al pronóstico y el grupo control para MMP-9 ni para MMP-2.

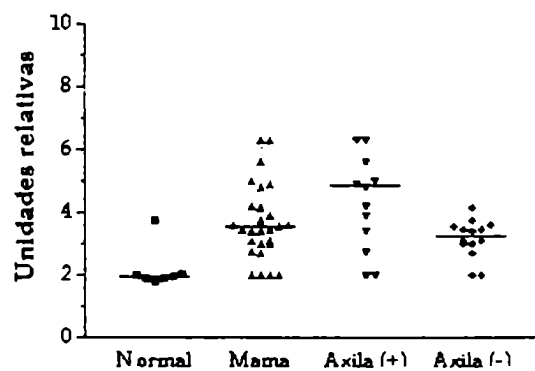
Tabla 8

<b>MMPs</b>	<b>Control (unidades relativas) Mediana (rango)</b>	<b>Cáncer de Mama (unidades relativas) Mediana (rango)</b>	<b>Axila Positiva (unidades relativas) Mediana (rango)</b>	<b>Axila Negativa (unidades relativas) Mediana (rango)</b>
MMP-9	1.95 (1.8- 3.74)	3.56 (2.0-9.8) (*)	4.82 (2.0-9.8) (*)	3.36 (2.0-4.13)
MMP-2	1.0 (0.77-1.14)	1.17 (0.69-2.65)	1.25 (0.69-2.65)	1.2 (1.0-1.23)

Test de Kruskal-Wallis:  $p < 0.0009$ , Prueba de comparación múltiple de Dunn: cáncer de mama vs control y axila positiva vs. control  $p < 0.01$ .

Figura 24

Producción de MMP-9 en sueros de pacientes con cáncer de mama



Cada punto corresponde a un valor individual y el segmento trazado indica la mediana de cada grupo.

# *Discusión*

## Discusión

El problema fundamental del cáncer es la formación de metástasis (Ahmad A. et al., 1996) ya que, de otra manera, la cirugía del tumor primario sería suficiente para acabar con la enfermedad. Sin embargo, se ha observado que casi en el 50% de los pacientes con cáncer al momento del diagnóstico, la formación de metástasis ya habría ocurrido (Sugarbaker, E.V. et al., 1977). En consecuencia, la extirpación quirúrgica del tumor primario en dichos casos podría provocar el crecimiento de dichas metástasis.

A partir de observaciones clínicas y experimentales, se sabe que, en ciertas ocasiones, el tumor primario puede controlar negativamente el crecimiento de metástasis pre-existentes que se hallarían en estado latente (Sugarbaker E.V. et al., 1977; Gorelik E., 1982; Prehn R.T., 1993). Este fenómeno, se llamó inicialmente “inmunidad concomitante”, pues se suponía que tenía una explicación inmunológica. Luego se vio que ocurría también con tumores no inmunogénicos y en modelos donde el sistema inmunológico estaba suprimido, por lo cual se acuñó el término “resistencia antitumoral concomitante”(RC) (Meiss R.P. et al., 1986).

Se ha postulado que el fenómeno de RC estaría controlado por factores sistémicos producidos por el tumor primario, los cuales actuarían directamente sobre la proliferación de las células tumorales (Ruggiero R.A. et al., 1990; Prehn R., 1993; Franco M. et al., 1996; Di Gianni P. et al., 1999; Franco M. et al., 2000). Sin embargo, la imposibilidad hasta la actualidad de identificar químicamente el/los factores postulado/s, no ha permitido llevar a cabo su inhibición específica con el objeto de revertir el fenómeno *in vivo* y verificar su responsabilidad en el mismo. Por otro lado, llama la atención el hecho de que en algunos modelos experimentales en los que se ha observado

la generación de RC, no se observe una inhibición de la incorporación de timidina tritiada (reflejo de la proliferación celular) en implantes secundarios inhibidos por la presencia de un tumor primario previo (Bonfil R.D. et al., 1998b).

Desde que J. Folkman postuló en 1971 que todos los tumores sólidos eran angiogénesis dependientes (Folkman J. 1971) y luego, se vio que los cánceres hematológicos también lo eran, se comenzó a pensar en una nueva forma de eliminar al cáncer. La angiogénesis o neovascularización es esencial no sólo para el desarrollo del tumor primario, sino también, para el establecimiento y crecimiento de las metástasis. Desde entonces, muchos investigadores han descrito el importante rol de la angiogénesis en el fenómeno de RC (O'Reilly M.S. et al., 1994; Di Gianni P.D. et al., 1995; Bonfil R.D. et al., 1998b; Volpert O.V. et al., 1998; O'Reilly M.S., 1999; Li T.S. et al., 2001; Kisker O. et al., 2001). La angiogénesis está controlada por un delicado balance entre reguladores positivos, conocidos como factores angiogénicos, y otros negativos, denominados factores angiostáticos. La angiostatina, así como otros factores antiangiogénicos, podrían mantener inhibido al tumor secundario o a las metástasis, induciendo el fenómeno de RC (O'Reilly M.S. et al., 1994; Volpert O.V. et al., 1998; Li T.S. et al., 2001; Kisker O. et al., 2001). No obstante esta asunción, esto aún no ha podido ser demostrado con claridad. Cuando este mecanismo de control que ejerce el tumor primario se rompe ocurre la progresión tumoral. En consecuencia, el desarrollo de una terapia antiangiogénica sería de suma utilidad para eliminar tumores cancerosos y sus metástasis (Effert P.J. et al., 1996; Cao Y. 1999).

El estudio de la angiogénesis sería además importante por su posible valor pronóstico. Se ha visto en diferentes tipos de cánceres que tumores altamente vascularizados están asociados al desarrollo de metástasis y a una reducción en la sobrevida del paciente. También que la cuantificación de

VEGF y bFGF y sus receptores en pacientes con cáncer se asocia a un grado y estadio más avanzados de la enfermedad (Nguyen M. et al., 1993; Nguyen M. et al., 1994; Fujimoto K. et al., 1991; Fox S.B. et al., 1997). Teniendo en cuenta los estudios anteriores se podrían establecer grupos con diferente grado de riesgo y administrar entonces terapias específicas para cada caso.

Se ha visto además, que un tumor que induce una fuerte RC puede generar este fenómeno frente a metástasis espontáneas (Bonfil R.D. et al., 1988) o incluso frente a tumores secundarios o metástasis experimentales diferentes al primario que en forma particular no son capaces de generar RC (Bonfil R.D. et al., 1988; Volpert O.V. et al., 1998; Kisker O. et al. 2001). Por esto último, podemos deducir que el estudio de los factores que gobiernan la RC tendría gran importancia clínica para tratar todo tipo de tumores, generen o no este fenómeno. Combinando estas ideas con las anteriores, podemos concluir que el estudio de los factores angiogénicos/angiostáticos responsables de la RC tendría una gran utilidad para desarrollar futuras terapias para el tratamiento del cáncer humano.

En este trabajo se analizaron cinco líneas celulares derivadas de distintos cánceres. Calu-6, originada a partir de un cáncer de pulmón humano, demostró, como se vio previamente, que era capaz de inducir una fuerte resistencia concomitante inhibiendo la angiogénesis tumoral a distancia y aumentando la apoptosis en los implantes tumorales secundarios (Bonfil R.D. et al., 1998b). La línea H460, también derivada de un carcinoma de pulmón humano, no mostró RC en ratones *nude*. También se estudiaron tres carcinomas mamarios murinos en ratones singeneicos de la cepa BALB/c: M3MC, M234m y M234p. Mientras que M3MC y M234p generaron RC frente a implantes subcutáneos y frente a inóculos endovenosos en el modelo de metástasis experimentales, M234m no mostró RC en ninguno de los dos modelos. La línea M234p indujo RC en ratones BALB/c

inmunocompetentes, así como en ratones *nude*, inmunosuprimidos. Sin embargo, en estos últimos la RC fue menor si tenemos en cuenta que la incidencia tumoral contralateral al tumor primario fue mayor que en ratones inmunocompetentes, y no se vio inhibición cuando el inóculo fue endovenoso. Por este motivo concluimos que M234p genera RC pero que en el mecanismo operante en este modelo tumoral estaría involucrado también algún fenómeno inmunológico.

Con el objeto de saber si el suero de los animales portadores de tumores que generaban RC tenía un efecto angiostático, probamos su actividad sobre la línea celular de endotelio de rata, RV-EC. El suero proveniente de ratones portadores Calu-6 produjo una inhibición de la proliferación de las células endoteliales significativamente mayor que el suero *nude* normal; en cambio, el suero proveniente de portadores H460 no mostró ser inhibitorio respecto a este último. Analizando el modelo M3MC pudimos ver que el suero de animales portadores produjo una inhibición de la proliferación de las células RV-EC, mientras que los sueros de ratones normales la estimularon. El efecto del suero proveniente de ratones portadores M234p fue inhibitorio si lo comparamos con su respectivo suero normal. En cambio, el suero proveniente de portadores M234m, que no mostró RC, estimuló la proliferación de RV-EC. Por ende, los sueros de los ratones portadores de las líneas que generaron RC mostraron una inhibición de la proliferación de las células endoteliales con respecto a su respectivo suero normal. Otros investigadores obtuvieron resultados similares a los nuestros, al ensayar la actividad antiproliferativa *in vitro* de sueros de ratones portadores de distintos tumores con actividad RC, sobre células endoteliales (O'Reilly M.S. et al., 1994; Kisker O. et al. 2001). En cambio, los sueros de los ratones portadores de tumores que en nuestro estudio no fueron capaces de generar RC no mostraron diferencias con respecto al suero normal, o dieron incluso un estímulo de la proliferación de RV-EC. Cuando se evaluó el efecto

de los MCs provenientes de las diferentes células tumorales sobre la proliferación de RV-EC, se obtuvieron resultados semejantes. Los MCs de Calu-6, M3MC y M234p mostraron una inhibición dosis respuesta de la proliferación, en cambio, H460 y M234m la estimularon.

Existen varias publicaciones donde se han estudiado la expresión de diferentes factores reguladores de la angiogénesis en el crecimiento de un tumor primario (Lannutti B.J. et al., 1997; Ambs S. et al., 1999; Chen Q-R. et al., 1999; Westphal J.R et al. 2000). Sin embargo, poco se sabe sobre qué factores regularían la RC. Volpert y colaboradores han estudiado el rol de la trombospondina en el fenómeno de RC y encontraron que esta molécula sería la responsable de la inhibición de metástasis experimentales en pulmón en ciertos modelos tumorales murinos (Volpert O.V. et al, 1998). Nosotros intentamos detectar angiostatina en los sueros de ratones portadores mediante la técnica de western blot, sembrando directamente hasta 200  $\mu$ g de proteína total del suero. No obstante ello, no se la pudo detectar en ningunos de los casos, y se procedió a la purificación de la muestra con lisina sefarosa, detectándose sólo plasminógeno, cuya concentración es mucho mayor que la angiostatina. Esto se podría deber a que la angiostatina se halle en concentraciones menores al límite de detección de la técnica de western blot o a que directamente no esté presente en nuestro sistema. Estos datos coinciden con los del grupo de J.R. Westphal (Westphal J.R. et al., 1999) y O. Kisker (Kisker O. et al., 2001) que no pudieron detectar angiostatina en suero de animales portadores de tumores. Nuestros resultados y los de estos investigadores, sin embargo, difieren en este aspecto de los obtenidos por el grupo de Li, que reporta haber detectado una banda muy tenue de angiostatina a partir de 150  $\mu$ g del suero de animales portadores del carcinoma de pulmón de Lewis, sin previa purificación (Li T.S. et al., 2001). Los datos del grupo de Li se contradicen con el trabajo en el cual se describió por primera vez la angiostatina, donde usando el mismo modelo se muestra



que, para su detección por western blot, fue necesaria una exhaustiva purificación de grandes volúmenes de fluidos de ratón (O'Reilly M.S. et al. 1994).

Recientemente, dos grupos de investigación han desarrollado un ELISA para detectar niveles precisos de angiostatina en orina (Cao Y. et al, 2000) y en sueros de pacientes con cáncer (Lijnen H.R. et al., 2001). H.R. Lijnen y colaboradores obtuvieron valores de angiostatina entre 0.24 y 6.7  $\mu\text{g/ml}$ , con una media y una SEM de  $1.62 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Ellos pudieron determinar la concentración exacta del plasminógeno en los sueros de pacientes, la cual fue de entre 4.3 y 28  $\mu\text{g/ml}$ , con una media y una SEM de  $15 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. En base a esos resultados hemos tratado de buscar una explicación a nuestra imposibilidad por hallar angiostatina circulante en los ratones portadores de tumores. Nosotros usamos 200  $\mu\text{l}$  de suero para la purificación de angiostatina con lisina sefarosa, los cuales equivalen aproximadamente a 14 mg de proteína total (J.A. Lozano et al., 1995). Basándonos en los datos obtenidos por el grupo de Lijnen, 3  $\mu\text{g}$  en promedio corresponderían a plasminógeno y, de estar presente, 0.324  $\mu\text{g}$  podría llegar a ser la cantidad de angiostatina en los 200  $\mu\text{l}$  de suero, cantidad de proteína habitualmente detectable por la técnica de western blot. No obstante ello, debería tenerse en cuenta que durante el proceso de purificación llevado a cabo, las moléculas de plasminógeno y angiostatina (y plasmina de estar presente) estarían compitiendo por el *binding* a la lisina sefarosa. Dado que el plasminógeno se halla 10 veces más concentrado que la angiostatina, el primero se uniría con mayor probabilidad a la lisina (de estar presente también la plasmina, la eficiencia de *binding* de la angiostatina descendería aún más). Suponiendo que ocurriera lo mismo en el caso de los ratones portadores de tumor, ésta sería una explicación alternativa, o adicional, a la planteada anteriormente de baja sensibilidad del método

usado, y que justificaría la detección de bandas de conspicuas de plasminógeno pero no de angiostatina. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la angiostatina, purificada de la manera antes explicada, está presente en pacientes que presentan otros tipos de cáncer (dato no mostrado). Por ejemplo, detectamos por Western blot intensas bandas correspondientes a angiostatina en ascitis de pacientes con cáncer de ovario purificada por lisina sefarosa, así como tenues bandas en los sueros correspondientes a las mismas pacientes. Estos resultados prueban que el método de detección de la angiostatina utilizado por nosotros se estaría llevando a cabo en forma apropiada. Los grupos de T. Migita y M. Volm detectaron, a su vez, angiostatina en el citoplasma de cortes de tumores de próstata y de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas, desconociéndose aún la razón de su presencia allí (Volm M. et al., 2000; Migita T. et al., 2001). Estas observaciones, conjuntamente con las mencionadas anteriormente en ascitis de pacientes con cáncer, indicarían que los niveles de angiostatina serían lo suficientemente altos como para ser detectados por las técnicas clásicas, sólo en aquellos casos en los que existe una alta densidad tumoral.

La ausencia de angiostatina circulante en nuestros modelos nos condujo a investigar qué ocurría con respecto a la generación de esa molécula *in vitro*, a partir de su precursor el plasminógeno. Los MCs secretados por las células tumorales que mostraron capacidad de generar el fenómeno de RC (Calu-6, M3MC y M234p) fueron capaces de convertir *in vitro* al plasminógeno en angiostatina. En cambio, los MCs de las células tumorales que no indujeron el fenómeno (H460 y M234m) no produjeron la proteólisis del plasminógeno. Al igual que nosotros, O. Kisker et al. y J.R. Westphal et al. detectaron angiostatina *in vitro* al incubar los MCs de las líneas tumorales con plasminógeno. Sin embargo, como se explicó anteriormente, no pudieron detectar angiostatina en el suero de animales portadores de esos tumores,

aún cuando sí detectaban grandes cantidades de plasminógeno (Westphal J.R. et al., 1999; Kisker O. et al., 2001).

Una pregunta aún no respondida planteada en su momento por I.J. Fidler, cuestionaba la incapacidad de la angiostatina para inhibir el crecimiento del tumor primario a través de la inhibición de la angiogénesis (Fidler I.J. et al., 1994). Al respecto, se ha planteado la hipótesis de que en el microambiente circundante al tumor primario, donde se acumularían inductores e inhibidores de la angiogénesis, los primeros serían más eficientes, superando así los efectos de los inhibidores y permitiendo entonces que ocurra la angiogénesis. Contrariamente, se cree que en circulación, los inductores de la neovascularización podrían ser más lábiles que los inhibidores, creándose así un ambiente antiangiogénico sistémico que mantendría a los pequeños tumores secundarios o metástasis incipientes en un estado de latencia.

A partir de estudios llevados a cabo *in vitro*, se ha postulado la existencia de varias enzimas responsables de la generación de angiostatina a partir del plasminógeno. Se trata fundamentalmente de serino y metaloproteinasas secretadas por el tumor y/o por células infiltrantes (O'Reilly M.S. et al., 1999; Lijnen H.R. et al., 1998; Patterson B.C. et al., 1997; Dong Z. et al., 1997; Gately S. et al., 1996; Stathakis P. et al., 1997; Gately S. et al., 1997; O'Mahony C.A. et al., 1998; Westphal J.R. et al., 2000a; Morikawa W. et al., 2000; Heidtmann H.H. et al., 1999). Con el objetivo de identificar cuál era la enzima responsable de la generación de angiostatina observada *in vitro* en nuestro sistema, se utilizaron diferentes inhibidores proteásicos. Sólo el uso de inhibidores de serinoproteasas inhibió claramente la producción de angiostatina en los tres tipos tumorales que demostraron ser capaces de generarla. En cuanto a la serinoproteasa activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, las líneas que generan angiostatina la secretan. El uso de  $\alpha_2$

antiplasmina y anticuerpos neutralizantes anti uPA inhibieron el proceso de conversión de plasminógeno a angiostatina en el caso de Calu-6 y M234p, pero no en el de M3MC. Por ende, Calu-6 y M234p generarían angiostatina a partir del procesamiento de plasminógeno por uPA vía plasmina. Estos datos coinciden con los obtenidos por varios grupos (Gately S. et al., 1996; Gately S. et al., 1997; Westphal J.R. et al., 2000). En cambio, M3MC produciría angiostatina vía serinoproteasas, pero por un mecanismo diferente independiente de la generación de plasmina.

Cabe destacar la acción dual de las proteasas durante el proceso tumoral (Pepper M.S., 2001). Por un lado, las proteasas son secretadas tanto por las células tumorales y/o vecinas para degradar la membrana basal y la matriz extracelular facilitando la invasión primaria y luego la intra y extravasación durante el proceso metastásico; como por las células endoteliales estimuladas durante la angiogénesis, que secretan proteasas que intervienen en la degradación de la matriz extracelular para moverse y formar el neovaso. Por otro lado, como se explicó anteriormente, también estarían involucradas en la producción de factores inhibidores de la angiogénesis como la angiostatina (O'Reilly M.S. et al., 1999; Wojtukiewicz M. Z. et al., 2001).

Dado que una amplia variedad de factores puede mediar la angiogénesis, decidimos estudiar otros factores angiogénicos/angiostáticos en sueros y MCs correspondientes a los modelos bajo estudio. Este análisis reveló que la RC mostrada por el tumor Calu-6 podría estar debida además a una concentración significativamente mayor de endostatina (aproximadamente el doble) comparada con el suero normal y con el suero proveniente de portadores H460, que no generó RC. Además, el suero de portadores H460 tenía una concentración de VEGF dos veces mayor que los portadores de Calu-6, que no mostraron diferencias con el suero de animales

sanos. En cuanto a los tumores murinos, los sueros de ratones portadores M234m, que no mostraron RC, tenían casi 5 veces más VEGF que los portadores M234p. Sin embargo, no se vieron diferencias significativas entre la producción de endostatina entre los sueros de ambos tumores. El suero de portadores M3MC mostró una concentración de endostatina, que resultó ser significativamente mayor que el suero normal. Paradójicamente, en estos animales, las concentraciones de VEGF también fueron mayores que en los portadores que inducían RC.

En los casos de Calu-6 y M234p hallamos entonces una asociación entre la generación de RC y la producción de angiostatina *in vitro*, así como una alta concentración de endostatina y una disminución de la producción de VEGF en el suero de los ratones portadores en comparación con su respectivo suero normal. En cambio, en el caso de M3MC la RC se asociaría con la generación de angiostatina *in vitro* y una producción de endostatina mayor en el suero de portadores con respecto al suero normal. Los modelos que no dieron RC, M234m y H460, no generaron angiostatina *in vitro* y, a su vez, mostraron una alta concentración de VEGF en el suero de los animales portadores. Cabe destacar que, en cuanto a la concentración de endostatina analizada en el suero de huéspedes portadores M234m no hubo diferencias con el suero de portadores M234p.

Al analizar los mismos factores en los MCs provenientes de los diferentes tumores se pudo ver que el MC de H460 poseía una mayor concentración de VEGF que el MC de Calu-6. Paradójicamente, el MC de M234p, que induce RC, mostró una concentración de este factor significativamente mayor que M3MC y M234m. En cuanto a la generación de bFGF, analizada solamente en las líneas de tumores humanos debido a limitaciones del kit (no existen al momento kits para detección de bFGF murino), el MC de H460 mostró una concentración significativamente mayor

que el MC de Calu-6, que genera RC. Al analizar la producción de endostatina *in vitro* (el kit sólo detecta endostatina murina), los MCs provenientes de los tumores murinos que generaron RC tenían una concentración de este factor mayor que aquellos que no lo generaban. Aunque estos datos nos dan información sobre el sistema que estamos estudiando, los resultados obtenidos con sueros de animales portadores probablemente serían más cercanos a lo que estaría ocurriendo *in vivo*.

Un experimento que nos ayudaría a comprender la importancia real de estos factores en nuestro sistema consistiría en la administración sistémica de anticuerpos neutralizantes contra los diferentes factores analizados. Varios autores han demostrado que la administración sistémica de anticuerpos monoclonales contra bFGF producen una inhibición del crecimiento tumoral (Matsuzaki K. et al., 1989; Hori A. et al., 1991). Otros autores han administrado intratumoral o intraperitonealmente el cDNA de diferentes factores antiangiogénicos como la angiostatina, endostatina y TIMP-2 y vieron que había una inhibición del crecimiento del tumor primario y de las metástasis (Sacco M.G. et al. 2001). Estos experimentos son de suma importancia pues ayudarían a desarrollar futuras terapias antiangiogénicas.

A pesar de que diversos modelos experimentales demuestran claramente la existencia del fenómeno de RC, y aún cuando algunas observaciones clínicas lo sugerirían, se desconoce si el fenómeno de inhibición de metástasis por la presencia de un tumor primario obra en pacientes con cáncer. Por obvias cuestiones éticas esto nunca ha de probarse. A pesar de ello, y teniendo en cuenta estas limitaciones, nos pareció importante analizar los mismos factores angiogénicos y antiangiogénicos que se utilizaron en modelos murinos en sueros de pacientes con cáncer. Para ello, se investigaron dichos factores principalmente en dos grupos de pronósticos presuntamente opuestos como es el caso de mujeres con cáncer

de mama con infiltración en ganglio axilar (asociado a mal pronóstico) y otras axilas negativas (asociadas a mejor pronóstico). El objetivo de esto no fue intentar asociar la expresión de esos factores con la progresión de la enfermedad de cada paciente, lo cual hubiera significado analizar un mayor número de casos a lo largo de un período de tiempo mayor que excede al de esta tesis, sino tener información sobre la presencia de factores reguladores de la angiogénesis en pacientes con cáncer, situándonos más cerca del caso clínico-oncológico.

A pesar de que se observaron diferencias entre el grupo de mujeres sanas y el de pacientes con cáncer de mama, las mismas no fueron significativas para la producción de bFGF y VEGF. Esto mismo se observó al comparar los grupos axila positiva y negativa con respecto al control. Varios grupos han encontrado diferencias significativas entre los niveles de VEGF de pacientes con cáncer de mama en comparación con el grupo control (Yamamoto Y. et al., 1996; Heer K., et al., 2001; Belgore F.M. et al., 2001). Tampoco se encontraron diferencias entre los demás parámetros relacionados con pronóstico (tamaño y estadio tumoral, receptores para estrógeno y progesterona y presencia o no de metástasis) y el grupo control. Las diferencias en los resultados hallados por nosotros y dichos autores pueden estar debidas probablemente al pequeño tamaño de la muestra analizada en nuestro caso (30 pacientes).

Se intentó luego detectar angiostatina con la técnica de western blot en los sueros de las pacientes que, previamente, se purificaron con lisina séfara. Sin embargo, tal como ocurrió en las muestras murinas, donde sólo se detectó plasminógeno, tampoco se pudo revelar la presencia de angiostatina en ninguna de las muestras de pacientes. Esto mismo fue reportado por el grupo de J.R. Westphal que no halló angiostatina ni en suero ni en plasma de pacientes con melanoma y cáncer de próstata, pero sí en

fluido cerebro espinal de pacientes con tumores cerebrales (Westphal J.R. et al., 1999). Las posibles explicaciones planteadas anteriormente para explicar la imposibilidad de detectar angiostatina en las muestras murinas, serían válidas también para nuestras observaciones en los sueros de las pacientes con cáncer de mama.

Siendo que, las MMPs juegan un rol importante en el proceso de invasión tumoral y en la formación de metástasis (Ahmad A. et al., 1996; Wojtowicz-Praga S.M. et al., 1997; Bonfil D., 1998a) nos propusimos evaluar la producción de MMPs en las pacientes con cáncer de mama analizadas. El grupo de pacientes con cáncer de mama mostró una producción de MMP-9 significativamente mayor que el grupo control sano. El grupo axila positiva, con supuestamente un peor pronóstico, también mostró una mayor cantidad de MMP-9 en suero que el grupo control, aunque esas diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto del grupo axila negativa, cuyo pronóstico sería más favorable. A su vez, no se detectaron diferencias en cuanto a la producción de MMP-2 entre los grupos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los demás parámetros asociados al pronóstico y el grupo control para la presencia de MMPs. Nuestros resultados respecto de ambas MMPs coinciden con los obtenidos por el grupo de E. Farias y colaboradores (Farias E. et al, 2000).

La fuerte asociación encontrada entre el fenómeno de RC y la generación de angiostatina *in vitro*, conjuntamente con la baja concentración de VEGF y la alta concentración de endostatina detectada en sueros de animales portadores en los modelos aquí estudiados, nos ayudaría a entender cómo se regula este proceso. Como puede verse en este y otros estudios, la angiogénesis tumoral es un delicado proceso controlado por un gran número de factores angiogénicos y angiostáticos. En consecuencia, una terapia antiangiogénica con fines terapéuticos no debería concentrarse en un



único factor. El estudio de más modelos y más factores ayudarían a entender cómo el tumor primario controla las metástasis y colaboraría al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Handwritten signature of Mercedes Binda in black ink, featuring a stylized 'M' and 'B'.

M. MERCEDES BINDA

Handwritten signature of Daniel Bonfil in black ink, featuring a stylized 'D' and 'B'.

R. DANIEL BONFIL

## *Referencias*

## Referencias

Achen M.G. and Stacker S.A. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int. J. Exp. Path* **79**: 255-265, 1998.

Ahmad A. and Hart I.R. Biology of the Tumor Micrometastasis. *J. Hematother.* **5**: 525-535, 1996.

Ambis S., Dennis S., Fairman J., Wright M. and Papkoff J. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells. *Cancer Res.* **59**: 5773-5777, 1999.

American Joint Committee on Cancer, Cancer Staging Manual, capítulo 25, páginas 171-180, 1997.

Anand-Apte B., Bao L., Smith R., Iwata K., Olsen B.R., Zetter B. and Apte S.S. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem. Cell Biol.* **74**: 853-862, 1996.

Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., Van Der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman, G and Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-967, 1997.

Attia M.A. and Weiss D.W. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res.* **26**: 1787-1800, 1966.

Bashford E., Murray J., Haaland M. et al. General results of propagation of malignant new growths. En: Third scientific report on the investigations of the Imperial Research Fund. Vol 3. London: Taylor and Francis, 262-268, 1908.

Beck L. and D'Amore P.A. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* **11**: 365-373, 1997.

Belgore F.M., Lip G.Y.H., Bareford D., Wadley M., Stonelake P. and Blann A. Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, Flt-1, in haematological cancers: a comparison with breast cancer. *Am. J. Hematology* **66**: 59-61, 2001.

Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**: 404-407, 1997.

Bonfil R.D., Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D., Meiss R.P. & Pasqualini C.D. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastasis. *Int. J. Cancer* **41**: 415-422, 1988.

Bonfil R.D. Invasión y metástasis. En: *Bases de oncología molecular*. Bonfil R.D., Scharovsky O.G. y colaboradores 179-196, Editorial Dunken, Bs. As. 1998a.

Bonfil R.D., Bustuoabad O.D., and Binda M.M. Antiangiogenesis and apoptosis as mediators of concomitant tumor resistance induced by Calu-6, a human lung carcinoma cell line, in *nude* mice. *Oncology Res.* **10**: 15-21, 1998b.

Boquete A. y Binda M.M. Factores de crecimiento. En: *Bases de oncología molecular*. Bonfil R.D., Scharovsky O.G. y colaboradores. 133-148, Editorial Dunken, Bs. As. 1998.

Brooks P.C., Rosenfeld M., Reisfeld R., Hu T., Klier G., Cheresh D.A. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenesis blood vessels. *Cell* **79**: 1157-1164, 1994.

Cao Y., Ji R.W., Davidson D., Schaller J., Marti D., Sohndel S., Ms Cance S.G., O'Reilly M.S., Llinas M., Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 29461-29467, 1996.

Cao Y., Chen A., An S.S.A., Ji R.W., Davidson D., Llinas M. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 22924-22928, 1997.

Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* **84**: 643-650, 1999.

Cao Y., Veitonmaki N., Keough K., Cheng H., Lee L. S. and Zurakowski D. elevated levels of urine angiostatin and plasminogen/plasmin in cancer patients. *Int. J. Mol. Med.* **5**: 547-51, 2000.

Chen C., Parangi S., Tolentino M.J. and Folkman J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res.* **55**: 4230-4233, 1995.

Chen Q-R., Kumar D., Stass S.A. and Mixson A.J. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res.* **59**: 3308-3312, 1999.

Colombo L.L., Bonaparte Y.P., Klein S., Stillitane-D'Elia I. Selección in vivo de una línea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. *Medicina (Buenos Aires)* **40**: 827-828, 1980.

Colville-Nash P.R and Willoughby D.A. Review. *Mol. Med. Today* 14-23, 1997.

D'Amore P.A., Shan Y. and Darland D.C. Angiogenesis. *Science & Medicine* 44-53, 1999.

De Wyss W.D. Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor related systemic growth-retarding factors. *Cancer Res.* **32**: 374-379, 1972.

Dhanabal M., Ramchandran R., Waterman M.J.F., Lu, H., Knebelmann B., Segal M. and Sukhatme V.P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 11721-11726, 1999.

Di Gianni P.D., Bonfil R.D., Genovese, J., Dran G., Meiss R.P., and Bustuoabad O. D. Abrogation of neovascularization in tumor bearing mice: a putative explanation of concomitant resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **14**: 189-195, 1995.

Di Gianni P., Franco M., Meiss R.P., Vanzulli S., Piazzon I., Pasqualini C.D. and Ruggiero R.A. Inhibition of metastasis by a serum factor associated to concomitante resistance by unrelated murine tumors. *Oncol. Rep.* **6**: 1073-1084, 1999.

Diglio C.A., Liu W., Grammas P., Giacomelli F. and Wiener J. Isolation and characterization of cerebral resistance vessel endothelium in culture. *Tissue Cell* **25**: 833-846,1993.

Dong Z., Kumar R., Yang X. and Fidler I.J. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **88**: 801-810, 1997.

Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M. and Dvorak A.M. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth factor, Microvascular Hyperpermeability and Angiogenesis. *Am. J. Pathology* **146**: 1029-1039, 1995.

Effert P.J., Gastl G. and Strohmeyer. Current and future strategies to block tumor angiogenesis, invasion and metastasis. *W. J. Urology* **14**: 131-140, 1996.

Ehrlich P. Experimentelle Carcinomstudien au Mäusen. En: Arbeiten aus dem Koiglichen Institut für Experimentelle Therapie zu Frankfurt/AM. Jena: Fisher, 77-103, 1906.

Farias E., Ranuncolo S., Cresta C., Specterman S., Armanasco E., Varela M., Lastiri J., Pallotta M.G., Bal de Kier Joffe E. and Puricelli L. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int. J. Cancer* **89**: 389-94, 2000.

Fidler I.J. and Ellis L.M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**: 185-188, 1994.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**: 1182-1186, 1971.

Folkman J. and Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-446, 1987.

Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *New Engl. J. Med.* **333**: 1757-1763, 1995a.

Folkman J. Tumor Angiogenesis. En: Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Liotta L.A., editors. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W. B. Saunders, 206-226, 1995b.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**: 27-31, 1995c.

Fox S.F. and Harris A.L. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Inv. N. Drugs* **15**: 15-28, 1997.

Franco M., Bustuoabad O.D., Di Gianni P.D., Goldman A., Pasqualini C.D. and Ruggiero R.A. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *Br. J. Cancer* **74**: 178-186, 1996.

Franco M., Bustuoabad O.D, Di Gianni P., Meiss R.P., Vanzulli S., Buggiano V., Pasqualini C.D. and Ruggiero R.A. Two different types of concomitante resistance induced by murine tumors: morphological aspects and intrinsic mechanisms. *Oncol. Rep.* **7**: 1053-1063, 2000.



Fujimoto K., Ichimori Y., Kakizoe T., Okajima E., Sakamoto H., Sugimura T., Terada M. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**: 386-392,1991.

Gately S., Twardowski P., Stack M. S., Patrick M., Boggio L., Cundiff D. L., Schnaper H. W., Madison L., Volpert O., Bouck N., Enghild J., Kwaan H. C., and Soff G. A. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.* **56**: 4887-4890, 1996.

Gately S., Twardowski P., Stack M. S., Cundiff D. L., Grella D., Castellino F. J., Enghild J., Kwaan H. C., Lee F., Kramer R. A., Volpert O., Bouck N., and Soff G. A. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 10868-10872, 1997.

Gorelik E. Antimetastatic concomitant immunity. En: *Tumour, Invasion and Metastasis*, Eds Liotta & Hart, pag 113, 1982.

Gorelik E. Resistance of tumor bearing mice to a secondary tumor challenge. *Cancer Res.* **43**: 138-145, 1983.

Gorrin-Rivas M.J., Arii S., Furutani M., Misumoto M., Mori A., hanaki K., Maeda M., Furuyama H., Kondo Y. and Imamura M. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **6**: 1647-54, 2000.

Gradishar W.J. An overview of clinical trials involving inhibitors of angiogenesis and their mechanism of action. *Inv. N. Drugs* **15**: 49-59, 1997.

Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T. and Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.* **51**: 15-36, 2001.

Griffioen A.W., Barendsz-Janson A.F., Mayo K.H. and Hillen H.F.P. Angiogenesis, a target for tumor therapy. *J. Lab. Clin. Med.* **132**: 363-368, 1998.

Gude R.P., Binda M.M., López Presa H., Klein-Szanto A.J.P., Bonfil R.D. Studies on the mechanisms responsible for inhibition of experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma by pentoxifylline. *J. Biomed. Sci.* **6**: 133-141, 1999.

Gude R.P., Binda M.M., Boquete A.L. and Bonfil R.D. Inhibition of endothelial cell proliferation and tumor-induced angiogenesis by pentoxifylline. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 625-630, 2001.

HAMPL M., Tanaka T., Albert P.S., Lee J., Ferrari N. and Fine H.A. Therapeutic effects of viral vector-mediated antiangiogenic gene transfer in malignant ascites. *Hum. Gene Ther.* **12**: 1713-29, 2001.

Hatton M.W., Day S., Southward S.M., Dereske M., Ross B., Seidlitz E., Singh G. and Richardson M. Metabolism of rabbit angiostatin glycoforms I and II in rabbits: angiostatin-I leaves the intravascular space faster and appears to have greater anti-angiogenic activity than angiostatin-II. *J. Lab. Clin. Med.* **138**: 83-93, 2001.

Healy D.L., Rogers P.A.W., Hi L. and Wingfield M. Angiogenesis: a new theory of endometriosis. *Hum. Reprod. Update* **4**: 736-740, 1998.

Heer K., Kumar H., Read J.R., Fox J.N., Monson J.R. and Kerin M.J. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin. Cancer Res.* 7: 3491-94, 2001.

Heidtmann H.H., Nettelbeck D.M., Mingels A., Jäger R., Welker H.G. and Kontermann R.E. Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br. J. Cancer* 81: 1269-1273, 1999.

Hernández-Barrates S., Toth M., Bernardo M.M., Yurkova M., Gervasi D.C., Raz Y., Sang Q.X.A., and Rafael Fridman R. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 275: 12080-12089, 2000.

Heussen C. and Dowdle E.B. Electrophoretic Analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202, 1980.

Holgrem L., O'Reilly M.S. and Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1: 149-153, 1995.

Hori A., Sasada R., Matsutani E., Naito K., Fujita T., Kozai Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* 51: 6180-6184, 1991.

Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J., Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267: 26031-26037, 1992.

Takeji D. and Teicher B.A. Preclinical studies of the combination of angiogenesis inhibitors with cytotoxic. *Inv. N. Drugs* 15: 39-48, 1997.

Kato Y., Nakayama Y., Umeda M. and Miyazaki K. Induction of 103 kDa gelatinase/type IV collagenase by acid culture conditions in mouse metastatic cell lines. *J. Biochem.* 267: 11424-11430, 1992.

Kendall R.L. and Thomas K.A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10705-10709, 1993.

Kerbel R. S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 13: 31-36, 1991.

Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S., Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 362: 841-844, 1993.

Kisker O., Onizuka S., Banyard J., Komiyama T., Becker C.M., Achilles E.G., Barnes C.M., O'Reilly M.S., Folkman J. and Pirie-Shepherd S.R. generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 61: 7298-7304, 2001.

Klauber N., Rohan R.M., Flynn E. and D'Amato R.J. Critical Components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat. Med.* 3: 443-446, 1997.

Kondo S., Asano M., Matsuo K., Ohmori I. and Suzuki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the

sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Bioch.Bioph. Acta* **1221**: 211-214, 1994.

Kong H.L. and Crystal R.G. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. Review *J. Nat. Canc. Inst.* **90**: 273-286, 1998.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.

Landis S.H., Murray T., Bolden S. and Wingo P.A. *Cancer Statistics*, 1998.

Lannutti B.J., Gately S.T., Quevedo M. E., Soff G.A., and Paller A. S. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* **57**: 5277-5280, 1997.

Lembach M., Linenberg C., Sathe S., Beaton A., Ucakhan O., Asbell P., Sack R. Effect of external ocular surgery and mode of post-operative care on plasminogen, plasmin, angiostatin and alpha(2)-macroglobulin in tears. *Curr. Eye. Res.* **22**: 286-94, 2001.

Li T. S., Kaneda Y., Ueda K., Hamano N., Zempo N. and Esato K. The influence of tumour resection on angiostatin levels and tumour growth- an experimental study in tumour bearing mice. *Eur.J. Cancer* **37**: 2283-2288, 2001.

Lijnen H.R., Uguwu, F., Bini, A. and Collen D. Generation of angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* **37**: 4699-4702, 1998.

Lijnen H.R., Bloemmen F., Vereecken A. and Collen D. Enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of angiostatin-like plasminogen moieties in biological samples. *Thromb. Res.* **102**: 53-59, 2001.

Lozano J.A., Galindo J.D., Garcia-Borrón J.C., Martínez Liarte J.H., Peñafiel R., Solano F. *Bioquímica para Ciencias de la Salud*. Interamericana Mc Graw-Hill, página 77, 1995.

Lucero Gritti, M.F., García de Palazzo I.E., Meiss R.P and Bonfil R.D. Establishment and characterization of a new metastatic cell line (M3MC) derived from a murine mammary tumor. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **13**: 113-119, 1994.

Malonne H., Langer I., Kiss R. and Atassi G. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin. Exp. Metastasis* **17**: 1-14, 1999.

Matsuzaki, K. et al. Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that blocks its biological activity: invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9911-9915, 1989.

McNamara D.A. Harmeý J.H., Walsh T.N., Redmond H.P. and Bouchier-Hayes D.J. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br. J. Surgery* **85**: 1044-1055, 1998.

Meiss R.P., Bonfil R.D., Ruggiero R. A. and Pasqualini C.D. Histologic aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**: 1163-1175, 1986.

Migita T., Oda Y., Naito S., Morikawa W., Kuwano M. and Tsuneyoshi M. The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7: 2750-2756, 2001.

Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *Lab. Invest.* 71: 374-9, 1994.

Moore R., Casey G., Brookes S., Dixon M., Peters G., Dickson C. Sequence, topography and protein coding potential of mouse *int-2*: a putative oncogene activated by mouse mammary tumour virus. *EMBO J.* 5: 919-924, 1986.

Morelli D., Lazzerini D., Cazzaniga S., Squicciarini P., Bignami P., Maier J.A.M., Scondrini L., Menard S., Colnaghi M.I. and Balsani A. Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. *Clin. Cancer Res.* 4: 1221-1225, 1998.

Morikawa W., Yamamoto K., Ischikawa S., Takemoto S., Ono M., Fukushi J., Naito S., Nozaki C., Iwanaga S. and Kuwano M. Angiostatin Generation by Cathepsin D Secreted by Human Prostate Carcinoma Cells. *J. Biol. Mol.* 275: 38912-38920, 2000.

Moser T. L., Stack M.S., Asplin J., Enghild J.J., Hojrup P., Everitt L., Hubchak S., Schnaper H.W. and Pizzo S.V. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2811-2816, 1999.

Moser T.L., Kenan D.J., Ashley T.A., Roy J.A., Goodman M.D., Misra U.K., Cheek D.J. and Pizzo S.V. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is

active in ~~ATP~~ synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6656-6661, 2001.

Nguyen M., Watanabe H., Budson A.E., Richie J.P. and Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J. Nat. Cancer Inst.* **85**: 241-242 1993.

Nguyen M., Watanabe H., Budson A.E., Richie J.P. Hayes D. and Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J. Nat. Cancer Inst.* **86**: 356-361, 1994.

Nguyen M. Angiogenic factors as tumor markers. *Inv. New Drugs* **15**: 29-37, 1997.

O'Mahony C.A., Seidel A., Albo D., Chang H., Tuszynski G.P. and Berger D.H. Angiostatin generation by human pancreatic cancer. *J. Surg. Res.* **77**: 55-8, 1998.

O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W. S., Cao Y., Sage E.H. and Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328, 1994.

O'Reilly M.S., Holmgren L., Chen C. and Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.* **2**: 689-692, 1996.

O'Reilly M.S. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* **79**: 273-294, 1997a.



O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane WS., Flynn E., Birkhead J.R. Olsen B.R. Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285,1997b.

O'Reilly M.S., Wiederschain D., Stetler-Stevenson W.G. and Folkman J. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J. Biol. Chem.* **274**: 29568-29571, 1999.

Paciotti G.F., Simpson B., Soltysiak K.A., Myer L.D., Fogler W.E., Ruiz A., Kough E., Fortier A.H. and Tamarkin L. Measurement of circulating levels of endogenous endostatin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **40**: 66, 1999.

Patterson B.C. and Sang Q.X.A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrylisn (MMP-7) and gelatinase B/Type IV Collagenase(MMP-9) *J. Biol Chem* **272**: 28823-28825,1997.

Patterson C. and Runge M.S. Therapeutic angiogenesis. The new electrophysiology? *Circulation* **99**: 2614-2616, 1999.

Pepper M.S. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **86**: 346-55, 2001.

Pitot H.C. El lenguaje de la oncología. En: *Fundamentos de Oncología*. Editorial Reverté. Pag. 13-24, 1981.

Pötgens A.J.G., Lubsen N.H., Van Altena M.C., Schoenmakers J.G.G., Ruiter D.J. and de Wall R.M.W. *Am.J.Pathology* **146**: 197-209, 1995.

Prehn R.T. Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance. *Cancer Res.* **53**: 3266-3269, 1993.

Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D., Bonfil R.D. et al. "Concomitant immunity" in murine tumors on nondetectable immunogenicity. *Br. J. Cancer* **51**:37-48; 1985.

Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D., Cramer P., Bonfil, R.D. and Pasqualini C.D. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing nonimmunogenic tumors. *Cancer Res.* **50**: 7159-7165, 1990.

Sacco M.G., Cato E.M., Ceruti R., Soldati S., Indraccolo S., Caniatti M., Scanziani E. and Vezzoni P. *Gene Ther.* **8**: 67-70, 2001.

Salven P., Routsalainen T., Mattson K. and Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **79**: 144-146, 1998.

Sheen-Chen S., Chen H., Eng h., Sheen C. and Chen W. Serum levels of matrix metalloproteinase 2 in patients with breast cancer. *Cancer letters* **173**: 79-82, 2001.

Shichiri M. and Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J.* **15**: 1044-53, 2001.

Sim B.K., O'Reilly M.S., Liang H., Fortier A.H., He W., Madsen J. W., Lapcevich R. and Nacy C.A. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* **57**: 1329-34, 1997.

Smith S.K. Angiogenesis and reproduction. *B. J. Obstet. Gynaecol.* **108**: 777-783, 2001.

Ständker L., Schrader M.K., Jürgens M., Forssmann W.G, Preissner K.T. Isolation and characterisation of the circulating form of human endostatin. *FEBS Let.* **420**: 129-133, 1997.

Stathakis P., Fitzgerald M., Matthias L.J., Chesterman C.N. and Hogg P.J. Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. *J. Biol. Chem.* **272**: 20641-20645, 1997.

Sugarbaker E.V., Thornthwaite J. and Ketcham A.S. En: *Cancer, Invasion and Metastasis: Biological mechanisms and Therapy*, eds Day, S.B., Myers, W.P.L., Stansly P., Garattini S and Lewis M.G. Raven, New York, 227-240, 1977.

Tabone M.D., Landman-Parker J., Arcil B., Coudert M.C., Gerota I., Benbunan M., Leverger G. and Dosquet C. Are basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor prognostic indicators in pediatric patients with malignant solid tumors? *Clin. Cancer Res.* **7**: 538-548, 2001.

Taira M., Yoshida T., Miyagagua K., Sakamoto H., Terada M., Sugimura T. cDNA sequence of human transforming gene *hst* and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2980-2984, 1987.

Takigawa N., Segawa Y., Fujimoto N., Hotta K. and Eguchi K. Elevated vascular endothelial growth factors levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res.* **18**: 1251-1254, 1998.

Tarui T., Lindsey A., Miles L.A. and Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin  $\alpha_v\beta_3$  in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 39562-68, 2001.

Troyanovsky B., Levchenko T., Mansson G., Matvijenko O and Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* **152**: 1247-1254, 2001.

Volm M., Mattern J. and Koomagi R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**: 3236-3240, 2000.

Volpert O.V., Lawler J. and Bouck N.P. A human Fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastasis via thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6343-6348, 1998.

Westphal J.R., Van't Hullenaar R.G.M., Eggermont A.A.M., Ruitter D.J. and De Waal R.M.W. *In vitro* and *in vivo* angiostatin generation by human tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res USA* **40**: 67, 1999.

Westphal J.R., Van't Hullenaar R., Geurts-Moespot A., Sweep F.C.J.G., Verheijen J.H., Bussemakers M.M.G., Askaa J., Clemmensen I., Eggermont A.A.M., Ruitter D.J. and De Waal R.M.W. Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. *Int. J. Cancer* **86**: 760-767, 2000a.

Westphal J.R., Van't Hullenaar R.G.M., Peek R, Willems RW, Crickard K., Crickard U., Askaa J., Clemmensen I., Ruitter D.J. and De Waal R.M.W. Angiostatin balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, Il-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts *in vivo*. *Int. J. Cancer* **86**: 768-776, 2000b.

Wiman B. and Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* **272**: 549-550, 1978.

Wojtowicz-Praga S.M., Dickson R.B. and Hawkins M.J. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Inv. N. Drugs* **15**: 61-75, 1997.

Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Klement P., Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* **3**: 371-84, 2001.

Wu Z., O'Reilly, M. S., Folkman, J., and Shing, Y. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun.* **236**: 651-654, 1997.

Yamamoto Y., Toi M., Kondo S., Matsumoto T., Suzuki H., Kitamura M., Tsuruta K., Tanigushi T., Okamoto A., Mori T., Yoshida M., Ikeda T. and Tominaga T. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2**: 821-826, 1996.

Yokoyama Y., Dhanabal M., Griffioen A,W., Sukhatme V. P. and Ramakrishnan S. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res.* **60**: 2190-2196, 2000.

Yuhas J.M., Pazmiño N.H and Wagner E. Development of concomitant immunity in mice bearing the weakly immunogenic line 1 lung carcinoma. *Cancer Res.* **35**: 237-241, 1975.

Zucker S., Cao J. and Chen W.T. Critical appraisal of the use of metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* **19**: 6642-50, 2000.

### **Sitios consultados en Internet**

Sitios del National Cancer Institute con actualización sobre ensayos clínicos en los que se están utilizando inhibidores angiogénicos:  
<http://www.clinicaltrials.nci.nih.gov>.

Sitio de Entremed, compañía que realiza estudios sobre angiostatina y otras moléculas antiangiogénicas: <http://www.entremed.com>