

Tesis de Posgrado

Modulación del infiltrado inflamatorio en el desarrollo tumoral : efecto de citoquinas y estudio de la angiogénesis

Gazzaniga, Silvina N.

2003

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

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

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

Cita tipo APA:

Gazzaniga, Silvina N.. (2003). Modulación del infiltrado inflamatorio en el desarrollo tumoral : efecto de citoquinas y estudio de la angiogénesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3544_Gazzaniga.pdf

Cita tipo Chicago:

Gazzaniga, Silvina N.. "Modulación del infiltrado inflamatorio en el desarrollo tumoral : efecto de citoquinas y estudio de la angiogénesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3544_Gazzaniga.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**«MODULACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO
EN EL DESARROLLO TUMORAL. EFECTO DE
CITOQUINAS Y ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS»**

Autor: **Lic. Silvina N. Gazzaniga**

Directores: **Dra. Rosa Wainstok**
Dr. José Mordoh

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires

y
Fundación Instituto Leloir

Marzo de 2003

3544

3544

RESUMEN

Existen evidencias que tanto las células endoteliales presentes en la vasculatura de un tumor como las propias células tumorales liberan factores que promueven la mutua proliferación. Asimismo, los leucocitos que llegan al sitio tumoral atraídos por estímulos quimiotácticos pueden contribuir de manera importante a la progresión o regresión del tumor, lo que pone de manifiesto un alto grado de dependencia entre estos tres grupos celulares.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue investigar la interrelación entre las células endoteliales (CE) y las células inflamatorias responsables de la inmunidad innata en el desarrollo tumoral. Para ello, se estudió el desarrollo de la neovascularización en tumores mamarios murinos de distinto comportamiento biológico, observándose que el tipo histológico (lobulillar o ductal) no guarda relación con ningún perfil angiogénico particular. Sin embargo, se encontró que la tasa de crecimiento y la capacidad de producir metástasis están acompañadas por un desarrollo microvascular más activo.

Esto evidencia un comportamiento de valor pronóstico como lo observado para tumores humanos y destaca la utilidad del anticuerpo monoclonal MEC 13.3 anti-CD31. Este mismo anticuerpo se utilizó acoplado a esferas inmunomagnéticas para el aislamiento de CE de tejidos normales y neoplásicos con el objeto de establecer líneas que permitan estudiar la heterogeneidad fenotípica y funcional de las CE. Si bien no se logró reproducir el microambiente tumoral en cultivo para perpetuar el crecimiento *in vitro* de las CE derivada de tumores, se logró establecer una línea de CE derivadas de tejido normal renal. Características como la expresión de CD31, moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y ELAM-1, expresión del factor de von Willebrand, la captación con avides de LDL acetilado y la sensibilidad a

Shigatoxina-1 (13-20%) definen el perfil de la que es hasta el presente la primera línea descripta de endotelio microvascular renal murino.

La vasculatura no sólo provee perfusión de oxígeno y nutrientes al tumor, sino que permite la llegada y extravasación de células inflamatorias que según sus características pueden tener efectos positivos o negativos en el desarrollo tumoral. Con el objeto de estudiar y modular el flujo de células inflamatorias al tumor, se analizó si la generación de necrosis por crioterapia en melanomas, a partir del daño producido en las células tumorales, podría inducir la llegada de células inflamatorias al sitio y particularmente de células presentadoras de antígenos.

Se encontró que la inducción de necrosis por crioterapia (77-100% de la masa tumoral) en melanomas humanos (IIB-MEL-J) crecidos en ratones *nude* produjo activación temprana del endotelio y una rápida llegada de células polimorfonucleares (PMN) al sitio tumoral, seguidos del reclutamiento más tardío de macrófagos que persistieron hasta 15 días después del tratamiento. Estas manifestaciones condujeron a la formación de un infiltrado peritumoral muy importante pero sin infiltración intratumoral. La administración intralesional de una dosis de 500U de la citoquina GM-CSF aumentó el infiltrado intratumoral de macrófagos y PMN post tratamiento. El aumento en el número de células dendríticas (DEC205+) y su movilización a capas más profundas de la dermis cercanas a las zonas peritumorales, además de la formación de anticuerpos sugieren que la necrosis inducida con la crioterapia y la adyuvancia con GMCSF pueden resultar una estrategia útil para aumentar el infiltrado intratumoral. Lograr la llegada de células presentadoras de antígenos DEC 205+ y macrófagos F4/80+ al tumor podría contribuir a captar los antígenos liberados durante la necrosis para ser llevados a los ganglios cercanos para la presentación antigénica.

A las 4 hs de la administración de GM-CSF, la citoquina es retenida en el tumor cuatro veces más que la inyectada subcutáneamente, lo que podría contribuir al reclutamiento intratumoral observado.

El melanoma utilizado en estos estudios secreta cantidades no detectables (inferiores a 12 pg/ml) de la quemoquina MCP-1 (monocyte chemotactic protein), una de las principales responsables de conducir a la formación de infiltrados monocito/macrofágicos en tumores. En biopsias de melanomas metastásicos humanos encontramos que 100% de ellos producen MCP-1 con variada intensidad de expresión y número de células positivas. La intensidad de expresión se correlacionó con la vascularización, sugiriendo un efecto directo de la quemoquina sobre la angiogénesis. La presencia de importantes focos de macrófagos infiltrantes dentro del tumor se encontró particularmente asociada a áreas de activa angiogénesis pero no asociado a estructuras vasculares de gran calibre. Esto podría ser un indicio de la ruta de extravasación de los macrófagos frente al estímulo quimiotáctico o a un efecto proangiogénico de los macrófagos reclutados. Para disponer de un modelo que nos permita estudiar mejor el rol de los macrófagos infiltrantes al tumor, se transfectó la línea IIB-MEL-J con el cDNA correspondiente al MCP-1 humano, obteniéndose así una línea que produce 940 pg/ml/10⁶ células/48 hs. Las células transfectadas son de menor tamaño, mayor capacidad migratoria frente a medios condicionados ricos en componente de matriz, menor adhesión al endotelio y no presentan diferencias en la tasa de crecimiento *in vitro*. Los tumores producidos por inyección subcutánea de las células productoras presentan un infiltrado de macrófagos tanto intra como peritumoral significativamente mayor que los tumores parentales, hasta 30 días de la inoculación de las células. Sin embargo, son similares en tamaño a los originados por la línea parental, lo que sugeriría que, a diferencia de otros modelos experimentales, la presencia de macrófagos es necesaria pero no suficiente para

inducir regresión, para la cual se requeriría de la respuesta efectora, ausente en ratones *nude*. Por lo tanto, hemos generado un modelo muy interesante que nos permitirá continuar con el estudio del rol de los macrófagos y extrapolar los ensayos de modulación del infiltrado con GM-CSF en tumores productores de MCP-1.

Palabras clave: infiltrado inflamatorio; GM-CSF; necrosis; MCP-1; macrófagos; angiogénesis; células endoteliales

Los resultados presentados en esta Tesis forman parte de los siguientes trabajos:

- * **“Endothelial cell detection by MEC 13.3 mAb in mice mammary tumors”.**
Vanzulli S., Gazzaniga S., Braidot M.F., Wainstok R.
Biocell (1997) 21 : 1, 39.
- * **“Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice”**
Gazzaniga S., Bravo AI, Goldszmid S, Maschi F, Martinelli J, Mordoh J, Wainstok R.
Journal of Investigative Dermatology (2001) 116 (5): 664-671.
- * **“Isolation and characterization of mouse microvascular endothelial long-term cell culture obtained from renal tissue”**
Gazzaniga S., González L, Vecchi A, Mantovani A, Wainstok de Calmanovici R
(a ser enviado a Tissue and Cell)

TITLE: «MODULATION OF INFLAMMATORY INFILTRATE IN TUMOR DEVELOPMENT. EFFECT OF CYTOKINES AND STUDY OF ANGIOGENESIS»

AUTHOR: Silvina N. Gazzaniga

**DIRECTORS: Dr. Rosa Wainstok
Dr. José Mordoh**

**INSTITUTION: Biological Chemistry Department, Faculty of Sciences,
University of Buenos Aires and Fundación Instituto Leloir.**

ABSTRACT

There is growing evidence that vascular endothelial cells as well as tumor cells produce factors that reciprocally promote proliferation. In addition, leukocytes arriving to the tumor site attracted by chemotactic stimuli may contribute importantly to tumor progression or regression, which highlights the big interdependence among these three cellular groups.

The objective of this Thesis was to investigate the interplay among endothelial cells (EC) and inflammatory cells responsible of innate immunity in tumor development. For this purpose, neovascularization analysis performed in mice mammary tumors with different biological behaviour showed that the histological type (lobular or ductal) was not related to any particular angiogenic profile. However, an elevated microvascular density accompanied tumor growth rate and the ability to produce metastasis. The prognostic value of angiogenesis resembles the one described for human tumors and underlines the use of the monoclonal antibody against CD31 (MEC 13.3) as a useful tool for this kind of studies. The same antibody was coupled to immunomagnetic beads for EC isolation from

normal and neoplastic tissues with the purpose of establishing EC lines, which could allow the study of phenotypic and functional heterogeneity in EC population. Even when it was not possible to reproduce the tumor microenvironment in culture to allow tumor-EC growth in vitro, the establishment of a line derived from normal renal tissue was accomplished. Characteristics like CD31 and VCAM-1, ICAM-1 and ELAM-1 expression, presence of von Willebrand factor, avid uptake of acetylated LDL particles and Shigatoxin susceptibility (13-20%) are some of the features of the first murine microvascular renal EC line described to the present.

Vascularization provides oxygen and nutrient perfusion to tumors but is also the route for inflammatory cells arrival and extravasation, whose presence could influence positively or negatively on tumor fate. In order to study and modulate the affluence of inflammatory cells to the tumor, cryosurgery-induced necrosis was generated in melanomas assuming that the tumor cells debris and released factors could trigger the affluence of inflammatory cells, particularly antigen presenting cells.

We found that cryosurgery-induced necrosis (77-100% of tumor mass) in human melanomas (IIB-MEL-J) xenografted in nude mice produced early activation of endothelium and a quick infiltrative response of PMN, followed by a latter response of macrophages, which persisted until 15 days after treatment. These events drove to the formation of very important peritumoral infiltrates but scarce intratumoral inflammatory cells. Intralesional application of a single 500U dose of the cytokine GM-CSF to cryotreated tumors augmented macrophages and PMN intratumoral infiltration after treatment. The increase of DEC205+-dendritic cells and their mobilization to deeper layer of the dermis close to the peritumoral areas, besides antibody formation, suggest that cryosurgery-induced necrosis and the adjuvancy with GM-CSF could be a useful strategy to increase intratumoral

infiltration. Eliciting the affluence of antigen-presenting cells DEC205+ and F4/80+ macrophages to the tumor site could contribute to the capture of the released antigens during necrosis and its presentation in draining lymph nodes.

At 4h after administration, retention of GM-CSF in the tumor was four-fold higher than when injected subcutaneously, which could contribute to the intratumoral infiltration registered.

The melanoma cells employed in these studies produced undetectable levels (lower than 12 pg/ml) of MCP-1 chemokine, one of the main chemokines responsible to recruit monocyte/macrophages to tumors. We found that 100% of human metastatic melanomas biopsies were positive for MCP-1, expressed a variable number of cells and with different intensities. Expression of MCP-1 correlated with vascularization, suggesting an effect of the chemokine on angiogenesis. The important presence of macrophages infiltrating the tumor was particularly associated with areas of dense microvascular structures rather than with vessels of larger caliber. This could give an indication of the route of extravasation followed by macrophages attracted by the chemotactic stimulus, or alternatively be the effect of proangiogenic macrophages recruited. To develop a model which allowed us to study in further detail the role of infiltrating macrophages to tumor, IIB-MEL-J melanoma line was transfected with cDNA of human MCP-1, obtaining a line which produced 940 pg/ml/10⁶ cells/48 h. The transfected cells were smaller, had an increased migratory capacity to rich-in-matrix-components conditioned supernatants and less adhesive to endothelium. They did not present differences in *in vitro* growth rate. Tumors generated by the subcutaneous injection of MCP-1-producing cells showed significantly higher peritumoral and intratumoral infiltrates with respect to parental tumors until 30 days after cell inoculation. Nonetheless, the tumors were similar in size to those originated from the parental cells, what could suggest the absence of an effector

response in nude mice. Consequently, we have generated an interesting model, which will allow us to pursue the studies on the role of macrophages and the modulation of infiltrates with GM-CSF in MCP-1-producing tumors.

Keywords: inflammatory infiltrate; GM-CSF; necrosis; MCP-1; macrophages; angiogenesis; endothelial cells

The results presented in this Thesis are part of the following publications:

- * **“Endothelial cell detection by MEC 13.3 mAb in mice mammary tumors”.**

Vanzulli S., Gazzaniga S., Braidot M.F., Wainstok R.

Biocell (1997) 21 : 1, 39.

- * **“Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice”**

Gazzaniga S., Bravo AI, Goldszmid S, Maschi F, Martinelli J, Mordoh J, Wainstok R.

Journal of Investigative Dermatology (2001) 116 (5): 664-671.

- * **“Isolation and characterization of mouse microvascular endothelial long-term cell culture obtained from renal tissue”**

Gazzaniga S., González L, Vecchi A, Mantovani A, Wainstok de Calmanovici R

(to be submitted to Tissue and Cell)

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. CÁNCER	1
1.1. Definición y Clasificación.....	1
1.2. Progresión Tumoral.....	2
1.3. Melanoma Cutáneo.....	2
1.3.1. Incidencia del Melanoma.....	3
1.4. Cáncer de mama.....	4
1.4.1. Carcinomas no invasivos.....	4
2. INFLAMACIÓN	6
2.1 INTRODUCCIÓN.....	6
2.1.1. Selectinas y el rodamiento de leucocitos.....	7
2.1.2. Quemoquinas y Activación celular.....	8
2.1.3. Integrinas: fuerte adhesión celular al endotelio y diapédesis.....	9
2.1.4. PECAM / CD31.....	9
2.1.5. Quemoquinas y sus receptores.....	10
2.1.6. Reclutamiento de PMN, macrófagos y células dendríticas.....	13
2.2. INFLAMACIÓN EN TUMORES.....	13
2.2.1. Rol del infiltrado inflamatorio en tumores.....	15
2.3. CCL2 / MCP-1, una quemoquina atrayente de monocitos.....	16
2.4. La citoquina GM-CSF.....	18
2.4.1. Algunos efectos sobre leucocitos.....	19
3. CÉLULAS ENDOTELIALES	21
4. ANGIOGÉNESIS	25
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Líneas celulares y cultivo de stocks.....	31
1.1 Obtención de ECGS.....	33
2. Líneas tumorales de mantenimiento <i>in vivo</i>	33
3. Aislamiento de células endoteliales.....	34
4. Obtención y procesamiento de muestras de tejidos.....	35
4.1. Fijación en formol.....	35
4.2. Conservación a -70°C.....	35

4. 3. Biopsias.....	35
4. 4. Muestras para microscopía electrónica.....	36
5. Inmunohistoquímica.....	36
6. Cuantificación.....	37
6. 1. Infiltrado inflamatorio.....	37
6. 2. MCP-1.....	37
6. 3. Vascularización en biopsias de melanoma.....	38
6. 4. Angiogénesis en tumores mamarios murinos.....	38
6. 5. Macrófagos asociados al tumor.....	38
6. 6. Edema y Necrosis.....	38
7. Presencia de Marcadores Celulares.....	39
7. 1. ELISA sobre células vivas.....	39
7. 2. Inmunofluorescencia.....	39
7. 3. Incorporación de partículas de LDL acetilado.....	40
8. Ensayos de viabilidad celular.....	40
9. Criocirugía (crioterapia)	41
9. 1. Grupos de Tratamiento.....	41
9. 2. Grupos Controles.....	41
9. 3. Análisis de la respuesta humoral.....	42
10. Transfección de células de la línea IIB-MEL-J.....	43
10. 1. ELISA captura para MCP-1.....	44
11. Separación de leucocitos por gradiente de Ficoll-Hypaque.....	45
12. Ensayos de Quimiotaxis.....	46
13. Ensayos de Adhesión al Endotelio.....	46
14. Iodinación de GM-CSF.....	47
15. Administración del GM-CSF iodinado.....	48

CAPÍTULO I: ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y CÉLULAS ENDOTELIALES

I. 1. El AcM MEC 13.3 reconoce el endotelio vascular en tumores.....	50
I. 2. Estudio de la angiogénesis en tumores mamarios murinos.....	52
I. 2. a. Tipo histológico.....	52
I. 2. b. Tasa de crecimiento <i>in vivo</i>	53
I. 2. c. Capacidad metastásica.....	54
I. 2. d. Identificación de células aisladas inmunoreactivas para CD31... ..	55
I. 3. Aislamiento de Células Endoteliales.....	57
I. 3. a. A partir de tejidos tumorales.....	57
I. 3. b. A partir de tejidos normales.....	59
I. 4. Caracterización de las células derivadas de tejido normal.....	60

DISCUSIÓN.....	67
----------------	----

CAPÍTULO II: ANGIOGÉNESIS E INFILTRACIÓN ESPONTÁNEA EN MELANOMA

II. 1. MCP-1 en melanoma humano. Relación con la angiogénesis.....	74
II. 2. Presencia de células infiltrantes.....	79
II. 3. Transfección de la línea de melanoma humano IIB-MEL-J para la expresión de MCP-1.....	81
II. 3. 1. Características <i>in vitro</i> de las células transfectadas.....	82
II. 3. 2. Evaluación del potencial quimiotáctico de IIB-MEL-J-MCP-1 sobre células mononucleares. Ensayos <i>in vitro</i>	83
II. 3. 3. Evaluación del potencial quimiotáctico de IIB-MEL-J-MCP-1 sobre células mononucleares. Ensayos <i>in vivo</i>	86
II. 3. 4. Comportamiento migratorio de la línea transfectada.....	88
II. 3. 5. Evaluación de la adhesión al endotelio.....	90
DISCUSIÓN.....	92

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA FRENTE A DISTINTOS TRATAMIENTOS

III. 1. Radioterapia.....	99
III. 2. Crioterapia.....	100
III. 3. Crioterapia + Adyuvantes.....	102
III. 4. Crioterapia + GM-CSF.....	104
III. 4. 1. Caracterización de las células infiltrantes por la presencia de marcadores característicos.....	108
III. 4. 2. Respuesta humoral.....	111
III. 4. 3. Ajuste de la dosis de GM-CSF y estudio de su estabilidad en el sitio de inyección.....	113
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	123
ABREVIATURAS.....	127
REFERENCIAS.....	128

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

A continuación, y previo al desarrollo del trabajo experimental, se definen **conceptos básicos** necesarios para la introducción teórica de ciertos conceptos relacionados al tema de estudio. Se señala una breve introducción al cáncer y a los dos modelos utilizados (cáncer de mama y melanoma), conceptos relacionados a los pasos que conducen a establecer un proceso inflamatorio, una breve reseña sobre las citoquinas utilizadas (GM-CSF y MCP-1) y una introducción breve al conocimiento de las células endoteliales y a la angiogénesis.

1. CÁNCER

(1.1) Definición y Clasificación

El cáncer es una enfermedad de origen genético que resulta de la acumulación de cambios en una célula. Estos cambios llevan a una proliferación descontrolada y a la capacidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar otros órganos. La mayoría de las mutaciones que originan un cáncer son somáticas, sin embargo, aproximadamente el 1% de todos ellos se dan en individuos que presentan una predisposición heredada a la enfermedad [Fearon, 1997]. Se han caracterizado más de 100 tipos diferentes de cáncer. Cada tipo puede ser considerado como una enfermedad distinta, debido a que muchos de ellos posee un desarrollo característico, definidos por la edad media de los individuos en los que aparece, el ritmo de crecimiento, la invasividad local y a distancia, la respuesta a los tratamientos convencionales y la letalidad que tienen para el individuo.

El crecimiento y renovación de los tejidos de un organismo están homeostáticamente controlados. Los diversos tipos celulares ya diferenciados se mantienen en cantidad y posiciones relativas sin grandes variaciones. Cuando una célula pierde o ve alterados los mecanismos de control de la proliferación se origina un tumor o neoplasia. Sin embargo, esto no constituye necesariamente un cáncer. De acuerdo a su comportamiento los tumores pueden ser clasificados en “**benignos**” o “**malignos**”. En

un tumor benigno, las células neoplásicas permanecen agrupadas en una única masa tumoral en su lugar de origen, sin invadir tejidos adyacentes y las células que los componen están bastante diferenciadas. Estos tumores son generalmente de crecimiento lento, pudiendo alcanzar volúmenes muy grandes. El tejido normal circundante está siempre bien demarcado. Habitualmente puede obtenerse la curación por remoción quirúrgica del tumor. Hablamos de **tumor maligno o cáncer**, cuando las células neoplásicas proliferan rápidamente invadiendo tejidos adyacentes y son capaces de migrar hacia otros órganos produciendo “**metástasis**”. Las transformaciones que convierten la proliferación celular original (tumor primario) en un tumor maligno e invasivo reciben la denominación general de **progresión tumoral**.

(1. 2) Progresión Tumoral

La progresión tumoral es un proceso de múltiples etapas que depende tanto de factores propios de la célula tumoral como de factores del huésped. El primer paso de la cascada metastásica consiste en atravesar la matriz extracelular que se interpone entre el tumor primario y el sistema circulatorio. Una vez que el tumor ha penetrado la membrana basal y la matriz adyacente, las células deben llegar a la circulación. Este paso es facilitado por el hecho de que las células tumorales pueden secretar una serie de factores angiogénicos capaces de estimular la vascularización del tumor [Shing, 1987]. Como los nuevos vasos generados en el tumor tienen generalmente paredes discontinuas, la penetración de las células tumorales en la circulación es un evento altamente probable. Evadiendo la respuesta inmunológica, la célula tumoral sale de la circulación y produce una metástasis, a partir de una nueva interacción generada con su tejido blanco.

(1.3) MELANOMA CUTÁNEO

El melanoma resulta de la transformación maligna de las células pigmentadas de la piel -los melanocitos- y es uno de los tumores más intensamente estudiados en los últimos años.

En particular, el melanoma cutáneo es considerado un tumor de comportamiento impredecible ya que el pronóstico puede variar entre una remisión espontánea (en un porcentaje menor al 2 % de los casos) a una rápida progresión y muerte del paciente. El interés sobre la investigación en melanoma tanto por investigadores clínicos como experimentales se ha desarrollado por una serie de razones:

- 1) el aumento de la incidencia de esta patología en los últimos 40 años,
- 2) la resistencia de los melanomas avanzados a las terapias convencionales, lo cual resulta en una alta tasa de mortalidad
- 3) la accesibilidad a nevos cutáneos o lunares y melanomas para llevar a cabo estudios experimentales,
- 4) la facilidad de crecer células de melanoma metastásico *in vitro*.

(1.3.1) Incidencia del Melanoma

El melanoma representa aproximadamente el 1% de los cánceres en los Estados Unidos. Si bien corresponde al 3% de los neoplasmas cutáneos, su potencial maligno se refleja en el hecho de que resulta en el 65% de las muertes por cáncer de piel. La incidencia del melanoma es prácticamente igual entre hombres y mujeres. Sin embargo, se observan diferencias en la distribución de las lesiones. Mientras que en las mujeres la mayor parte de las lesiones se dan en las extremidades inferiores, en los hombres las lesiones son más frecuentes en el tronco. El riesgo de desarrollar la enfermedad en americanos blancos es de 1 en 85, valor que se incrementa con la edad. Aproximadamente, el 50% de los melanomas se detectan en pacientes con una edad promedio entre 45 y 55 años; mientras que la aparición de melanoma en niños es extremadamente baja [Greenlee, 2000].

De acuerdo con estudios realizados en los Estados Unidos, norte de Europa y Canadá, la incidencia del melanoma crece en mayor proporción que cualquier otro tipo de cáncer, a excepción del cáncer de pulmón en mujeres [Serraino, 1998]. Sin embargo, este aumento no se ve acompañado por un aumento en la tasa de mortalidad. Esto se debe a que el diagnóstico en los últimos años ocurre en estadios más tempranos de la enfermedad y conjuntamente con las mejoras en los protocolos de tratamiento, se ha logrado disminuir la mortalidad de los pacientes como consecuencia de la enfermedad.

Aún no se conocen en detalle los factores etiológicos que llevan al desarrollo del melanoma. Sin embargo deben considerarse tres ciertas evidencias asociadas: 1) su incidencia es mayor en la población blanca que en cualquier otra raza y 10 veces mayor en individuos blancos que en negros. Existe una correlación negativa entre grado de pigmentación de la piel y el melanoma [Crombie, 1979]; 2) estudios epidemiológicos y clínicos señalan un rol fundamental de la irradiación solar sobre el desarrollo del melanoma [Rigel, 1992] y 3) el melanoma puede ser hereditario. La susceptibilidad genética familiar fue descrita por primera vez en 1978 [Landthaler, 1979] y actualmente, los melanomas familiares representan el 5-10% del total de casos de melanomas estudiados.

(1.4) CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama tiene un impacto importante en la población femenina. Aproximadamente 183.000 nuevos casos en mujeres se diagnostican cada año en Estados Unidos y es la segunda causa de muerte en la población de mujeres americanas y la primera en mujeres de entre 40-55 años [De Michele, 2000]. Se ha advertido un leve descenso en la mortalidad general, lo cual se atribuye tanto al éxito en los programas de detección temprana y a avances en el tratamiento, particularmente por el desarrollo de terapias sistémicas [De Michele, 2000]. Por varias décadas, ha habido un dramático incremento en la incidencia del carcinoma invasivo de mama. Actualmente se encuentra en aumento el número de casos en que se detecta carcinoma *in situ*, particularmente del carcinoma ductal *in situ*, debido a que se puede detectar tempranamente por el uso de mamografías de control [Malkin, 1990].

En el 50% de las mujeres enfermas, no existe una causa o factor de riesgo identificable, más allá de la edad y el sexo [Liaw, 1997]. Sin embargo, se describen factores **asociados** al incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, que incluyen menarca temprana, falta de embarazos o embarazos tardíos, edad avanzada, la historia familiar, la exposición a hormonas femeninas reproductivas (endógenas o exógenas) y factores ambientales, que son considerados de bajo riesgo. Si bien, estrictamente no existe una definición formal de lo que constituye un alto riesgo, se

considera que las mujeres que llevan mutaciones en BCRA-1 ó 2 o que tienen una historia familiar que avala la transmisión genética, son consideradas como población de alto riesgo dentro de la población general, como también aquéllas que presentan carcinoma lobular *in situ* o hiperplasia atípica [Pihan, 1998].

(1.4.1) Carcinomas no invasivos

El **carcinoma ductal in situ** (CDIS) es uno de los dos tipos de carcinomas no invasivos junto con el **carcinoma lobulillar in situ** (CLIS).

El CDIS, también conocido como carcinoma intraductal, representa un grupo heterogéneo de lesiones de variado potencial maligno. CDIS se caracteriza patológicamente por una proliferación de células epiteliales presumiblemente malignas dentro del sistema mamario ductal-lobulillar, sin evidencias microscópicas de invasión en el estroma circundante. Sin embargo, CDIS abarca un grupo heterogéneo de lesiones patológicas que difieren en patrón de crecimiento y características citológicas. Existe cierta incertidumbre en cuanto al modo de subclasificar estas lesiones. Han sido propuestos esquemas de clasificación que se basan en (1) características arquitectónicas o de patrón de crecimiento de las células neoplásicas en el sistema ductal-lobulillar; (2) citología de las células neoplásicas (grado nuclear: bajo, intermedio o alto) y (3) necrosis celular (comedo). El sistema tradicional utiliza el criterio (1) para subdividir los CDIS en cinco subtipos principales: comedo, cribiforme, micropapilares, papilares y sólidos. Pero hay quienes subdividen a los CDIS en tumores tipo comedo y no-comedo dado que los primeros son citológicamente más malignos y a menudo asociados a invasión [Semsei, 1989; Suen, 1991]. Los nuevos tipos de clasificación toman en cuenta el grado nuclear y la necrosis como parámetros primarios y las características arquitectónicas como un criterio secundario [Valverius, 1990; Cullen, 1992; Schreiber-Agus, 1998]. Siendo evaluados para la presencia de marcadores biológicos, los CDIS comedo o lesiones de alto grado frecuentemente presentan ausencia de receptores de progesterona y estrógenos, sobreexpresión de HER-2/neu (c-erbB-2), mutaciones del gen p53 [Malkin, 1990, Venkitaraman, 1999; Chen, 1999] y angiogénesis en el estroma circundante [Lee, 1998].

El **carcinoma lobulillar in situ (CLIS)** presenta generalmente lesiones no detectables por exámen macroscópico, que se advierten como hallazgos microscópicos cuando se realiza una biopsia por alguna otra razón, por lo que la incidencia en la población general es desconocida. Sin embargo, son más frecuentemente diagnosticados en mujeres premenopáusicas [De Michele, 2000].

Las características histológicas del CLIS muestran pequeña variaciones y son fácilmente reconocibles en el terminal de la unidad ducto-lobulillar. Se caracterizan por una proliferación sólida de células pequeñas con núcleo regular, aunque pueden describirse células con cierto grado de pleomorfismo. Presentan baja tasa proliferativa, son típicamente positivos para receptor de estrógenos y raramente sobreexpresan HER-2/neu [Cullen, 1992, Venkitaraman, 1999]. Se caracterizan por la pérdida de expresión de la molécula de adhesión E-caderina [Christofori, 1999]. Un punto importante es que se encuentran asociados a un riesgo incrementado de desarrollo de carcinoma mamario [De Michele, 2000].

2. INFLAMACIÓN

(2.1) Introducción

La inflamación es una compleja reacción de defensa del huésped originada por un daño tisular o infección. El objetivo primario de este proceso es erradicar el factor irritante y reparar el tejido circundante. Para la supervivencia del huésped, la inflamación es un proceso necesario y beneficioso. Esta respuesta involucra la participación de leucocitos derivados de médula ósea y su movilización al sitio del daño, mediante su interacción con un endotelio localmente respondedor. Para ello se suceden cambios comprendidos en los siguientes estadios: (a) dilatación capilar para aumentar el flujo sanguíneo, (b) cambios estructurales microvasculares y escape de proteínas plasmáticas, que producen edema local (c) los leucocitos se tornan más adhesivos al endotelio de la zona de inflamación y hacen un movimiento de rodamiento *rolling*, (d) trans migración a través del endotelio y acumulación en el sitio del daño.

El endotelio vascular participa activamente en la migración leucocitaria desde la sangre a los tejidos durante el proceso inflamatorio [Springer, 1994]. Para ello, los mediadores proinflamatorios como citoquinas del tipo TNF- α e IL-1 o factores como lipopolisacáridos bacterianos (LPS) modifican el endotelio para convertirlo en adhesivo para los leucocitos circulantes. Se activan cambios en la microcirculación vía óxido nítrico y prostaglandinas y se induce producción de citoquinas quimiotácticas y modificación de moléculas de adhesión, las cuales a su vez sufrirán cambios en su estado de activación que hará posible su extravasación de los leucocitos al tejido inflamado [Mantovani A, 1997].

Por lo tanto, en el proceso de migración (adhesión y extravasación) de las células inflamatorias a los tejidos lesionados, intervienen una serie de interacciones moleculares secuenciales entre dichas células y las células endoteliales (CE).

Moléculas de adhesión y quemoquinas son los verdaderos protagonistas, y de los cuales sólo se mencionarán algunos en forma sucinta a los efectos de comprender en líneas generales como transcurre esta secuencia de eventos.

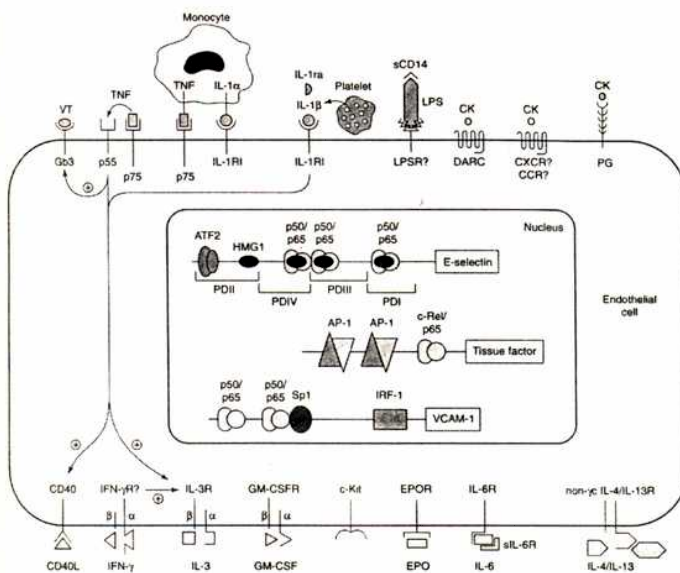
(2.1.1) Selectinas y el rodamiento de leucocitos

El proceso de captura de la circulación constituye el primer contacto de un leucocito con el endotelio activado. La captura ocurre después de la marginación, permitiendo a los leucocitos moverse en una posición próxima al endotelio y alejados del flujo sanguíneo central. Durante la respuesta inflamatoria, se requiere la activación endotelial para iniciar la captura. La **P-selectina** presente sobre las superficie de las CE es la molécula de adhesión primaria requerida para la captura e iniciación del *rolling* [Lawrence y col., 1997; Lawrence y Springer, 1991]. Estudios *in vivo* sugieren que la **L-selectina** exhibe un rol igualmente importante para la captura leucocitaria. El *rolling* es el siguiente paso de la secuencia. La interacción entre selectinas y sus ligandos (ricos en carbohidratos) es una unión débil y debido a esto, el torrente sanguíneo empuja al leucocito esférico, desuniéndolo de la selectina y haciéndolo rodar (*rolling*) sobre la superficie de la CE. Habrá sido sólo una unión transitoria. Tanto la P- como la **E-selectina** (ELAM) parecen presentar cierta redundancia funcional en el *rolling*, sin embargo, esta última se cree que podría ser responsable del *rolling* más lento que llevaría a la adhesión firme [Collins, 2001; Kunkel, 2000]. Durante este proceso inicial,

las integrinas en los leucocitos se mantienen en su estado de reposo o inactivo, al igual que las moléculas de la familia de las inmunoglobulinas.

(2.1.1) Quemoquinas y activación celular

A medida que el leucocito rueda sobre la superficie del endotelio vascular entrará en contacto con las quemoquinas sintetizadas por las CE o por células del foco inflamatorio. Las **quemoquinas** son un grupo importante de pequeñas citoquinas quimiotácticas que serían liberadas formando un gradiente de quimioatracción para los leucocitos que luego harán diapédesis, a los que se unirán vía receptores específicos existentes en su superficie [Springer, 1994]. No obstante, también se han descrito tres sitios de unión para las quemoquinas sobre la superficie de las CE. Uno de ellos, de presencia –relativamente controversial– son los receptores “señalizantes” como los encontrados en la superficie de los leucocitos [Schonbeck, 1995; Petzelbauer, 1995]. Otro sitio descrito es el receptor promiscuo con identidad al grupo sanguíneo Duffy (DARC) que se expresa en CE de vénulas postcapilares *in vivo*, pero no *in vitro* [Peiper, 1995]. Por último, se propone que existen algunas quemoquinas que se encuentran unidas a heparina o proteoglicanos-tipo-heparina de la superficie endotelial, los cuales estarían relacionados a la captura de las quemoquinas, impidiendo que sean arrastradas por el flujo sanguíneo [Rot, 1992].



Receptores expresados en CE.

Los signos de pregunta indican controversias (receptores de CC o CXC); ausencia de identificación del receptor o tipo de receptor (CC, CXC o receptor para LPS) o ausencia de estudios específicos sobre CE (IFN-γ). Se muestra una representación esquemática de los promotores de los tres genes expresados en CE. Abreviaturas: CK, quemoquina; DARC, receptor Duffy para quemoquinas; Gb3, globotriaosil ceramida; L, ligando; LPS, lipopolisacárido; PD, dominio de regulación positiva; PG, proteoglicano; R, receptor; VT, verotoxina o Shigatoxina (como se la referirá en Capítulo I)

El contacto de las quemoquinas con su receptor específico presente en el leucocito induce la activación de éste último, caracterizada por el cambio conformacional de las integrinas. Se ha visto que altas concentraciones de quimioattractantes pueden arrestar leucocitos con alta velocidad de *rolling* [Jung, 1998; Milstone, 1998].

(2.1.3) Integrinas: fuerte adhesión celular al endotelio y diapédesis

Como consecuencia de la activación del leucocito por parte de las quemoquinas, se incrementará la afinidad de las integrinas, por ejemplo VLA-4, por sus ligandos presentes en la superficie de las células endoteliales. Estas últimas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas como VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). Otra molécula de adhesión importante es el ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Esta interacción molecular produce una fuerte adhesión celular del leucocito al endotelio. La unión de estos receptores y contrarreceptores induce la reorganización del citoesqueleto del leucocito, que modifica y cambia su morfología volviéndose más aplanado y entrando en diapédesis, lo cual lo conducirá a la extravasación y así entrar en el tejido inflamado.

Este movimiento direccional de los leucocitos se conoce como quimiotaxis. Además existen otros cambios funcionales como la degranulación, secreción y *burst* respiratorio. Luego, para llegar al foco inflamatorio, las células migran a través de las uniones intercelulares del endotelio utilizando la glicoproteína de membrana: CD31.

(2.1.4) PECAM-1 / CD31, molécula de adhesión intercelular

PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) o CD31 es una molécula crítica para la trans migración activada por citoquinas a través de las uniones interendoteliales. Anticuerpos anti-PECAM-1 reducen la diapédesis de monocitos a través del endotelio en reposo y disminuyen 70-90% la migración de monocitos y neutrófilos a través del endotelio activado [Muller, 1993; Muller, 1995; Muller, 2002]. A diferencia de muchas otras moléculas de adhesión de la superficie endotelial, CD31/PECAM no sufre *upregulation* por activación con TNF- α o IFN- γ en las dosis

usuales [Romer, 1995], como tampoco parece redistribuirse durante la trans migración inducida por citoquinas o factores quimiotácticos [Allport, 1997].

Una vez que los leucocitos han penetrado la membrana basal del endotelio, se tornan altamente mótiles describiendo movimientos erráticos o direccionales en función de la presencia e intensidad del estímulo quimiotáctico.

Por lo tanto, el mismo paradigma básico se aplica para el reclutamiento de todos los leucocitos, pero son las distintas quemoquinas y moléculas de adhesión las que dan cuenta de la selectividad de las células reclutadas.

(2.1.5) Quemoquinas y sus receptores

Las quemoquinas son una familia de pequeñas moléculas de aproximadamente 8-14 kDa que se relacionan estructuralmente y tienen un importante papel en diversos procesos, regulando el tráfico y afluencia al sitio de la inflamación de varios tipos celulares: eosinófilos, linfocitos T y B, monocitos y macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células endoteliales; así como también tienen un rol crucial en la respuesta inmune y en las infecciones virales [Mantovani A, 1999; Baggiolini M, 1998; Rollins, 1997]. Su acción se lleva a cabo a través de la interacción con sus receptores específicos, un subgrupo de receptores que presentan 7 segmentos transmembrana y se encuentran acoplados a la proteína G.

La mayoría de las quemoquinas provocan migración quimiotáctica de leucocitos pero también afectan la angiogénesis, la producción de colágeno y la proliferación de precursores hematopoiéticos. Hasta el año 2000, unas 40 quemoquinas habían sido identificadas en humanos y en función de su estructura primaria, divididas en dos grandes subfamilias dependiendo de si las dos cisteínas próximas al N-terminal se encuentran adyacentes (CC o α quemoquinas) o separadas por algún aminoácido (CXC o β quemoquinas). Posteriormente, se describieron la linfotactina o C quemoquina, a la cual le faltan las cisteínas uno y tres de la típica estructura de las quemoquinas; y la fractalquina o CX3C quemoquina, la cual presenta tres aminoácidos entre las primeras

dos cisteínas además de ser la única unida a membrana mediante una estructura de tipo mucina.

Para designar a los **receptores**, se utiliza la R junto al nombre de la citoquina y un número, así: **CXCR_{1..n}**, **CCR_{1..n}**, **XCR_{1..n}** y **CX3CR_{1..n}**.

Existen tablas donde se resumen la correspondencia entre quemoquinas y sus receptores, además de las células que las secretan y de las células blanco sobre las que actúan. Sin embargo, con la idea de sistematizar la nomenclatura de la que es una muy abundante familia de citoquinas quimiotácticas, se ha propuesto a consideración una nueva forma de nominarlas. Como ejemplos, se señalan:

[Zlotnik et al, 2000]

Nuevo nombre	Cromosoma humano	Ligando humano	Ligando murino	Receptor(es)
CXCL1	4q12-q13	GRO α / MGSA α	GRO / KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β / MGSA β	GRO / KC?	CXCR2
XCL1	1q23	Linfotactina /SCM1 α / ATAC	Linfotactina	XCR1
XCL2	1q23	SCM1 β	desconocido	XCR1
CXCR3L1	16q13	Fractalquina	Neurotactina	CXCR3
CCL1	17q11.2	I -309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1 / MCAF	JE?	CCR2

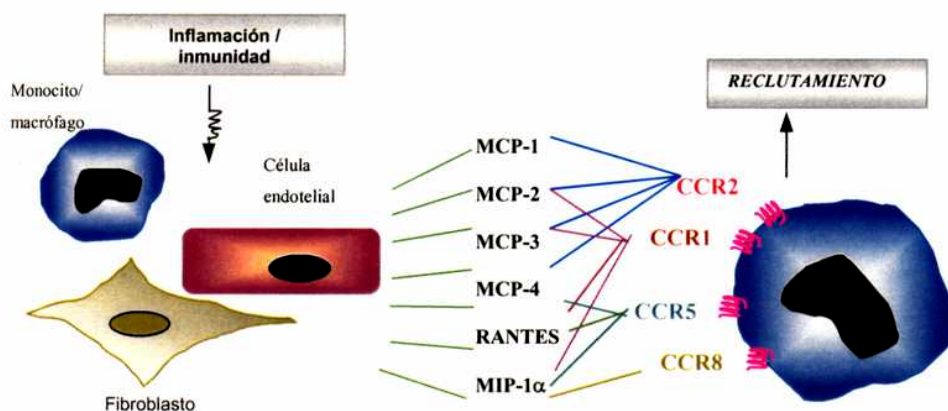
Funcionalmente, se pueden dividir en dos categorías: homeostáticas e inflamatorias. Las primeras se expresan constitutivamente en ciertos tejidos u órganos, sugiriendo una función específica relacionada a la migración celular o *homing*. En contraposición, las quemoquinas inflamatorias son fuertemente inducidas frente a estímulos en diversos tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, células T, etc).

En cuanto a cuáles son sus células blanco, se puede decir, esquemáticamente que, las CXC quemoquinas son activas sobre neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y células T y B, mientras que las CC quemoquinas ejercen su acción sobre múltiples subtipos de leucocitos incluyendo monocitos, basófilos, eosinófilos, células T, dendríticas y *natural killers* (NK), pero son generalmente inactivas sobre PMNs. Las eotaxinas (CC) son las quemoquinas con el espectro de acción más restringido, siendo activas selectivamente sobre granulocitos eosinófilos y basófilos [Baggiolini M, 1998;

Mantovani, 1998]. La linfotactina y fractalquina actúan ambas sobre células linfoides (T y NK) y la última también es activa sobre monocitos [Kelner GS, 1994; Bazan JF, 1996].

La interacción entre quemoquina y receptor son uniones de alta afinidad y, algunas de ellas, de elevada especificidad tisular. Sin embargo, también se presentan algunos casos en donde una simple quemoquina puede unirse a varios receptores. Situaciones donde un simple receptor puede transducir señales de diversas quemoquinas, también contribuyen a que el sistema sea catalogado como promiscuo y redundante.

Ciertas células producen concomitantemente muchas quemoquinas con un espectro solapado de acción. Es por ello que la cantidad de quemoquinas descriptas, su redundancia de acción sobre células blanco y de producción, así como la promiscuidad de uso de receptores hacen al sistema de quemoquinas una interesante fuente de estudio. El concepto de “robustez” se aplica, en consecuencia, para recalcar que el tráfico basal de leucocitos se hará relativamente insensible frente a variaciones en la cantidad o calidad de la(s) quemoquina(s) [Hartwell L, 1997; Barkai N, 1997; Mantovani A, 1999]. Por lo tanto, la demanda de suficiente número de fagocitos reclutados en situaciones de remodelación, eliminación de debris y resistencia a patógenos no se verá afectada, como tampoco la viabilidad ontogénica, ni la supervivencia del individuo portador del defecto [Mantovani, 1999]. Sin embargo, el bloqueo de ciertas quemoquinas o de sus receptores afecta definitivamente “la sintonía fina” de este sistema, por ejemplo alterando el estado de activación de ciertos leucocitos. Es por todo lo expuesto que se plantea a la redundancia y robustez del sistema como una característica evolutiva fundamental para asegurar el tráfico esencial de fagocitos [Barkai y Leibler, 1997].



Reclutamiento de monocitos como muestra de la robustez del sistema de quemoquinas. Los fagocitos mononucleares en reposo o activados y células del estroma (CE y fibroblastos) producen concomitantemente muchas citoquinas las cuales tienen a los monocitos como blanco de atracción. Adaptado de Mantovani, 1999.

(2.1.6) Reclutamiento de PMN, macrófagos y células dendríticas

Los **PMN** (neutrófilos) son los leucocitos más importantes presentes en médula ósea y sangre periférica en cuanto a su rápida movilización en la inflamación aguda. Derivan de células *stem* multipotentes que proliferan y se diferencian bajo la influencia de factores de crecimiento (colony stimulating factors, CSF) como el G-CSF y GM-CSF. En respuesta a la infección o daño en la periferia, más PMN, algo más inmaduros se liberan a circulación. Una vez en el sitio, las células reclutadas mueren por apoptosis en los tejidos inflamados y son luego fagocitados por macrófagos tisulares, debido a su vida media corta aún en condiciones normales.

PMN y macrófagos son fagocitos altamente profesionales. Los blancos de captura de estos fagocitos son reconocibles por opsoninas como anticuerpos específicos especialmente subclases de IgG o el complemento. Por lo tanto, los anticuerpos actúan como puentes entre los antígenos y los receptores de la región Fc de estos leucocitos. Sin embargo, a diferencia de los PMN, los macrófagos pueden hacer fagocitosis aún en ausencia de opsonización.

Los **macrófagos** son células fagocíticas especializadas de mayor longevidad que los PMN y están distribuidos a través de muchos tejidos, lo que se conoce como sistema mononuclear-fagocítico. Esta capacidad fagocítica puede aumentar en forma marcada cuando son estimulados por citoquinas liberadas por células T activadas (linfoquinas). Los macrófagos así activados tienen un rol crucial en la inmunidad celular específica y en la hipersensibilidad retardada, donde se propicia el establecimiento de una respuesta protectora frente a los antígenos que dieron origen a la señal de daño.

Otro sublinaje de este sistema de fagocitos son las **células dendríticas** (CD). Las CD están especializadas en presentar antígenos a los linfocitos T no estimulados previamente [Lanzavecchia, 1998]. Expresan altos niveles de MHC clase II y otras moléculas coestimuladoras accesorias que las convierten en las células presentadoras más eficientes [Grabbe, 2000].

En la mayoría de los tejidos las CD se encuentran en un estado “inmaduro”, incapaz de estimular los linfocitos T, debido a que presentan niveles muy bajos o carecen de

señales accesorias para tal activación como CD40, CD54 y CD86. Sin embargo, en el estado inmaduro están extremadamente bien equipadas para la captura de antígenos, proceso que induce a posteriori una completa maduración y movilización de las CD [Banchereau, 1998]. Las células de Langerhans, células dendríticas presentes en la capa basal de la piel, tienen un rol centinela, con baja expresión de moléculas MHC y coestimuladoras pero abundantes receptores Fcγ y Fcε. Expuestas a antígenos, cambian su fenotipo de células fagocítica a presentadora y potencian su capacidad de migrar a los ganglios linfáticos regionales donde pueden inducir una respuesta inmune [Banchereau, 1998]. Además de la captura antigénica, existen otros estímulos que inducen la maduración de las CD como moléculas patogénicas como el LPS, citoquinas como TNF-α, GM-CSF y CD40L [Banchereau, 1998].

(2. 2) INFLAMACIÓN EN TUMORES

En 1863, Rudolf Virchow advirtió la presencia de leucocitos en tejidos neoplásicos e hizo una conexión entre inflamación y cáncer, sugiriendo que el “infiltrado linforetico” reflejaba el origen del cáncer en sitios de inflamación crónica. Sin embargo, las evidencias luego mostraron que muchos tumores en sí mismos pueden atraer leucocitos mediante la producción de factores quimiotácticos, en particular MCP-1 [Rollins, 1991].

Para los tumores que presentan infiltrado inflamatorio, tal microambiente se caracteriza por la presencia de leucocitos del huésped tanto en el estroma circundante como en las áreas tumorales [Negus, 1997].

Macrófagos

Los macrófagos asociados al tumor (TAM, “tumor-associated macrophages”) son los principales componentes de los infiltrados de la mayoría de los tumores [Mantovani, 1992]. Los TAM derivan de los precursores monocíticos circulantes que se dirigen al tumor guiados por quemoquinas. Muchos tumores también producen citoquinas del tipo factor estimulante de colonias (CSF) que prolongan la supervivencia de los TAM. Cuando son apropiadamente activados, los TAM pueden matar células tumorales en forma directa o inducir reacciones de destrucción de otros tejidos, principalmente

centradas en el endotelio vascular, que conducen indirectamente a la destrucción de aquellas [Mantovani, 1992]. Por otro lado, los TAM también producen factores angiogénicos y de crecimiento como también proteasas que pueden degradar matriz extracelular. En este sentido entonces, podrían estimular la proliferación de células tumorales, promover la neoformación de vasos (angiogénesis) y favorecer la invasión y las metástasis [Mantovani, 1992, Coussens., 2000]. Este rasgo dual de los TAM es lo que se conoce como la hipótesis “del equilibrio de los macrófagos” [Mantovani, 1992].

Células Dendríticas

Las CD son cruciales tanto en la activación de inmunidad específica de antígenos como en el mantenimiento de la tolerancia, siendo un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. Las CD asociadas al tumor (TADC, “tumor-associated dendritic cells”) habitualmente presentan una capacidad defectiva para activar células T [Allavena, 2000]. En el cáncer de mama, las TADC inmaduras se presentan dispersas en la masa tumoral, mientras que las maduras están confinadas en las áreas peritumorales, aunque en el carcinoma papilar de tiroides se ubican en el borde invasivo del tumor [Allavena, 2000]. Esta distribución de TADC es claramente diferente de la que presentan los TAM, los cuales se distribuyen regularmente en el tejido tumoral.

Linfocitos

Las células NK son raras en el microambiente tumoral [Negus y col., 1997]. La población de células T predominante tiene un fenotipo de memoria. El repertorio de citoquinas de estos linfocitos infiltrantes en el tumor (TIL, “tumor infiltrating lymphocytes”) no ha sido sistemáticamente estudiado, sin embargo para algunos tumores se ha visto que expresan IL-4 e IL-5, asociadas a un perfil de células Th2 [van den Berg, 2000]. La polarización de la respuesta a un perfil de este tipo se ha visto que no resulta efectiva en la lucha contra tumores y virus.

(2.2.1) Rol del infiltrado inflamatorio en tumores

Existen al menos dos modelos para explicar la función de los leucocitos asociados a tumores y ambos se sustentan en datos experimentales. Por un lado, algunos sostienen que son fuente potencial de factores de crecimiento para las células tumorales

y les proveen de factores angiogénicos. En modelos murinos, la mezcla de macrófagos con células tumorales singeneicas resulta en la formación de tumores aún con inóculos tumorales muy bajos que en otras condiciones no “prenderían” [Walter, 1991]. En tejidos humanos, se ha observado una correlación entre la intensidad de infiltración de TAM y el grado de vascularización, lo cual sugiere que los leucocitos contribuirían a la angiogénesis y supervivencia del tumor [Leek, 1998; Ueno, 2000].

Por otro lado, algunos consideran que los leucocitos asociados a tumores podrían ser la evidencia residual de un intento no efectivo del huésped por rechazar el tumor inmunológicamente. Si este fuese el caso, potenciar esta respuesta podría conducir a la erradicación del tumor. Muchas quemoquinas han sido estudiadas en modelos experimentales para atraer la respuesta inmune hacia el tumor y donde se ha visto rechazo tumoral. Entre estas quemoquinas se incluyen CCL2/MCP-1 [Rollins y col., 1991; Botazzi y col., 1992; Manome y col., 1995, Nesbit y col., 2001], CCL5/RANTES [Mule y col., 1996], CCL1/TCA-3 [Lanig y col., 1994], CCL20/MIP-3 α [Fushimi y col., 2000], CCL21/SLC [Vicari y col., 2000], y XCL1/linfotactina [Diloo y col., 1996]. Sin embargo, para ver la mayor eficacia de estas quemoquinas respecto a citoquinas como el GM-CSF o IL-12 deberán esperarse los resultados de ensayos clínicos en humanos [Rollins, 2001].

(2. 3) CCL2/MCP-1, una quemoquina atrayente de monocitos

El CCL2 / MCP-1 (monocyte chemotactic / chemoattractant protein-1) también llamado MCAF (monocyte chemotactic and activating factor) es una quemoquina de la subfamilia CC producida por una variedad importante de tipos celulares hematopoiéticos y no hematopoiéticos. MCP-1 atrae monocitos, células T y NK [Rollins, 1991; Baggilini, 1997].

A diferencia de otras citoquinas/ quemoquinas, el MCP-1 humano es reconocido por receptores murinos, aunque con menor afinidad, induciendo respuesta biológica en el ratón debido a que las regiones codificantes entre ambos presentan $\approx 70\%$ de homología [Yoshimura, 1989].

En monocitos humanos se ha descrito que MCP-1 aumenta de manera marcada la expresión de moléculas de adhesión CD11b y CD11c (principalmente de $\beta 2$ y $\alpha 4$

integrinas) y puede inducir pequeñas o nula variaciones en la expresión de CD11a, VLA-4^a y LAM-1^b [Jiang, 1992] Asimismo, es capaz de inducir la secreción de IL-1 e IL-6, las cuales pueden estar involucradas en la acción tumoricida reportada para TAM [Jiang, 1992].

La transferencia del gen para MCP-1 en células tumorales ha generado resultados que proponen para esta quemoquina un papel controversial en el desarrollo tumoral, dado que se han observado tanto respuestas antitumorales como aquéllas que aumentan la capacidad tumorigénica (ver Capítulo II). Inclusive el uso con valor preventivo de células tumorales de gliosarcoma transfectadas para la producción de MCP-1, demostraron tener una potente actividad como vacuna frente a posteriores desafíos con células tumorales viables, probablemente debido al aumento de la respuesta de monocitos antitumorales [Manome y col., 1995].

^a VLA-4 es un integrina que media la adhesión célula-célula como a la matriz

^b LAM-1 es una molécula representativa de la familia de las selectinas que participa en el *rolling* de leucocitos

El estudio de ratones *knockout* para el gen de MCP-1 [Lu, 1998] demostró que aunque el número de leucocitos circulantes y macrófagos residentes eran normales, existía una falla en el reclutamiento de monocitos 72 h. luego de la administración intraperitoneal de tioglicolato. Asimismo, la acumulación de macrófagos F4/80+ en reacciones de hipersensibilidad retardada, la formación de granulomas pulmonares en respuesta a huevos de *Schistosoma mansoni* y la expresión de IL-4, IL-5 e IFN- γ por parte de esplenocitos estaban impedidas. Estos datos estarían indicando que MCP-1 es esencial para el reclutamiento de monocitos en procesos inflamatorios y e influye sobre la expresión de citoquinas relacionadas a la respuesta T *helper*.

Más recientemente, Gu y colaboradores [2000] demostraron que ratones deficientes en MCP-1 son incapaces de establecer una respuesta de tipo Th2. Las células de los ganglios provenientes de ratones MCP-1 $-/-$ inmunizados sintetizaban niveles extremadamente bajos de IL-4, IL-5 e IL-10 pero cantidades normales de IFN- γ e IL-2. Por lo tanto, el cambio de clase de las inmunoglobulinas, que es una característica de la respuesta Th2, se vio impedido. Por lo tanto, MCP-1 influye sobre la inmunidad innata a través del efecto sobre los monocitos, y sobre la inmunidad adaptativa, a través del control de la polarización de la respuesta de células T *helper*.

(2. 4) La citoquina GM-CSF

El GM-CSF humano es una proteína de 127 con un alto grado de especificidad en las distintas especies; por ello GM-CSF humano (h) es inactivo en células murinas y viceversa, producto de la baja homología de secuencias: sólo 50% a nivel aminoácido. Por lo tanto, para humanos, la forma recombinante producida en *E. coli* es la comercialmente disponible y es la que se utiliza en muchos ensayos clínicos.

Desde el clonado de su gen en 1985, el hGM-CSF ha registrado un rápido avance en cuanto a su inclusión en ensayos clínicos de diverso tipo. Una de las razones es que ocupa una posición central en la regulación de la respuesta hematopoiética como factor de crecimiento. La actividad biológica de la molécula en cuanto a promover la supervivencia, función, diferenciación y proliferación de las células hematopoiéticas y de sus precursores en médula ósea, son importantes para lograr los efectos finales observados *in vivo*. Pero el efecto de esta citoquina no está restringido a los elementos hematopoiéticos dado que induce migración y proliferación de CE en cultivo y la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 [Bussolino, 1991]. GM-CSF estimula la proliferación de células progenitoras de linaje mieloide, eritroide y megacariocitos en la médula ósea y promueve su salida a circulación [Metcalf D, 1986]. Al final de la maduración, este mismo mediador es también capaz de activar y potenciar actividades funcionales de células de sangre periférica tales como neutrófilos, eosinófilos y monocitos / macrófagos. Esta activación luego resulta en la inducción de una segunda cascada de citoquinas producidas por los monocitos activados tales como IL-1 [Sisson y Dinarello, 1988], TNF, M-CSF y G-CSF [Oster W. y col., 1989]. La respuesta a GM-CSF *in vivo* resulta ser entonces una red de interacciones extraordinariamente compleja.

Hasta no mucho tiempo atrás, la mayoría de los estudios preclínicos y clínicos se habían concentrado en el efecto directo sobre la hematopoyesis y su utilidad para la terapia en estados de citopenia. Sin embargo, se desprende de lo anteriormente mencionado que GM-CSF no es tan sólo un factor de crecimiento hematopoiético. Por lo tanto, los actuales estudios y las proyecciones a futuro se concentran en varios aspectos adicionales, tales como:

- a) su rol en la activación funcional de neutrófilos y monocitos para potenciar la resistencia no específica a infecciones versus la estimulación de reacciones inflamatorias
- b) la potenciación de la capacidad funcional de células presentadoras de antígenos con fines de inducir protección**
- c) el sinergismo con otras citoquinas e inmunomoduladores de bajo peso molecular
- d) su uso concomitante con otras modalidades terapéuticas tales como terapia inmunosupresiva / mielosupresiva o con quimioterapia antimicrobiana.

En particular, la estrategia planteada como parte de uno de los objetivos de este trabajo de Tesis, donde se busca aumentar el infiltrado de células presentadoras al sitio tumoral, puede encuadrarse dentro de los enfoques abarcados en el punto (b).

(2.4.1) Algunos efectos sobre leucocitos

A continuación se señalan algunos de los efectos descriptos que posee GM-CSF sobre leucocitos como PMN, macrófagos y células dendríticas; células por su parte, serán blanco de análisis en los resultados que se presentan en el Capítulo III de esta Tesis.

- **Granulocitos polimorfonucleares:** los neutrófilos, si son activados por GM-CSF, se adhieren al endotelio y migran a través de la pared de los vasos y son capaces de liberar un número de diversas sustancias tales como enzimas y metabolitos activos del oxígeno [Devereux S, 1989; Socinski M, 1988] en el tejido. Que esto conduzca a una resistencia inespecífica contra infecciones o a un proceso inflamatorio dependerá del grado de localización del proceso y de eventos regulatorios. Inicialmente, en los primeros experimentos, se analizó la influencia del GM-CSF sobre la expresión de moléculas de adhesión. Tanto *in vitro* como *in vivo*, LFA-1 se expresó en niveles superiores bajo la influencia de esta citoquina [Shang, 1999]. La producción de especies reactivas del oxígeno fue muy débil [Weisbart HR, 1987] pero puede verse fuertemente aumentada si se incuban estas células en presencia de una segunda señal como fMLP. Por lo tanto, GM-CSF no parece ser un inductor de moléculas tóxicas en el neutrófilo

sino que lo prepara para una más rápida y potente respuesta frente a una segunda señal, actividad conocida como “*priming*” o cebado.

- **Monocitos:** si estas células son activadas por GM-CSF se tornan adherentes [Elliot JM, 1990, Shang, 1999] y sufren una variedad de cambios funcionales como el aumento de la síntesis de moléculas de MHC de clase II y el aumento de las funciones. Aún más relevante para el establecimiento de reacciones inflamatorias es la producción de citoquinas que tienen un efecto regulatorio sobre los monocitos en sí mismos y sobre una variedad de otros leucocitos [Elliot JM, 1990].
- **Células dendríticas:** estas pueden diferenciarse y proliferar *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica en cultivo si se adiciona GM-CSF e IL-4 [Inaba, 1993]. Se le asigna un rol en el reclutamiento de células presentadoras de antígenos [Morrisey, 1989; Hadad, 2000] debido a que GM-CSF induce la migración de células de Langerhans humanas *in vitro* [Takayama, 1999]. Sin embargo, este efecto no sería directo sino a través de la inducción de otras quemoquinas como MIP 1 α [Kielian, 1999].

Como factor de crecimiento, rhGM-CSF puede estimular la proliferación *in vitro* de algunas células tumorales no hematopoiéticas [Baldwin GC, 1989]. Además, se sabe que existen receptores para factores de crecimiento en ciertas líneas tumorales [Park LS, 1989]. Estos datos sugieren que el uso de factores de crecimiento puede no ser tan inocuo, dado que podrían inducir la proliferación de células tumorales. Sin embargo, no existen evidencias que éste sea el caso para el melanoma y GM-CSF, dado que todos los reportes indican un claro efecto antitumoral.

Es importante establecer la diferencia entre ADCC y la citotoxicidad desarrollada por los macrófagos una vez activados pero que sucede sin la necesidad de anticuerpos. Las células efectoras para ADCC (macrófagos, NK y granulocitos) presentan receptores para la porción Fc de las IgG. El efecto es detonado por anticuerpos de las distintas subclases de IgG, pero IgA e IgM no son efectivas, a diferencia de lo que pasa para la citotoxicidad mediada por complemento. El complemento no parece estar involucrado, aún para los componentes primarios de la cascada, que tienen propiedades fagocíticas y quimiotácticas. [Vadas MA, 1983].

La estimulación por citoquinas cursa por dos mecanismos independientes. El $\text{IFN}\gamma$ actúa por un período prolongado de varias horas, incrementando la densidad del receptor Fc en la célula. Opuestamente, GM-CSF ejerce sus efectos en forma más rápida, probablemente mediando algún efecto sobre la transducción de señales o acciones efectoras subsecuentes [Perussia B, 1987]. La acción de GM-CSF está mediada por CD16 y CD32 [Young DA, 1990]. Sin embargo, los dos agentes estimuladores combinados no producen un efecto aditivo.

La actividad citotóxica independiente de anticuerpos está restringida a macrófagos. Mientras que, tanto $\text{IFN}\gamma$ como GM-CSF son citoquinas activas en este sistema, $\text{IFN}\gamma$ y M-CSF son todavía más potentes [Young DA, 1990; Cannistra StA, 88]. Otros efectores secundarios pueden estar involucrados dado que, anticuerpos dirigidos contra TNF pueden reducir significativamente este efecto [Cannistra StA, 88]. La citotoxicidad directa requiere, sin embargo, un efecto detonante adicional y los lipopolisacáridos (LPS) son particularmente efectivos en ejercer este estímulo secundario. G-CSF no es efectivo en este sistema.

CÉLULAS ENDOTELIALES

Tanto en los vasos sanguíneos de mayor porte como arterias y venas, así como las ramas más finas del árbol vascular, la pared interna está tapizada por una delgada capa unicelular: **el endotelio**, el cual cobra dimensión de órgano debido a su vasta extensión y su capacidad de ejercer una vasta gama de funciones y su gran plasticidad [Weinbaum, 1997]. Las CE reposan sobre una membrana basal, sintetizada por ellas mismas, en directo contacto con una capa delgada, la íntima. Esta última población mesenquimal indiferenciada es capaz de diferenciarse en macrófago intimal, dendrocito, astrocito, fibroblasto, célula muscular lisa intimal y aún osteoblasto [Genesser, 2000].

Debido a su posición estratégica entre la sangre y los tejidos, las CE regulan el tráfico de moléculas y células a través de la pared vascular, de modo que las células circulantes se pueden adherir al endotelio para hacer diapédesis y responder en el marco de un proceso inflamatorio o inmune (ver Introducción, sección 2.1) [Springer, 1994; Weisberg R, 1995; Tedder, 1999]. Hoy se sabe que el endotelio es un tejido activo que juega

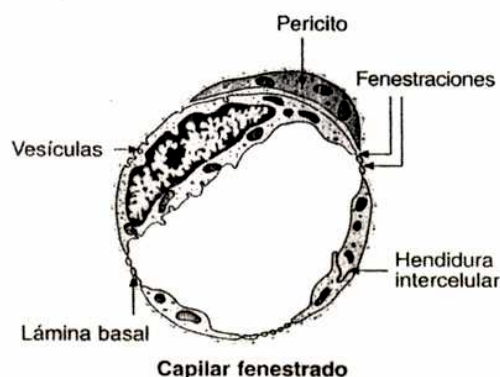
papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos (por ejemplo, aterosclerosis: enfermedad de la íntima arterial de vasos grandes y medianos, preeclampsia, psoriasis, endometriosis y tumorigénesis: angiogénesis tumoral).

En algún tiempo se creyó al endotelio la víctima inocente del ataque inflamatorio. Actualmente se sabe que el endotelio orchestra el tono de la inflamación. Es igualmente blanco y origen de hormonas, factores de crecimiento, sustancias vasoactivas, factores hemostáticos y radicales libres de oxígeno. Liga componentes del complemento, expresa receptores para reacciones inmunes, presenta antígenos y es capaz de fagocitar y destruir microorganismos. Un grupo de moléculas agonistas para el endotelio son las citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) y LPS, los cuales promueven la extravasación mediante la inducción de moléculas de adhesión y citoquinas quimiotácticas [Mantovani A, 1997]. En particular las selectinas no se expresan en el endotelio en reposo pero llegan a un máximo de inducción 4-6 hs post estimulación y rápidamente disminuyen a niveles basales después de 12-16 hs. VCAM-1 también se expresa sobre el endotelio activado y ocurre un máximo entre las 6 y 12 hs, seguido de un plateau 48 h post inducción [Lafrenie, 1993]. ICAM-1 se expresa constitutivamente en el endotelio en reposo y su expresión puede ser estimulada luego de 6-8 hs de estimulación con LPS [Lafrenie, 1993].

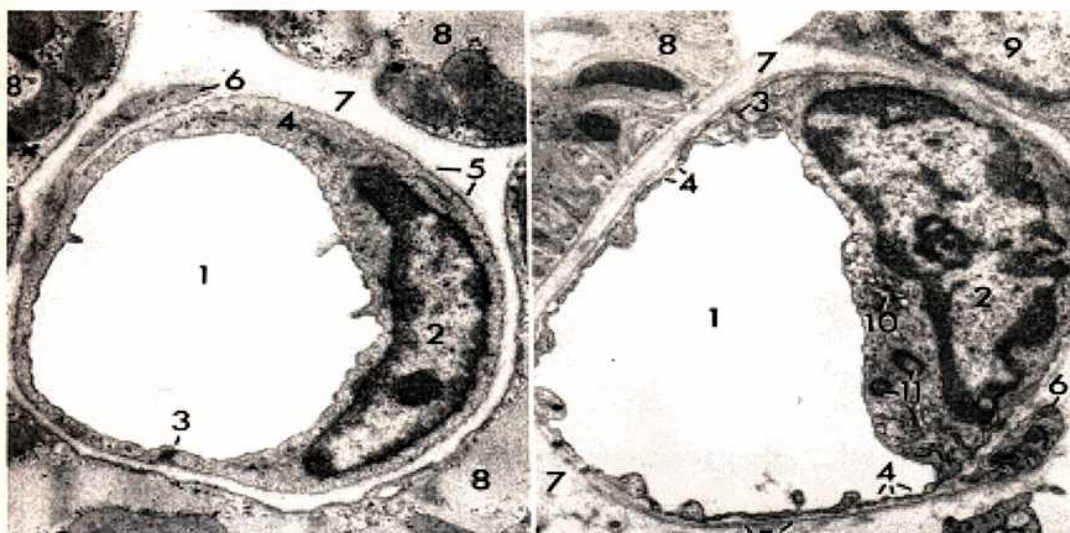
El repertorio de quemoquinas producidas por las CE incluyen tanto miembros de la familia de las CXC (IL-8, IP-10, ENA-78 y Gro- α) como CC (MCP-1, MCP-3, RANTES), con muchos estudios principalmente enfocados a las moléculas prototípicas IL-8 y MCP-1 [Mantovani A, 1997]. Una ruta interesante de inducción de quemoquinas está representada por monocitos y plaquetas [Cha JK, 2000], que pueden activar a CE locales vía rutas que involucran moléculas de adhesión, IL-1 y TNF. Dado el diferente espectro de acción de las quemoquinas, podría esperarse que MCP-1 e IL-8 estén reguladas independientemente, aunque al respecto existen pocos ejemplos. Se ha visto que IFN- γ induce selectivamente MCP-1 en CE microvasculares [Mantovani, 1997] como también en macrófagos, donde IFN- γ induce la liberación de MCP-1 e inhibe la de IL-8.

Los cultivos de CE comenzaron a realizarse en 1922 cuando se describió el primer trabajo de cultivo donde las CE crecían como proyecciones a partir de explantes de tejido [Lewis, 1922]. No fue sino hasta 1973 cuando comenzaron a hacerse aislamientos con mayor rendimiento de número de células lográndose purificar a partir de vena de cordones umbilicales por exposición a tripsina [Maruyama, 1973]. En la década del '80 comenzaron a reportarse los primeros trabajos donde se obtenían CE de microvasculatura. Sin embargo, las CE obtenidas de cordón umbilical han sido utilizadas para realizar estudios más relacionados con la microvasculatura que con aquellos observados en vasos sanguíneos de mayor calibre. Hay varias razones para que esta práctica se haya mantenido: la disponibilidad relativamente accesible de cordones umbilicales, la facilidad de obtención y aislamiento y la pureza de la población celular obtenida. En estas condiciones, se ha asumido que estas CE creciendo *in vitro*, simulan a las CE microvasculares [Manconi, 2000] aunque para muchos ensayos funcionales son reemplazadas por la líneas microvasculares existentes.

La razón de este reemplazo es la heterogeneidad fenotípica de las CE, que es una característica biológica típica de estas células. Las CE en reposo y quiescentes en el adulto se encuentran constituyendo una población altamente heterogénea cuyos fenotipos varían entre los órganos a los que pertenecen e incluso son diferentes dentro de un mismo órgano, según el calibre del vaso al que pertenecen [Gumkowski, 1985; Thorin y Shreeve, 1998; Craig, 1998]. Esta heterogeneidad se demuestra en distintos aspectos. Por ejemplo, por la variada morfología o disposiciones encontradas: monocapas de CE altamente continuas y con uniones estrechas en los pulmones, monocapas discontinuas con uniones gap como en el tejido hepático o endotelios fenestrados como en los glomérulos renales [Genesser, 2000].



Sección transversal de un capilar [Tomado de Genesser, 2000]



Capilar peritubular en el riñón (16000X). Las referencias corresponden a: 1. Lumen del capilar (ancho: 5 micrones). 2. Núcleo de CE. 3. Unión de los brazos citoplasmáticos de la CE. 4. Citoplasma altamente fenestrado, donde cada fenestra esta cubierta de una fina membrana. 5. Lámina basal. 6. Parte de un pericitos. 7. Espacio pericapilar de tejido conectivo. 8. Base de una célula del túbulo renal. 9. Núcleo de un fibroblasto. 10. Golgi. 11. Centríolos (Tomado del Rodhlin Athlas of Histology)

Las CE están unidas entre sí por una sustancia intercelular constituida por glicoproteínas. Los espacios intercelulares endoteliales varían en magnitud de 10–20 Å en arterias mayores a 100–200 Å en vénulas postcapilares. Por ejemplo, la microvasculatura del tejido adiposo se caracteriza por la presencia de uniones íntimas y ausencia de fenestras y discontinuidades. En sus uniones intercelulares se evidencia la presencia de caderinas, PECAM y JAM (junctional adhesion molecule) que son proteínas típicas de uniones intercelulares que regulan el paso de solutos [Williams LA, 1999] y las cuales contribuirían en el control de la interacción leucocito/ endotelial durante la diapédesis.

La membrana de la CE se aprecia tachonada de innumerables receptores para interleuquinas, moléculas clase I y II del MHC y receptores para moléculas de adherencia (selectinas, integrinas, ICAM-1, ICAM-2, ELAM-1, VCAM-1) que orquestan su normal funcionamiento. El ICAM-2 se aprecia presente en forma constitutiva en la CE en reposo en proporción mayor que el ICAM-1 [Pearson JD, 1999]. Existen también muchos trabajos relacionados a la descripción de los distintos marcadores de superficie que las CE pueden expresar en forma diferencial [Porter, 1990; Augustin, 1994; Garlanda y Dejana, 1997].

No obstante, debido a la existencia de algunos marcadores característicos que hacen al fenotipo endotelial como la expresión de CD31, CD34, factor VIII o factor de von Willebrand, la unión a la lectina *Ulex europaeus* de tipo I, ha sido posible avanzar en la obtención de estas células a partir de diversos tejidos para su estudio y cultivo con el fin de evaluar las diferencias y realizar estudios funcionales más apropiadamente que utilizando las clásicamente utilizadas células HUVEC (CE de cordón umbilical).

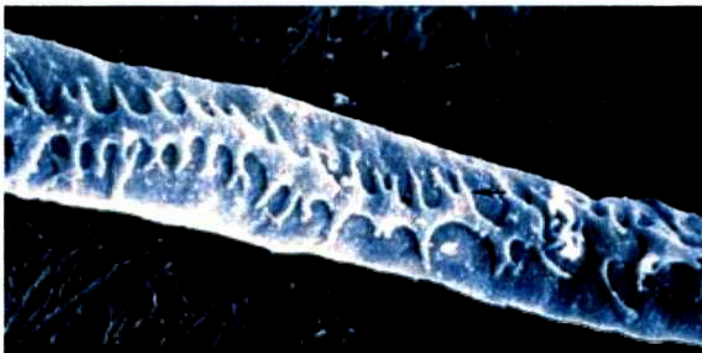
4. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es fundamental para la cicatrización [Pettet G, 1996], la reproducción [Shifren JL, 1996; Fraser HM, 2000] y el desarrollo embrionario [Risau W, 1997]. Durante el desarrollo, los vasos sanguíneos se originan a partir de precursores de células endoteliales (CE) –los angioblastos- por un proceso conocido como **vasculogénesis** pero también a partir de vasos sanguíneos preexistentes vía **angiogénesis** [Risau W, 1997]. Ambos procesos están mediados por factores de crecimiento parácrinos.

Los vasos sanguíneos comienzan como simples conductos. En la microvasculatura, estos conductos consisten de una a dos células endoteliales que se unen entre sí. Pero aún vasos de mayor calibre, como la aorta dorsal, que están tapizados por muchas CE, han comenzado como un conducto endotelial “desnudo” sin células musculares asociadas.

En el adulto, la tasa de proliferación de CE es muy baja comparado con muchos otros tipos celulares de los tejidos del cuerpo. Más de 10^{12} CE tapizan el interior de los vasos sanguíneos y cubren un área aproximada de 1000 m^2 en un adulto de 70 kg. El tiempo de recambio de estas células puede exceder los 1000 días [Jaffe EA, 1987]. Sin embargo, existen excepciones fisiológicas donde la angiogénesis ocurre bajo estricta regulación, como durante el ciclo reproductor femenino y la cicatrización. Cada vez existen más evidencias que indican que para que comience el proceso angiogénico, se debe alterar el equilibrio local de reguladores negativos y positivos a favor de estos últimos, de manera de detonar el crecimiento de microvasos [Montesano R, 1995; Ramanujan S, 2000].

La vasculatura tumoral es muy diferente del lecho microvascular normal porque los vasos nunca llegan a tener una gran cubierta muscular de pericitos. Nunca se tornan quiescentes, sino que permanecen en estado activado y con muy alta tendencia a la proliferación; pero por fortuna también con alta tendencia a la regresión lo que los hace particularmente sensibles a terapias antiangiogénicas [Folkman J, 1985]. La arquitectura vascular es una entidad dinámica relacionada con el desarrollo, destrucción y reordenamiento de los vasos sanguíneos. Este tipo de vasos “desnudos” son muy inestables y dependientes de factores externos para sobrevivir [Orlidge A, 1987]. Sin embargo, una vez que los pericitos llegan a tapizar externamente estos conductos vasculares, dejan de depender de factores exógenos para sobrevivir ya que tales factores (p. ej., TGF- β) serían provistos por los pericitos [Orlidge A, 1987].



Tubo capilar sin matriz extracelular mostrando la cubierta de pericitos íntimamente unidos. La flecha señala un proceso o prolongación típica de los pericitos que pueden estar muy estrechamente unidos

Desde las primeras evidencias de este mecanismo aportadas por Pietro Gullino [Bremm SS, Gullino P, 1978] y Judah Folkman [1971], se ha acumulado considerable volumen de evidencias que indican que el crecimiento progresivo de los tumores es dependiente de angiogénesis. La mayoría de los tumores en humanos persisten *in situ* por largos períodos de tiempo (meses y hasta años) en estado avascular y quiescente. En esta fase, el tumor puede contener unos pocos millones de células y no desarrolla más allá de los 2 mm de diámetro. En algún momento, un subgrupo de ellas hace un cambio al “**fenotipo angiogénico**” [Folkman J y Hanahan D, 1991], alterando el equilibrio local entre reguladores negativos y positivos de la angiogénesis [Maisonpierre., 1997; Holash J, 1999]. Allí entonces, el tumor empieza a crecer rápidamente y se hace clínicamente detectable [Hanahan D y Folkman J, 1996]. Pero

Además debe considerarse que las CE microvasculares presentes en los diversos tejidos presentan diferentes propiedades biológicas dependiendo de los microambientes o *backgrounds* genéticos [Ungari., 1985, Gullino PM 1992; Alessandri , 1997]. Por lo tanto, las diferentes propiedades de las CE pueden influir importantemente en la respuesta a la presencia de moléculas angiogénicas y antiangiogénicas.

Todos los tejidos y órganos desarrollan una arquitectura vascular específica y característica cumpliendo con los requerimientos funcionales y de nutrientes específicos. La existencia de una vasculatura específica de tipos tumorales es un punto controversial de discusión. Incluso se han desarrollado modelos matemáticos para describir el proceso de angiogénesis tumoral [Levine HA, 2001; Orme ME, 1996]. El análisis fractal de las tramas vasculares tumorales indican que el aumento en el nivel de factor/es angiogénico/s difusible/s de liberación local son la clave determinante de la forma de las mallas capilares [Chaplain MA, 1991]. Sin embargo, los mismos modelos matemáticos han demostrado que la heterogeneidad del microambiente tumoral intracelular puede jugar un rol muy importante [Levine HA, 2000]. Es interesante destacar que no sólo las células cancerosas sino las células inflamatorias [Berger AC., 2000; Etoh T, 2000; Levine HA, 2000; Dalglish AG, 2002; Benelli, 2002] que infiltran el tumor y la matriz extracelular [van Hinsbergh VW, 2001], pueden ser fuente de factores angiogénicos.

Los modelos de investigación sobre angiogénesis tumoral resultan de utilidad para el estudio de:

- la identificación de reguladores positivos y negativos de la angiogénesis y la caracterización de sus mecanismos de acción;
- la identificación de inhibidores de angiogénesis sintéticos y/o naturales;
- **la cuantificación de neovascularización en biopsias tumorales para el uso en diagnóstico y pronóstico.**

La cuantificación de la densidad microvascular en especímenes tumorales puede contribuir a predecir el riesgo de metástasis o recurrencia. Recientes observaciones han confirmado esta hipótesis para distintos tipos de tumores [Leek, 1996; Ueno, 2000].

Introducción

Nuestro trabajo en este aspecto pretende buscar una herramienta eficiente de
ón de la neovascularización en el modelo murino; así como determinar si en este
, se reproduce el valor pronóstico de la angiogénesis, de manera de tener un
tro a través del cual se pueda evaluar la respuesta de los tumores a diversos

OBJETIVOS



OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo de Tesis fue **estudiar las interrelaciones existentes entre las células tumorales, las células del endotelio de los vasos que irrigan los tumores y la presencia de células inflamatorias de manera de evaluar su rol y/o contribución en el destino del tumor.**

En particular se consideró,

(a) Estudiar en tumores mamarios murinos si la neoformación de vasos acompaña ciertas características biológicas y del comportamiento del tumor como velocidad de crecimiento, capacidad metastásica y origen tisular. Dado que esta evaluación puede depender del anticuerpo que se utilice para la inmunodetección, se probó la utilidad del anticuerpo monoclonal MEC 13.3, anti CD31, desarrollado previamente en colaboración con el grupo del Dr. A. Mantovani (Milán, Italia). Este mismo anticuerpo se utilizó como herramienta con el fin de aislar CE de tejidos neoplásicos y normales en pos de establecer líneas que contribuyan a definir una caracterización morfológica y funcional más clara entre las CE de distintos orígenes (Capítulo I).

Es a través del endotelio y en respuesta a señales quimiotácticas, que las células inflamatorias pasan de circulación a los tejidos. Muchos tumores son capaces de producir tales señales en la forma de quemoquinas conduciendo a la formación de infiltrados inflamatorios, cuyo valor para el destino del tumor resulta controversial. Por lo tanto, (b) se propuso estudiar la producción de la quemoquina MCP-1 en melanomas metastásicos humanos y su relación con la vascularización y el infiltrado inflamatorio. Asimismo, con el objeto de estudiar el rol de los macrófagos infiltrantes y poder disponer de un modelo que reproduzca la situación de estudio de las biopsias, se estableció una línea productora de MCP-1 a partir de la línea de melanoma IIB-MEL-J, disponible en el laboratorio y determinada como no productora de la quemoquina en cuestión. (Capítulo II)

Por último, dado que la aplicación de ciertos tratamientos antitumorales producen un daño en las células del tumor, este fenómeno de stress podría ser interpretado como una “señal de peligro”, conduciendo a la liberación de citoquinas y quemoquinas. Estas

señales proinflamatorias podrían inducir la llegada de células presentadoras de antígenos, las que a su vez podrían contribuir al establecimiento de una respuesta contra el tumor. Bajo esta hipótesis entonces, (c) se evaluaron estrategias para modular la presencia de infiltrado en tumores con escaso a nulo presencia de células inflamatorias con el fin de estimular la llegada de células inflamatorias y células presentadoras de antígenos al sitio tumoral. (Capítulo III).

**MATERIALES
&
MÉTODOS**



MATERIALES Y MÉTODOS

1. LINEAS CELULARES Y CULTIVO DE STOCKS

Para la realización de los distintos ensayos que se detallan más adelante se utilizaron las líneas celulares de origen humano:

- IIB-MEL-J: se estableció a partir de una lesión de melanoma metastático de pulmón [Guerra L y col., 1989].
- IIB-MEL-IAN: se desarrolló a partir de metástasis ganglionares axilares derivadas de un melanoma primario epiteliode amelanótico [Kairiyama C y col., 1995]
- IIB-MEL-LES: se obtuvo a partir de un ganglio metastático amelanótico proveniente de un melanoma de tipo epiteliode amelanótico [Kairiyama C y col., 1995].

Las células de estas tres líneas se mantuvieron en cultivo continuo en un medio denominado **“Medio Melanoma”** que se compone de: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM: F-12, 1:1, Sigma) en presencia de glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Sigma) y suplementado con suero fetal bovino 10% (FBS: fetal bovine serum, Natocor), selenito de sodio 20 nM (Sigma), ácido ascórbico 100 µM (Sigma), galactosa 0,3 mg/ml (Sigma), piruvato de sodio 0,15 mg/ml (Sigma), insulina 5 µg/ml (Laboratorios Beta), transferrina 5 µg/ml (Sigma) y factor de crecimiento epidérmico 5 ng/ml (EGF, Collaborative Res.)

- MCF-7: línea de adenocarcinoma mamario [Soule HD y col., 1973]. Se mantuvieron en un medio de cultivo compuesto por DMEM/F-12, 1:1, suplementado con FBS 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

- IIB-BR-G: [Bover L y col., 1991]. El medio utilizado es semejante al de las células MCF-7 enriquecido con 20nM selenito de sodio, 100 μ M ácido ascórbico, 5 ng /ml EGF, 5 μ g/ml prolactina, 1,4 μ M hidrocortisona y 0,1 nM 17 β -estradiol. Todos los factores fueron provistos por Sigma.

Asimismo, se utilizaron las siguientes líneas celulares de origen murino:

- 1G11: se generó a partir de cultivos sucesivos de células endoteliales de la microvasculatura aisladas de pulmón de ratones BALB/c [Dong Q y col.,1997] El medio consistió en DMEM suplementado con 20 % FBS ; 2% HEPES ; 1% de aminoácidos no esenciales 1mM de piruvato de sodio ; 10 mg/ml de heparina y 100-140 μ g/ml de factor de suplemento endotelial. (ECGS: endothelial cell growth supplement, Sigma o producido a partir de cerebro de ternera). Se plaquean en cajas de Petri con 1% de gelatina en estufa a 37 °C con 5% CO₂.
- H5V: células de endotelio de corazón de embriones de ratones las cuales fueron transformadas por el agregado del antígeno *middle* T del Polyoma virus [Garlanda et al. 1994]
- B16/F1: línea de melanoma murino [Fidler, 1977]. El medio correspondiente consiste en DMEM con 2 mM glutamina, 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, ajustado con 3,7 g/L bicarbonato de sodio y suplementado con 10% FBS.
- S-180: línea de sarcoma de ratón [J. Natl. Cancer Inst. 13: 1299-1377, 1952]. El medio de cultivo consisten en DMEM suplementado con 10% FBS y glutamina
- Hibridoma productor del anticuerpo MEC 13.3

Todas las líneas celulares antes mencionadas se plaquearon en placas de Petri de 100 mm (Corning) o en botellas de cultivo de 75 cm² (Corning) en sus correspondientes medios de mantenimiento y se incubaron en estufa a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂. El cambio de medio de cultivo se realizó dos

o tres veces por semana. Rutinariamente, al llegar a estado de confluencia se dispersaron por tratamiento con tripsina.

0,25%: EDTA 0,065%. Cuando se requirieron las células para ensayos donde la integridad de los antígenos de superficie fue necesaria, los cultivos se disgregaron mediante el tratamiento con EDTA.

Todas las líneas celulares se controlaron periódicamente para detectar la presencia de micoplasma.

1.1 Obtención de ECGS: inicialmente para el crecimiento y cultivo de las células endoteliales se utilizó el suplemento de crecimiento endotelial comercial (Sigma), el cual también se utilizó de referencia para evaluar la utilidad del obtenido en el laboratorio. Para ello, se obtuvieron cerebros de terneros recién sacrificados y su procesamiento posterior se realizó según lo publicado por Maciag y col. [1979]. El producto final fue liofilizado y conservado en alícuotas a -20°C , que fueron las que se utilizaron de rutina para los cultivos de las líneas y el establecimiento de la línea endotelial renal.

2. LINEAS TUMORALES DE MANTENIMIENTO *IN VIVO*

Las líneas de tumores mamarios murinos utilizadas para los ensayos de angiogénesis y aislamiento de células endoteliales fueron cedidas por la Dra. Claudia Lanari [Lanari C y col., 1989; Pazos y col., 1991]. Su mantenimiento se realizó por implantes subcutáneos de fragmentos de tejido tumoral de aproximadamente 1 mm^3 con trocar en ratones BALB/C hembras singéneos menores a dos meses de edad.

La generación de tumores derivados de la línea de melanoma humano IIB-MEL-J en ratones *nude* (IIB-MEL-J_{nude}) también se efectuó mediante implantes subcutáneos por trocar y mantenida por pasajes *in vivo*.

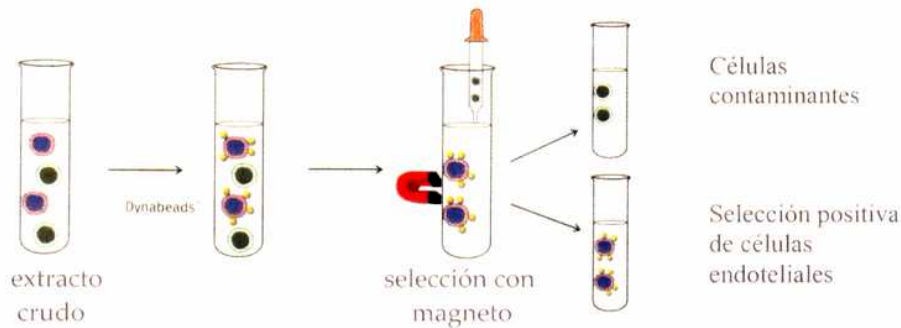
Para la evaluación del crecimiento tumoral, se tomaron medidas del ancho y largo con un calibre. Los tamaños tumorales se expresaron siguiendo la fórmula $(A \times B^2)/2$, donde A es la diámetro mayor y B es el diámetro menor medido.

3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES

30µl de las esferas magnéticas Dynabeads (Dynal, Oslo, Norway) se incuban con el anticuerpo MEC 13.3 anti-CD31/PECAM (1ml de sobrenadante del hibridoma) durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. Luego de varios lavados con HBSS- 1% FBS , se incuba 1 hora con DMEM-5% FBS para bloquear el pegado inespecífico de células no deseadas. Luego de ello, se lava de 2-3 veces con la misma solución anterior.

Los tejidos de interés se extraen en condiciones estériles y se disgregan inicialmente con tijeras y bisturí para luego someterlos a un disgregado enzimático con una solución de 1mg/ml de colagenasa A (Boehringer-Mannheim). Esta suspensión se incuba con agitación durante 45 min. a 37 °C y se pasa por una malla de poro pequeño o gasa estéril. Posteriormente, se centrifuga a 1000 rpm durante 10 min., se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet con HBSS – 1% FBS y se vuelve a centrifugar. Las células se resuspenden en 1 ml de DMEM (separando una alícuota para estimar luego el porcentaje de recuperación) y se incuban con las esferas durante 30 min a 4 °C, homogeneizando esporádicamente. Las células endoteliales unidas a las esferas se separan de las no unidas por atracción de las esferas con un magneto y descartando toda la suspensión que no se vio atraída por el imán. Aplicando la misma metodología se efectúan la mayor cantidad de lavados posibles de manera de minimizar los tipos celulares contaminantes.

Finalmente se resuspenden las células en medio de cultivo completo (DMEM 20 % FBS ; 2% HEPES ; 1% de aminoácidos no esenciales ; 1mM de piruvato de sodio ; 10 mg/ml de heparina y 100-140 µg/ml del factor de crecimiento endotelial , ECGS: endothelial cell growth supplement) . Se separa una alícuota para recuento y se plaquean en cajas de Petri con 1% de gelatina en estufa a 37 °C con 5% CO₂.



4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDOS

Para los experimentos *in vivo* llevados a cabo con las líneas tumorales previamente descritas, se tomaron fragmentos representativos del tumor para su posterior análisis. Según correspondiese, se procedió a la:

4.1. fijación en formol: las piezas se mantuvieron durante varias horas (según el volumen del fragmento de tejido) en formaldehído al 10% en PBS. Posteriormente se sometió a una serie ascendente de alcoholes y xilol, para ser luego incluido en parafina. Tras ser seccionados, los cortes (5-7 μm) se desparafinaron y rehidrataron para su coloración por hematoxilina-eosina o su procesamiento por inmunohistoquímica.

4.2. conservación a -70°C : se incluyeron en OCT (embedding médium for frozen tissue specimens, Tissue-Tek) y se conservaron a -70°C hasta ser procesadas por crióstato. Las secciones de tejido se montaron en portaobjetos pretratados con Poli-L-lisina para garantizar su adhesión, se fijaron en acetona fría durante 10 min., y se rehidrataron durante 5-10 min. en PBS para luego continuar con técnicas inmunohistoquímicas.

4.3. Biopsias: las muestras utilizadas para el estudio de MCP-1, angiogénesis y macrófagos provienen de biopsias o intervenciones quirúrgicas de pacientes con melanomas metastásicos fijadas en formaldehído 10% y procesadas según se describe en 4.1.1.

4.4. Muestras para microscopía electrónica: Las células endoteliales crecidas hasta confluencia se fijaron con glutaraldehído 3% y se levantaron con un *scraper*. Luego fueron post fijadas con tetróxido de osmio y deshidratadas mediante una serie creciente de alcoholes para ser finalmente embebidas en resina Spurr. Subsecuentemente, el taco se cortó con una cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Sorvall M-T-B y las secciones se colorearon con citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio TEM JEOL 1200EXII (Servicio de Microscopía Electrónica, CICV, INTA-Castelar).

5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de tejido se preincubaron durante 20 min con suero normal de conejo (1:20) para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo específico (ver Tabla) a temperatura ambiente por 2 hs u overnight a 4°C en cámara húmeda.

MOLÉCULA	CÉLULAS EVIDENCIADAS	ANTICUERPO	PROCEDENCIA
MCP-1	Células de melanoma	5D3 F7	ascitis, cedido por Dr. A. Mantovani, Instituto Mario Negri, Milán
CD68	Macrófagos humanos	HAM 56	Dako, Glostrup, Denmark
CD34	Endotelio humano	QBEND10	Immunotech
CD31/ PECAM-1	Endotelio murino	MEC 13.3	sbn. de hibridoma, cedido por Dr. A. Mantovani, Instituto Mario Negri ,Milán
CD11b	Polimorfonucleares murinos	RB6-8C5	sbn. de hibridoma, cedido por Dr. A. Vecchi, Instituto Mario Negri , Milán
Mac 1 α chain	Macrófagos murinos	MAC 1	sbn. de hibridoma, cedido por Dr. A. Vecchi, Instituto Mario Negri, Milán
DEC 205	células dendríticas murinas	DEC 205	sbn. de hibridoma, cedido por Dr. A. Vecchi, Instituto Mario Negri, Milán
TM β 1	Céls. Natural Killer murinas	TM β 1	sbn. de hibridoma, cedido por Dr. A. Vecchi, Instituto Mario Negri, Milán
F4/80	Macrófagos murinos	F4/80	Pharmingen

vWF	Células endoteliales	Factor VIII-Related Antigen	DAKO Corporation
α -actina de músculo liso	Pericitos	clone 1A4	Dako A/S, Denmark
VCAM-1	Células endoteliales	MK 1.9	sbn de cultivo del hibridoma
ICAM-1	Células endoteliales	CRL1878	sbn de cultivo del hibridoma
ELAM	Células endoteliales	21KC10	sbn de cultivo del hibridoma
VE caderina	Células endoteliales	19E6	Dr E. Dejana, Inst.Mario Negri, Milán

Después de dos lavados de 10 min con PBS, los cortes histológicos se incubaron con una dilución 1:100 de Ig G puente (rabbit anti- rat IgG, whole molecule, Sigma) durante 30 min., seguida de una incubación con el complejo peroxidasa anti-peroxidasa de rata (PAP, Accurate Chemicals) durante 60 min a temperatura ambiente. Luego de abundantes lavados con PBS, se procedió al revelado usando como sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB 1mg/ml de PBS, Sigma) y 0,03% de H₂O₂ 30 volúmenes. Posteriormente las muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris (1/100), se deshidrataron en serie ascendente de alcoholes y xilol, y se montaron con bálsamo de Canadá.

La presencia de la peroxidasa endógena en los tejidos se inhibió, previo a la incubación con el anticuerpo primario con una solución 3% de H₂O₂ 30 volúmenes.

6. CUANTIFICACIÓN

6.1. Infiltrado inflamatorio: el conteo del número de macrófagos y PMN infiltrantes en el tejido tumoral se realizó en diez campos de 1000X, en cada uno de los tumores examinados . Los valores obtenidos se procesaron para obtener las medianas y rangos de cada grupo. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Wilcoxon no paramétrico (non-parametric Wilcoxon rank test).

6.2. MCP-1: la expresión de esta quemoquina se reportó de dos maneras. Una de ellas fue como porcentaje de células MCP-1 positivas. La otra forma fue midiendo únicamente la intensidad de coloración de los citoplasmas de las células tumorales

por exclusión de las áreas nucleares. Esta medición se realizó con la asistencia de un digitalizador de imágenes (Kontron Elektronik) en cinco campos de 400X. La intensidad del cromógeno se evaluó como la inversa de los valores de grises promedio (1/MG mean grey) detectados por el analizador. Se consideró como basal de marcación, la intensidad obtenida cuando el anticuerpo primario se sustituyó por PBS

6.3. Vascularización en biopsias de melanoma: el conteo de vasos se realizó en diez campos consecutivos de 100X de aumento. También se hicieron valoraciones de área y perímetro de vasos con la asistencia de un analizador de imágenes.

6.4. Angiogénesis en tumores mamarios murinos: en cada muestra, el número de estructuras microvasculares se contó en tres campos de 200X abarcando las áreas de más activa angiogénesis o “hot-spots”. Para el caso de las piezas tumorales resecadas a mayor tiempo post trasplante, comenzaron a observarse vasos de mayor calibre, principalmente intraseptos, los cuales no fueron considerados por no considerarse dentro del rango microvascular. Para el caso de las biopsias analizadas en 6.3, se consideraron vasos de todo calibre como una medida general de perfusión vascular, sin discriminar si eran de la micro o macrovasculatura.

6.5. Macrófagos asociados al tumor (TAM: tumor-associated macrophages): se realizó en campos de 400X en tres áreas intratumorales seleccionadas al azar entre los 10 campos elegidos para la cuantificación de vasos. No se consideraron los TAM presentes en estroma o áreas necróticas.

6.6. Edema y necrosis: para la valoración del edema se determinó la distancia (en μm) entre la membrana basal de la epidermis y el borde tumoral. Para cada muestra, se tomaron 10 mediciones en campos de 25X y luego se promediaron para obtener el valor de edema promedio para dicha muestra tumoral. El porcentaje de necrosis se calculó tomando la suma de todas las regiones necróticas en función del área total del tumor en campos de 25X. Ambas determinaciones se realizaron con la asistencia del analizador de imágenes antes mencionado.

7. PRESENCIA DE MARCADORES CELULARES

La determinación de los niveles de diversas moléculas de adhesión, presencia del factor de von Willebrand (vWF) y de α -actina de músculo liso se efectuó por alguna de las siguientes metodologías: ELISA e inmunofluorescencia.

7.1. ELISA sobre células vivas: se sembraron 20.000 células de cada uno de los supuestos clones de células endoteliales en placas de 96 pocillos, las cuales estaban cubiertas con gelatina 1%. Allí se mantuvieron durante dos días en medio endotelial completo hasta que llegaron a confluencia. Llegado a este punto, se descartaron los sobrenadantes y las células se lavaron con PBS-0,5% FBS precalentado a 37°C. Luego se colocaron 100 μ l de una dilución 1:3 del anticuerpo monoclonal correspondiente (anticuerpos rata anti ratón dirigidos contra CD31, VCAM-1, ICAM-1, VE-caderina y ELAM; ver Tabla) y colocando la placa tapada sobre hielo, se incubó durante 1 h. Posteriormente, se descartan los anticuerpos por inversión y se lavaron cuidadosamente las monocapas con la solución PBS-0,5% FBS fría. Como anticuerpo secundario se utilizó una IgG conjugada a peroxidasa en dilución 1:2000 en frío (horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rat IgG, Amersham Inc, Amersham, UK). Para el revelado se utilizó el sustrato cromogénico ABTS (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD). Se midió la absorbancia a 405 nm.

La activación de las células endoteliales se consiguió cultivándolas en presencia de 1,5 μ g/ml de LPS. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y se realizaron entre dos y tres experimentos independientes.

7.2. Inmunofluorescencia: la presencia de ciertas moléculas de adhesión y del factor de von Willebrand (vWF) fue determinada por inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron cortes de tejido o células cultivadas sobre portaobjetos. En ambos casos, las piezas se fijaron en formaldehído al 4% durante 15 min. a temperatura ambiente y luego se incubaron durante 60 min. en presencia de la dilución apropiada según el anticuerpo monoclonal ensayado. Posteriormente a los lavados con PBS, las muestras se incubaron durante 60 min. con un anticuerpo secundario fluoresceinado (cabra anti-conejo-FITC 1:140, cabra anti-ratón 1:250.

Todos provenientes de Sigma) en cámara húmeda y protegidas de la luz. Luego de varios lavados con PBS, se montaron en 90% glicerol / PBS.

Dada la dificultad en encontrar anticuerpos anti vWF y alfa actina murinos se utilizaron los correspondientes anticuerpos anti humano (ver Tabla). La especificidad de la reacción se constató utilizando como control negativo incubaciones con anticuerpos del mismo isotipo. Para el caso de la detección de alfa actina, como se esperaba que las células endoteliales fueran negativas, se utilizaron aislamientos frescos de células musculares de ratón como control de positividad y reconocimiento del anticuerpo empleado.

7.3. Incorporación de partículas de LDL acetilado: La incorporación de lipoproteínas de baja densidad (LDL: low density lipoproteins) es una característica que ayuda a perfilar el fenotipo de una célula que se supone de linaje endotelial. Para ello, se plaquearon sobre cubreobjetos células del clon REC-A4, 1G11 y macrófagos peritoneales residentes. Las células aún vivas se lavaron con PBS y se incubaron durante 4 hs a 37°C en medio libre de suero conteniendo 10 µg/ml de LDL acetilado (Di-I-Ac-LDL; Biogenesis Ltd., Biogenesis, NH) acoplado a un trazador rojo fluorescente (1,1'-dioctadecyl-1-3,3',3'-tetramethyl-indo carbocyanine perchlorate). Luego de varios lavado con medio libre de suero, las células se fijaron con formol 4% y se observaron al microscopio con filtros para rodamina.

8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad de las células frente a la exposición a Shigatoxina-1 o LPS se evaluó por el método de MTT (3(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma). Brevemente, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos cubiertas con gelatina 1% a una densidad de 2×10^5 células/ml. Éstas se dejaron *overnight* en medio de cultivo completo para su total adherencia previo a cualquier tratamiento. Luego del tratamiento, se descartó el medio por inversión de la placa y se agregó 50 µl de MTT 1mg/ml en medio contiendo 1% FBS. Se incubaron las células durante 4 h. a 37°C en estufa gaseada. Luego de descartar la solución, se agregaron 100 µl de etanol absoluto a

cada pocillo. La placa se incubó con agitación suave y protegida de la luz durante 10 min. La absorbancia se leyó inmediatamente a 595 nm.

9. CRIOCIRUGÍA O CRIOTERAPIA

9.1 GRUPOS DE TRATAMIENTO

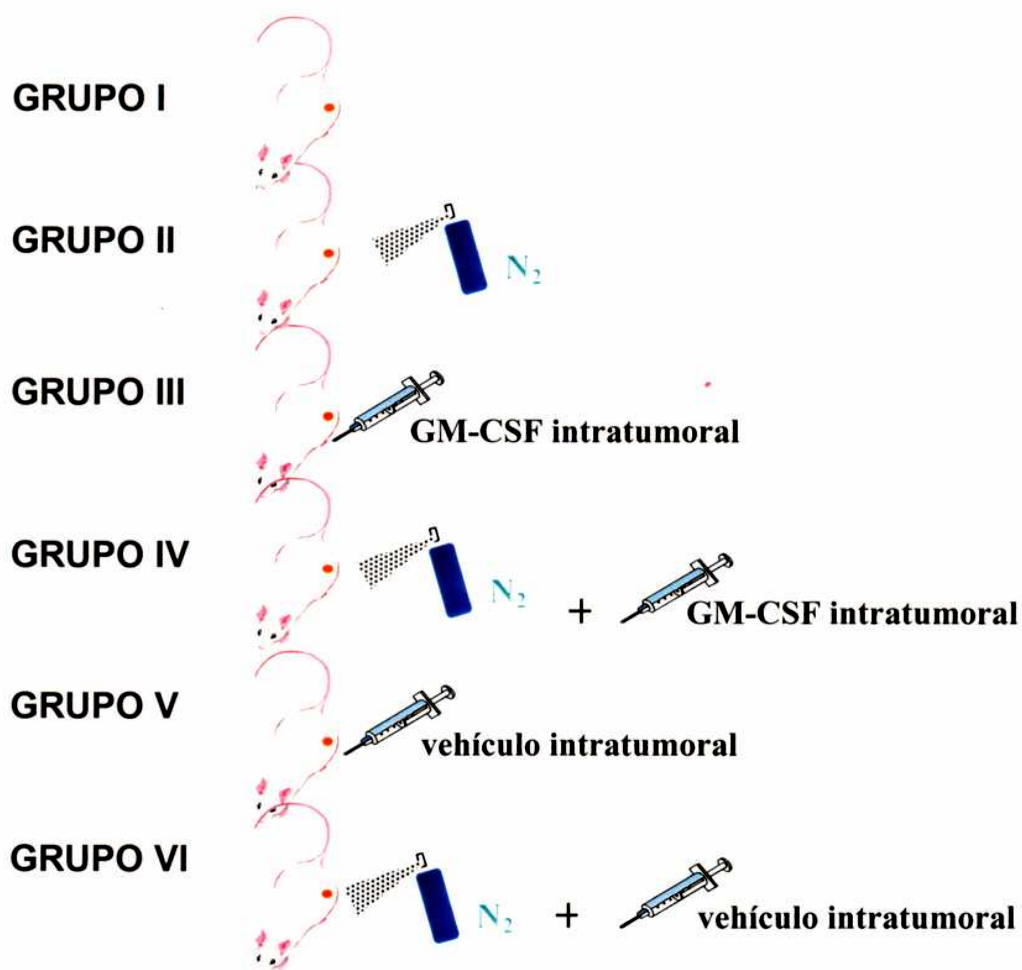
La inducción de necrosis se realizó por criocirugía. Para ello, ratones *nude* portadores de tumores IIB-MEL-J correspondientes a los grupos tratados se anestesiaron con 0,3 ml de pentobarbital (5mg/ml) intraperitoneal. Luego se les aplicó un rocío intermitente de nitrógeno líquido con un aparato diseñado para tal fin (Cry-A-C device, Brymill, Ellington, CT) usualmente utilizado para el tratamiento de alteraciones vasculares. Esta aplicación se realizó sobre la piel existente por encima del tumor durante un tiempo que se ajustó en función del tamaño del tumor. Sin embargo, el tiempo máximo de aplicación para los tumores más grandes no excedió los 45 seg. El rocío se emitió a una distancia de 1-2 cm de la superficie de la piel y a un ángulo de 90°. En los primeros casos, se utilizó una termocupla, ubicada en la periferia del tumor, para evaluar las temperaturas alcanzadas durante el tratamiento. Después del procedimiento de congelación, la temperatura corporal de los ratones bajaba considerablemente, por lo cual se los dejó recuperarse de la anestesia en una almohadilla térmica. Se consideró como día 0 de tratamiento el día del tratamiento con crioterapia. Un día más tarde, un grupo de ratones criotratados recibió una dosis única de rm GM-CSF de 500 U (EC₅₀: 0.12 ng/ml, Sigma) aplicada intratumoralmente con aguja de tuberculina (27 ½ gauge).

9.2 GRUPOS CONTROLES

Un grupo de animales portadores de tumores se mantuvo sin realizarle tratamiento alguno. Sin embargo, fueron anestesiados con la misma dosis de pentobarbital que los tratados con crioterapia. Otro grupo de ratones recibió una dosis de rm GM-CSF intratumoral sin aplicación de nitrógeno, de manera de evaluar el efecto de la citoquina *per se*. Para evaluar el efecto de la inoculación intratumoral en sí misma, se estructuró un grupo donde se inyectó vehículo (PBS- 0,1% soroalbúmina bovina, BSA) y otro grupo donde se inyectó vehículo en los tumores tratados con el rocío de nitrógeno. Los

animales (8-10 por grupo) de todos los grupos se sacrificaron a día 3 y 15 post tratamiento.

Resumiendo, el ensayo contó con los siguientes grupos de estudio:



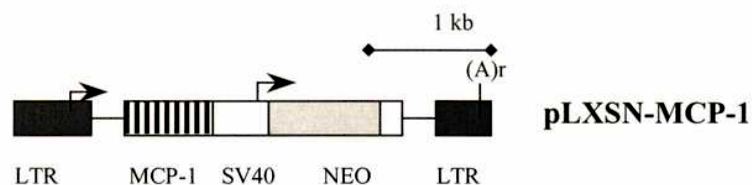
9.3 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL

Para analizar posibles cambios en el nivel de anticuerpos, al día 15 y previo al sacrificio, se extrajo sangre por punción cardíaca de cada uno de los ratones anestesiados. Para la obtención de los sueros, se dejaron los tubos con sangre en un baño a 37°C de manera que se produzca la retracción del coágulo y luego se centrifugaron a 2500 rpm por 5-10 min. El suero alicuotado en pequeñas cantidades se conservó a -70°C hasta el momento de su uso.

La especificidad de los anticuerpos presentes en el suero se estudió por la técnica de ELISA e inmunofluorescencia. Para el ELISA se plaquearon 10^4 células IIB-MEL-J en fase exponencial en placas de 96 pocillos y se dejaron *overnight* con medio de cultivo apropiado para permitir su adherencia. Luego se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en formaldehído 4% por 10 min.. Se utilizó PBS – 1% BSA (1 hora a temperatura ambiente) para bloquear el pegado inespecífico de anticuerpos. Luego se incubaron las células *overnight* a 4 °C en presencia de una dilución 1/25 o 1/50 de los sueros obtenidos. Posteriormente a lavar los pocillos tres veces con una solución de PBS –0.1% BSA, se agregó una dilución 1/250 de un policlonal conejo anti inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa (Dako Corporation, CA) durante 90 min. Luego de varios lavados con PBS –0.1% BSA, se reveló con o-fenilendiamina y se leyó la absorbancia a 415 nm.

10. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE LA LÍNEA IIB-MEL-J

El plásmido de expresión utilizado para la transfección pLXSN fue cedido por la Dra. Bárbara Botazzi del Instituto Mario Negri. El **pLXSN** contiene un inserto con un cDNA de 700 pb correspondiente a la secuencia del MCP-1 humano (**pLXSN-MCP-1**) bajo el control del LTR del virus Moloney de leucemia murina y el gen de la neomicina fosfotransferasa bajo el control del promotor temprano de SV40, generando una unidad transcripcional bicistrónica (Esquema). El gen de resistencia a ampicilina en el cuerpo del vector.



Para obtener una cantidad suficiente para la transfección se procedió a transformar bacterias *NovaBlue* competentes, las cuales se crecieron en presencia de ampicilina (60 µg/ml) para permitir el crecimiento de sólo aquellas que hubiesen incorporado el plásmido. Cuando alcanzaron una D.O = 0.6, los cultivos se procesaron por la técnica

de Miniprep para obtener el plásmido. La preparación purificada se testeó en cuanto a concentración y pureza por absorbancia a 260nm / 280nm.

La transfección por lipofección se realizó con el kit Lipofectamine Plus™ (Gibco BRL). Brevemente, el día anterior a la transfección se sembraron células IIB-MEL-J en una placa de cultivo de 60mm de manera que 24 hs más tarde llegasen entre un 50-70% confluencia. 5µg del plásmido **pLXSN-MCP-1** o del plásmido vacío **pLXSN** se utilizaron bajo las condiciones especificadas en el kit Lipofectamine. Al día siguiente se adicionó medio de cultivo fresco y 48 hs después de la transfección se adicionó el antibiótico G-418 (800 µg/ml). La presencia del antibiótico de selección se mantuvo hasta que todas las células de la placa control (no transfectada) murieron. Luego se retiró el antibiótico y se permitió el crecimiento y aparición de colonias, las cuales se tripsinizaron y pasaron a pocillos de multiwell de 24 para su amplificación y establecimiento como sublíneas independientes.

Para confirmar la presencia del plásmido, a partir de cada sublínea o clon se aisló el DNA plasmídico y se constató la presencia del inserto y se constató el nivel de expresión de la quemoquina por dot/slot-blot y ELISA captura.

10.1. ELISA Captura para MCP-1: se incubó una dilución de 3 µg/ml del suero policlonal conejo anti Hmcp-1 en binding buffer se plaquea en placas de 96 pocillos Maxisorp™ *overnight* a 4°C. Este anticuerpo funcionará como anticuerpo de captura. Se descarta el anticuerpo, se bloquea con 1% BSA por 1 h a temperatura ambiente y luego se lava tres veces con PBS 0.05% Tween (buffer de lavado). 100µl de distintas diluciones de MCP-1 standard o sobrenadantes de cultivo se plaquean por triplicado y se incuban 2 hs a 37°C. La placa se lava tres veces con buffer de lavado y se agregan 100 µl de anticuerpo anti MCP-15D3F7 dil 1/300 en buffer de lavado. Se incubó durante 1 h a 37°C y luego de tres o más lavados se adiciona una IgG conjugada a peroxidasa en dilución 1:2000 (peroxidase-conjugated sheep anti-rat IgG, Amersham Inc, Amersham, UK). Para el revelado se utilizó el sustrato cromogénico ABTS (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD). Se midió la absorbancia a 405 nm.

11. SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS POR GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE

Los monocitos humanos utilizados para ensayos de quimiotaxis se obtuvieron de la siguiente forma : por cada 100 ml de sangre, se agregaron 6 ml de dextrán 10 % en NaCl 0,15 M y se dejó en reposo. Este proceso produce la precipitación de los glóbulos rojos. Al cabo de una hora, se tomó el sobrenadante con pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de 50 ml. Al precipitado de glóbulos rojos se le agregó, en PBS 1X con Ca^{++} - Mg^{++} , el mismo volumen que se retiró y mezclando suavemente por inversión, se adicionó la mitad del dextrán agregado anteriormente, se homogeneizó y dejó otra hora para sedimentar.

Por otra parte se prepara una mezcla de 24 partes de Ficoll 9% + 10 partes de Hypaque (Triyosom) 33,9% y se homogeneiza suavemente con pipeta. En varios tubos se colocan 5 ml de dicha mezcla y, por encima y muy suavemente, permitiendo que se formen una interfase nítida, se agregan 7 ml del sobrenadante antes apartado. Se centrifuga a 1500 rpm durante 30 min.

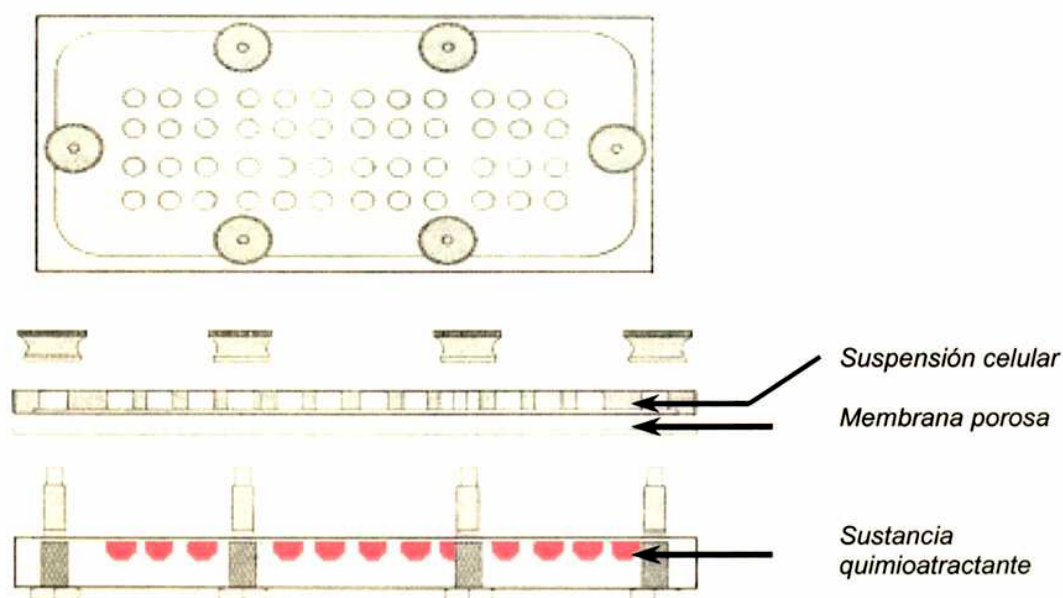
En el fondo del tubo, se observan algunos glóbulos rojos y leucocitos polimorfonucleares. En la interfase, se observa una banda opalescente (monocitos y linfocitos) que se aspira con pipeta Pasteur y se pasa a otro tubo. Al volumen de células separadas se le agregan 5 veces más de PBS 1X Ca^{++} - Mg^{++} y se centrifugan a 2500 rpm por 10 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio MEM o RPMI 10% FBS para su recuento en cámara de Neubauer a 400X.

12. ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS

Este ensayo permite evaluar y cuantificar la movilidad de células frente a diversos estímulos. Para ello se requiere de un dispositivo llamado *Cámara de quimiotaxis*, la cual presenta pequeños pocillos en la parte inferior donde se carga la sustancia quimioattractante (27,5 μl) como se ve en el esquema.

Entre el compartimiento inferior y superior, se ubica una membrana porosa, y una vez ensamblada, se definen pocillos superiores donde se carga la suspensión celular (40-50 μ l).

Las membranas utilizadas dependen del tipo de célula a ensayar. En este trabajo de Tesis se utilizaron membranas de 5 μ m de poro para las migraciones de monocitos y células dendríticas y de 8 μ m pre-tratadas con gelatina 1% para la migración de las células de melanoma humano. El tiempo de migración fue de 1,5 hs y 12 hs respectivamente. Una vez finalizado dicho tiempo, se desmontó la cámara y la membrana, se fijaron en metanol, se colorearon con Giemsa y se montaron con bálsamo para la observación microscópica. La cuantificación se detallará en cada caso.



13. ENSAYOS DE ADHESIÓN AL ENDOTELIO

Para evaluar si existía una capacidad diferencial de adhesión de las células transfectadas de melanoma humano al endotelio, se utilizó como modelo de endotelio humano, cultivos de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC). Estas se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos previamente gelatinizadas (1%) a una densidad de 10.000 células/pocillo y se dejaron 48 hs. hasta que alcanzaran la

confluencia. Para evaluar el efecto de distintos estímulos sobre la adhesión, las HUVEC se incubaron durante 4 hs en presencia de LPS (10µg/ml) o hMCP-1 recombinante a la concentración producida por el clon productor (0.1 ng). Transcurrido ese tiempo, se remueve el medio, se hacen dos lavados con PBS y se adiciona medio completo y se incuba durante 15-20 min, tiempo en que se obtienen las suspensiones de células tumorales.

Las células tumorales, incubadas 24 hs antes con 1µCi/ml de ³H-timidina, se levantan con EDTA 1X como se describiera previamente, se cuantifican y se lavan dos veces con PBS para eliminar el EDTA. Una vez obtenidas las suspensiones, se plaquean 50.000 células tumorales sobre las HUVEC y se dejan en contacto durante 30 min para que transcurra la adhesión. Luego se levanta el sobrenadante y se lava de 2-3 veces con PBS para eliminar las células tumorales no adheridas. Se agregan 200 µl de NaOH 0,2 N para lisar las células adheridas al igual que a un tubo con 50.000 células tritiadas para tener el dato de la cantidad de radioactividad asociada a las células iniciales sembradas y poder luego obtener el porcentaje de adhesión. Posteriormente, se procede a precipitar el ADN para lo cual se adicionan: 200 µl ADN carrier + 0,7 ml de agua destilada + 0,1 ml de PPINa 0,1M + 1 ml de TCA 10%, dejando que la precipitación transcurra durante 10 min en hielo.

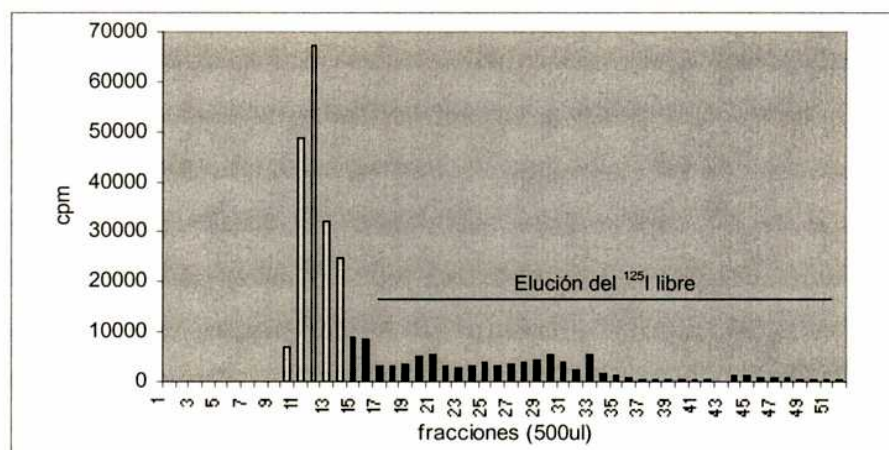
Luego se filtran los precipitados por filtros de fibra de vidrio GF/C, lavándolos con diversas soluciones (15 ml de solución de lavado (HCl 0,2M + PPINa 0,03M); 8 ml de HCl 0,05M y 2 ml de etanol absoluto). Se dejan secar y se cuentan al contador de centelleo en 2 ml de tolueno Omnifluor.

15. IODINACIÓN DE GM-CSF

1 mg de Iodogen (Pierce) se resuspendió en 10 ml de cloroformo y se prepararon tubos de hemólisis con este reactivo dejando evaporar hasta sequedad. Luego se preservaron protegidos de la luz y humedad hasta su uso. Para la iodinación, uno de estos tubos se lavó previamente con PBS y luego se agregaron 50µg de rmGM-CSF, 40µl de buffer fosfato 50mM pH 7.4 y 1-2 µl de ¹²⁵I (500µCi) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min con agitación ocasional. La reacción se frenó con el agregado de 1M NaI a la mezcla de reacción.

El ^{125}I -GM-CSF se separó del ^{125}I libre pasando el incubado por una columna Sephadex G-25 medium (Pharmacia) pre-equilibrada con buffer PBS-0.1% BSA. El pico de ^{125}I -GM-CSF eluye con el V_0 de la columna (la determinación del V_0 se realizó haciendo pasar 5 μl de Dextrán blue al 5%). Se asumió un rendimiento del 80% en la obtención de la citoquina luego del pasaje por la columna según Park y col., 1986.

La actividad específica obtenida fue 23.7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y la concentración de GM-CSF resultó 21.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Las barras claras corresponden a las fracciones reservadas para hacer stock de ^{125}I -GM-CSF.

16. ADMINISTRACIÓN DEL GM-CSF IODINADO

Se inyectó subcutáneamente en el muslo de ratones *nude* normales o intratumoralmente en tumores obtenidos por la inyección de las líneas B16/F1 e IIB-MEL-J.

A distintos tiempos se sacrificaron los animales y se extrajeron el sitio de inyección o el tumor y en ambos casos se cuantificó la radiactividad remanente en las piezas de tejido con o sin procesamiento. Para el procesamiento, las piezas de tejido extraídas fueron finamente disgregadas con bisturí. El tejido procesado se pasó a un tubo eppendorf y se dejó durante 1 hora a 4°C en contacto con buffer de extracción [2% Tritón X100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 1mM PMSF,

PBS 1X c.s.p.]. Luego las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex por unos minutos y se centrifugaron a baja velocidad para sedimentar los fragmentos grandes de tejido. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf y para producir la precipitación de las proteínas se utilizó 10% TCA (ácido tricloroacético), 12% PCA (ácido perclórico) o 2 volúmenes de acetona fría. Esta incubación se realizó en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. El pellet y sobrenadante se pusieron en viales independientes para evaluar la radiactividad asociada al GM-CSF y la marca correspondiente al ^{125}I libre respectivamente.

CAPÍTULO I



CAPITULO I

“Angiogénesis tumoral y Células Endoteliales”

Como resultados previos del laboratorio en el marco de un proyecto en colaboración para el estudio de la interrelación entre citoquinas y elementos vasculares, se generaron líneas de CE transformadas por el antígeno Middle T del Polyoma virus [Garlanda y col., 1994] las cuales fueron utilizadas como inmunógeno para la obtención de los anticuerpos monoclonales (AcM) MEC 13.3 y MEC 7.46 [Vecchi y col., 1994]. Ambos anticuerpos reaccionan contra la molécula de adhesión CD31/PECAM; por lo tanto se evaluó su capacidad de reconocimiento de CE en diversos tejidos normales [Vecchi y col., 1994]. Sin embargo, no se tenían datos sobre la capacidad de estos anticuerpos de evidenciar la vasculatura en procesos neoplásicos. Los procesos neoplásicos pueden afectar directamente los componentes celulares de las paredes de los vasos y en consecuencia el fenotipo de las CE. Debido a la gran heterogeneidad morfológica y funcional de las CE, son necesarios nuevos modelos experimentales para el estudio de estas células en distintos tejidos.

Por lo tanto se planteó:

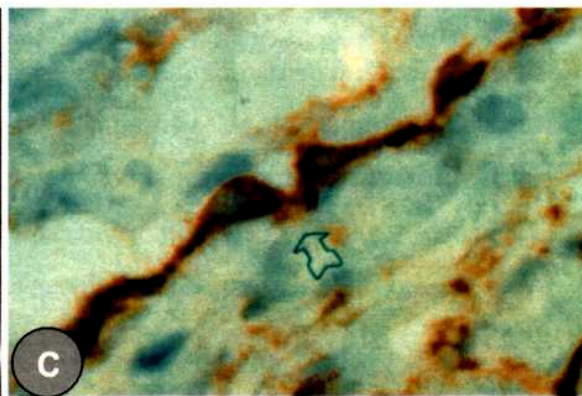
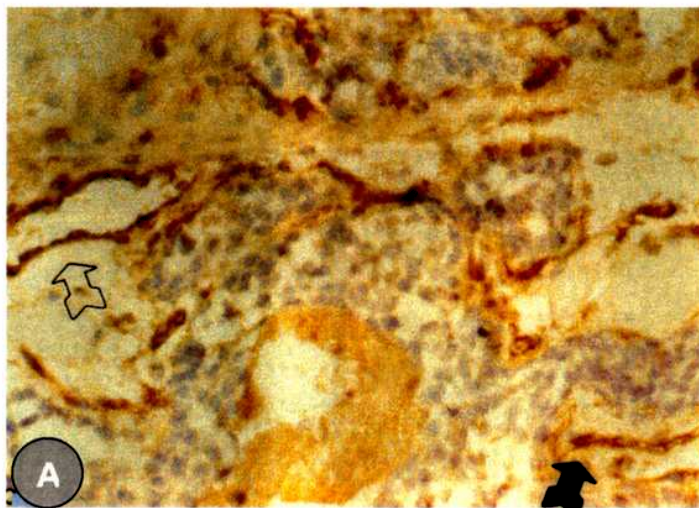
1. evaluar la utilidad del AcM MEC 13.3 para el reconocimiento de la microvasculatura de tumores,
2. analizar si existía correlación entre angiogénesis y comportamiento biológico del tumor,
3. utilizar el AcM MEC 13.3 como herramienta para el aislamiento de CE de tumores murinos y tejidos normales mediante un método inmunomagnético.

(I. 1) EL AcM MEC 13.3 RECONOCE EL ENDOTELIO VASCULAR TUMORAL

El AcM MEC 13.3 fue utilizado para visualizar vasos sanguíneos por inmunohistoquímica en secciones criostáticas de tumores mamarios murinos. El patrón de reactividad fue semejante en los tejidos neoplásicos y normales, donde la inmunomarcación permitió la clara detección de capilares, venas y arterias, sin presentar reactividad inespecífica en otros tipos celulares (**Fig. 1A**). Las CE de estas estructuras vasculares se colorearon intensamente mostrando reforzamiento de marcación en

membranas tanto por inmunofluorescencia (**Fig. 1B**) como por inmunoperoxidasa (**Fig. 1C**), coherente con la expresión de esta molécula de adhesión en la superficie celular.

Las **Figuras 1D** y **1E** muestran el área subcapsular de un tumor donde se advierte la ventaja de este anticuerpo para evidenciar la vasculatura tumoral respecto de los tejidos contrastados con hematoxilina.



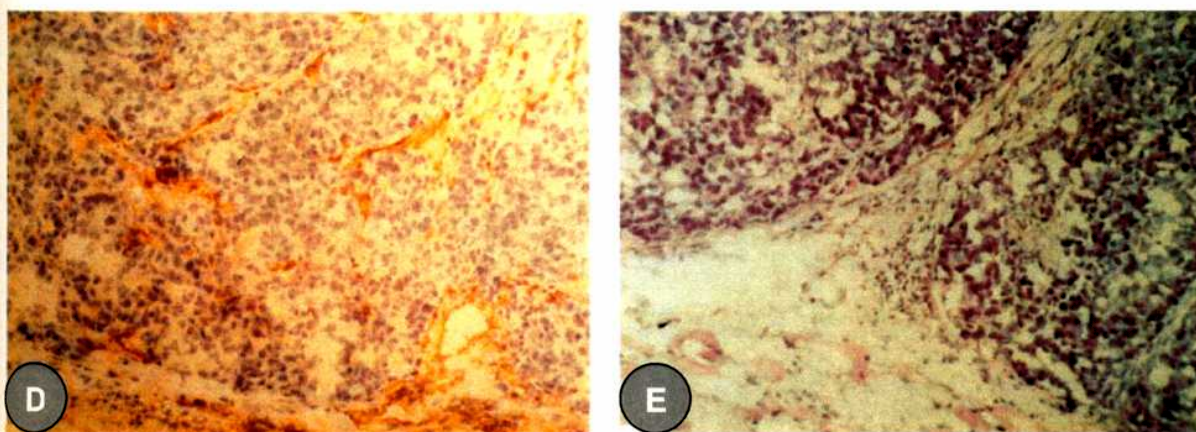


FIGURA 1:

(A) Adenocarcinoma mamario murino (250X): nido tumoral con necrosis central donde se destacan un vaso colapsado (flecha oscura) y otro no colapsado (flecha clara). (B) Inmunofluorescencia de una sección longitudinal de un microvaso del tejido tumoral (400X). (C) Detección por inmunoperoxidasa de la expresión de CD31 en células endoteliales con gran intensidad de marcación (1000X). (D) Área subcapsular de un tumor mamario mostrando expresión de CD31 en sus vasos, (E) sección de la misma área contrastada con hematoxilina.

(I. 2) ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS EN TUMORES MAMARIOS MURINOS

La clara visualización de los vasos sanguíneos por la inmunomarcación con el AcM MEC 13.3 permitió realizar una valoración cuantitativa de la angiogénesis en adenocarcinomas mamarios de ratón. Uno de los métodos más comúnmente utilizados para la estimación consiste en localizar las áreas intratumorales de mayor densidad vascular o “hot spots”. Así, se evaluó la neovascularización en relación con diversas características de los adenocarcinomas utilizados:

- Tipo histológico del tumor ,
- Tasa de crecimiento *in vivo*,
- Capacidad metastásica.

(I. 2. a) Tipo histológico del tumor

Se tomaron ocho tipos distintos de adenocarcinomas mamarios los cuales se categorizaron según los histotipos lobulillar y ductal. Secciones criostáticas se

procesaron por inmunohistoquímica para la detección de CD31. La cuantificación de la vascularización en los *hot-spots* no mostró diferencias a nivel de angiogénesis para estos dos tipos de tumores (**Figura 2**).

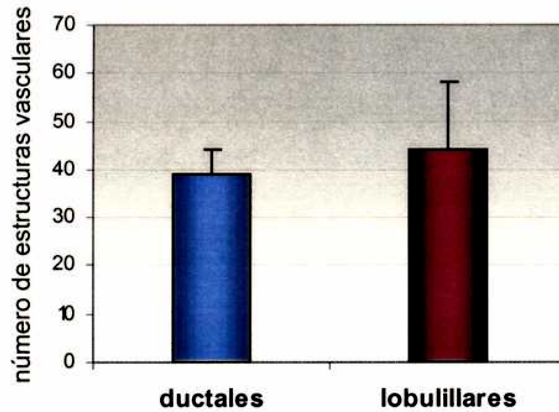


FIGURA 2:

Número de estructuras microvasculares detectadas con el AcM MEC 13.3 en tumores mamarios murinos de origen ductal y lobulillar. Se cuantificó el número de microvasos en 10 campos de 200X.

(I. 2 . b) Tasa de crecimiento in vivo

En primera instancia se determinó la cinética del crecimiento tumoral, a partir de lo cual se seleccionaron dos tipos de tumores, aquéllos que llamamos de crecimiento lento (CL) y los de crecimiento rápido (CR) (**Figura 3**). Para los estadios tempranos del desarrollo tumoral, presentan un aumento del desarrollo microvascular a medida que el tumor progresa (**Figura 4**). Luego de los 40 días aproximadamente, el tumor CR describe un aumento, que resulta particularmente marcado para la línea que produce metástasis, CRM.

La cinética lineal de desarrollo del tumor CL sugiere que este tumor tendría características de tumor benigno. Como se observa en la Figura 4, luego de los 40 días de transplantado, la angiogénesis tumoral tiende a estabilizarse. Probablemente entonces, tal estabilización sea la responsable la ausencia de un crecimiento exponencial en este tumor.

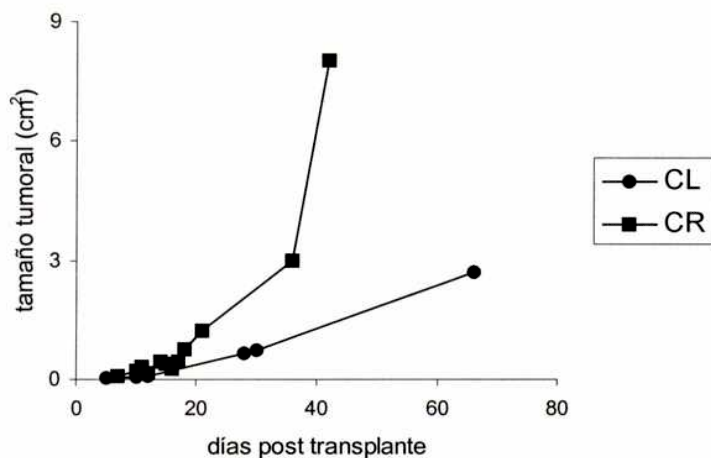


FIGURA 3:

Curva de desarrollo tumoral correspondiente a tumores mamarios murinos

Los tumores fueron detectados por palpación y medidos con calibre a diversos tiempos post trasplante. CL y CR alude a los tumores de crecimiento lento y crecimiento rápido, respectivamente.

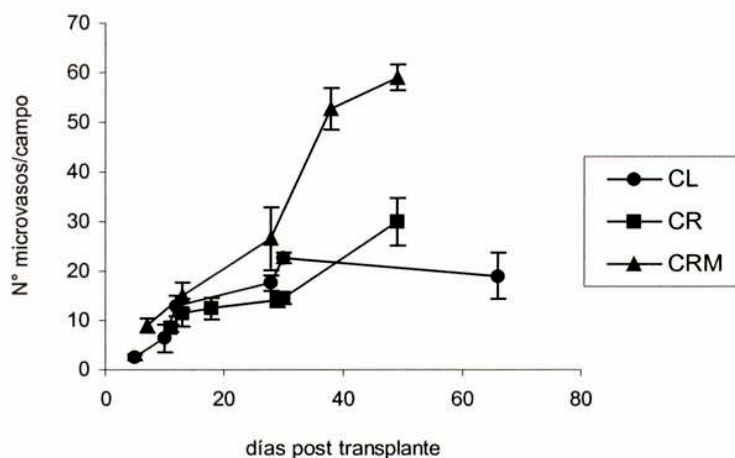


FIGURA 4:

Cuantificación del número de estructuras microvasculares en las áreas de más activa angiogénesis. Los tumores se extirparon a distintos tiempos y se procesaron para la determinación de CD31 con el AcM MEC 13.3. Se realizaron tres experimentos independientes. Cada valor representa la media de cuatro muestras, y en cada una de las cuales se analizaron cinco campos de 200X.

(I. 2. c) Capacidad Metastásica

De dos líneas de adenocarcinoma de crecimiento rápido en ratones, una de ellas produce metástasis pulmonares en forma espontánea (CRM) mientras que la otra es incapaz de producirlas (CR). El análisis de la neovascularización muestra que CRM presenta una densidad microvascular más importante que la línea con potencial metastásico casi nulo (Figura 4).

(I. 2. d.) Identificación de células aisladas inmunoreactivas para CD31

Además de la clara presencia de vasos, la inmunomarcación reveló la presencia de pequeños clusters celulares o células aisladas inmunoreactivas para MEC 13.3. Estas células CD31+ son más abundantes cuando el tamaño tumoral es pequeño y la densidad vascular es baja (Figura 5 y 6). Su número disminuye a medida que la neovascularización progresa. La tendencia a desaparecer casi por completo sólo se observó en la línea tumoral metastásica (CRM).

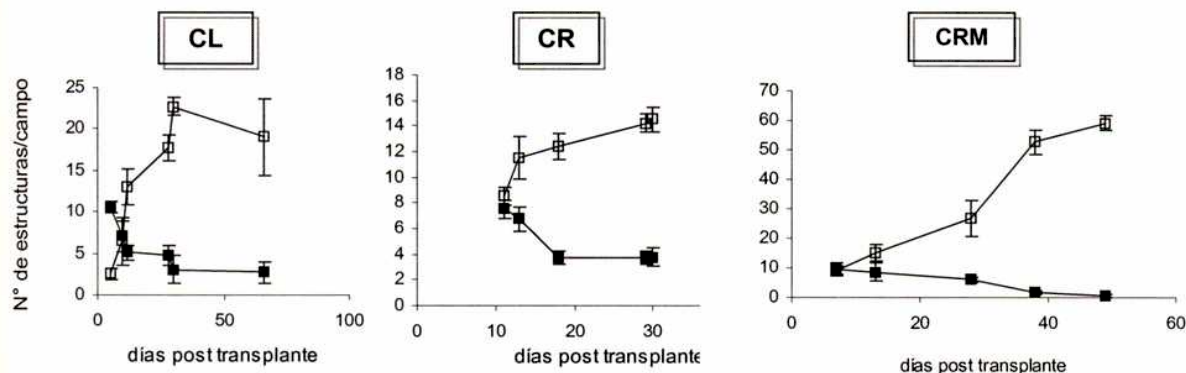


FIGURA 5:

Cinética del desarrollo microvascular (símbolos claros) comparado con la correspondiente al número de células CD31+ (símbolos oscuros) para cada una de las líneas de adenocarcinoma mamario murino. Los conteos se efectuaron en los "hot spots". Se realizaron tres experimentos independientes. Cada valor representa la media de cuatro muestras, y en cada una de las cuales se analizaron cinco campos de 200X.

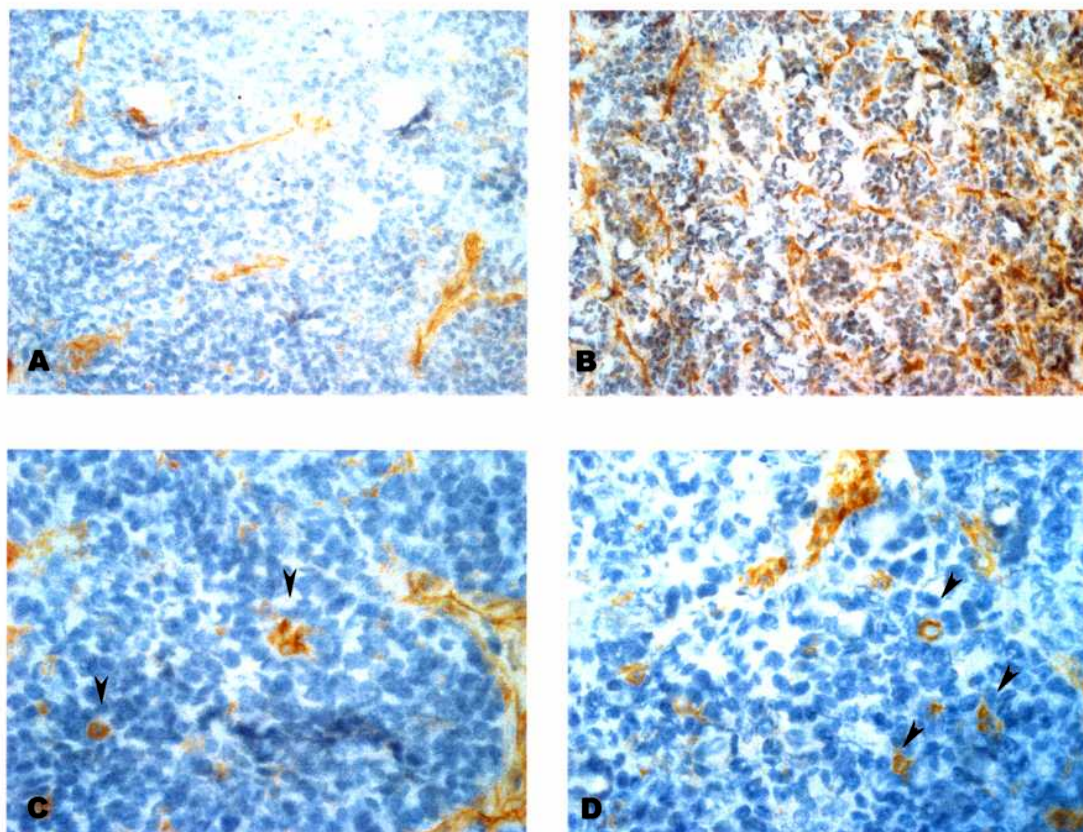


FIGURA 6: Panel de imágenes ilustrando las áreas de mayor intensidad vascular o "hot spots" correspondientes a un tumor (A) CL y (B) CRM (Aumento original 200X). (C y D) Dos campos representativos de la presencia de células inmunoreactivas para CD31 (Aumento original 400X).

(I.3) AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES

- A partir de tejidos tumorales

En Materiales y Métodos se detalla la metodología empleada de separación inmunomagnética de células utilizando Dynabeads™. Estas microesferas permiten acoplarle el AcM MEC 13.3 (al estar provistas de una inmunoglobulina anti-rata), que es el que dirige la especificidad de selección.

Los aislamientos se realizaron a partir de tejidos normales de ratones jóvenes y a partir de los adenocarcinomas mamarios murinos analizados anteriormente y de tumores humanos xenotrasplantados en ratones *nude*. Las piezas tumorales se extirparon cuando los tumores estaban en su etapa exponencial de angiogénesis -según los datos obtenidos por inmunohistoquímica- y cuando aún no presentaban demasiada necrosis por su tamaño. Los porcentajes de CE obtenidos luego del aislamiento son muy variables pero en general oscilan entre 1-10% (**Figura 7**).

En la mayoría de los casos, luego de transcurrida la primera semana en cultivo, se observan pequeños islotes de pocas células con típica morfología ‘cobblestone’ que pueden sufrir más divisiones en el transcurso de la segunda y tercera semana post-aislamiento. Este patrón se repite para los aislamientos realizados a partir de las dos líneas tumorales de crecimiento rápido metastásica y no metastásica. Sin embargo, no fue posible obtener islotes de CE de la línea tumoral de crecimiento lento. Este menor rendimiento puede estar relacionado a la menor presencia de vasos que dificulta la obtención de un número aceptable de células para el crecimiento en cultivo. .

Los cultivos primarios de CE derivadas de tumores tienen una tasa de proliferación muy baja (**Tabla I**), y envejecen más rápidamente que las CE provenientes de tejidos normales, donde sí fue posible realizar subcultivos. Para poder sostener y estimular la proliferación de estas CE, se suplementaron los cultivos con medio condicionado de las propias células tumorales a partir de las cuales se habían realizado los aislamientos. Esto contribuyó sólo inicialmente al aumento del número de células en los islotes pero no fue suficiente para sostener la tasa de división del cultivo luego de transcurridas varias semanas. El agregado de ECGS fresco solo o en conjunto con medio condicionado de sarcoma S180 dos a tres veces por semana mejoró y prolongó la longevidad de los islotes de CE pero no resultó ser suficiente para hacer que las mismas proliferen activamente en forma sostenida por mucho tiempo. Más aún, se llegaron a congelar los primeros subcultivos, pero las células no lograron recuperar la capacidad de división previa, sin que sea esto un problema de tipo

metodológico ya que la viabilidad post-congelación era alta.

Con el tiempo, aparecían células heterogéneas en su forma, especialmente células gigantes y algo vacuoladas que podrían evidenciar -junto con la baja velocidad de replicación- la carencia de factores de crecimiento “específicos” presentes en el microambiente tumoral contribuyendo al rápido envejecimiento y muerte de las CE en cultivo.

En otros casos, el mayor inconveniente fue el sobrecrecimiento de las escasas células tumorales remanentes post aislamiento (**Tabla I**).

TUMOR	LÍNEA	Cepa de ratón	Obtención de clusters de CE	Inconvenientes
Adenocarcinoma mamario humano	IIB-BR-G	nude	No	Sobrecrecimiento de células tumorales (CT)
Melanoma humano	IIB-MEL-J	nude	Sí	Baja tasa replicativa Sobrecrecimiento de CT
Adenocarcinoma mamario murino de CL	No había sido establecida como línea de cultivo, mantenida por pasajes in vivo	BALB/c	No	Baja cantidad de CE aisladas
Adenocarcinoma murino de CR	Ídem anterior	BALB/c	Sí / subcultivo ocasional	Baja capacidad replicativa. Senescencia
Adenocarcinoma mamario murino de CRM	Idem anterior	BALB/c	Sí / subcultivo ocasional	Baja capacidad replicativa. Senescencia
Carcinoma de pulmón	3LLC	C57Bl	Sí	Baja capacidad replicativa

TABLA I: Resumen de las distintas líneas tumorales a partir de los cuales se realizaron os aislamientos de CE. Para cada tipo tumoral, se realizaron de 3-7 aislamientos independientes.

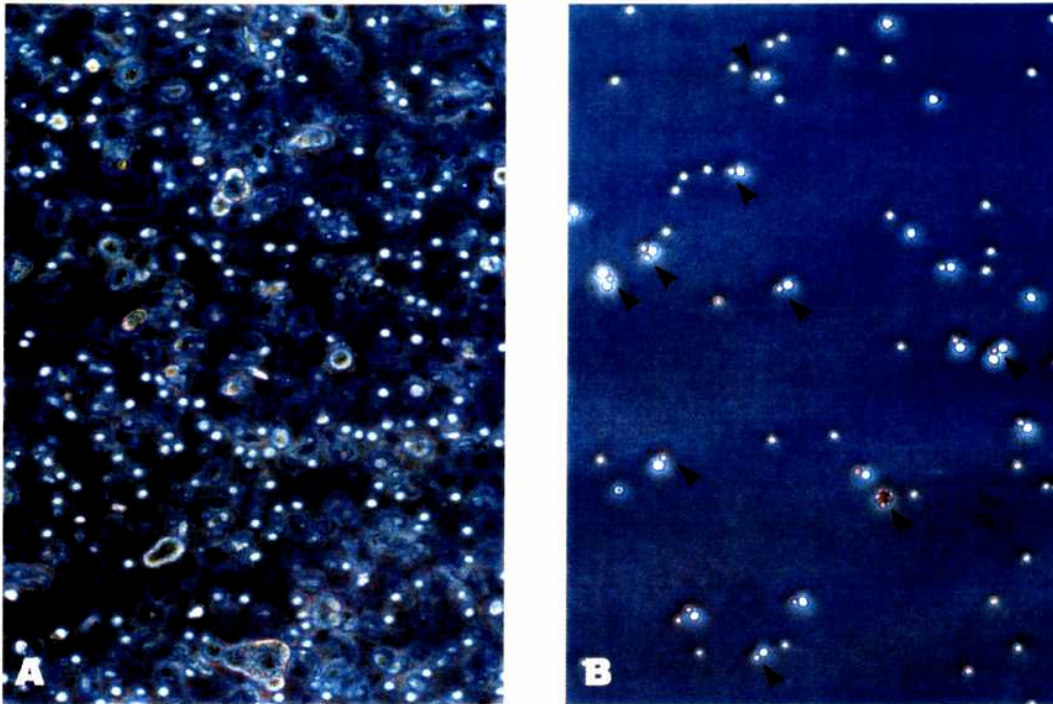


FIGURA 7: Imágenes donde se aprecian las suspensiones celulares en condiciones pre (A) y post aislamiento (B). En esta última se observan células obtenidas por selección positiva unidas a una o más esferas magnéticas (flechas) (200X).

- **A partir de tejidos normales**

Como se mencionó más arriba, cada aislamiento de CE a partir de tejido tumoral, se realizó en forma simultánea con un aislamiento a partir de tejidos normales como control de la recuperación y posteriores condiciones de cultivo.

La vasculatura del tejido renal de ratones BALB/c jóvenes resultaba claramente reconocible por el AcM MEC 13.3 por lo que normalmente se utilizó este tejido.

El comportamiento de estas CE en cultivo en sus etapas iniciales resultó semejante a las derivadas de tejido tumoral. Los islotes de CE proliferaron lentamente, y se utilizaron heparina, ECGS y sobrenadante condicionado de S180 como suplementos. Una vez que adquirieron capacidad proliferativa, fue posible realizar subcultivos y proceder a almacenar células congeladas. Este proceso no afectó la viabilidad, como tampoco impidió retomar los cultivos a partir de las células congeladas.

En el caso de la **Figura 8**, se muestran CE derivadas de riñón correspondientes al quinto pasaje. Las mismas son CD31+ según inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal MEC 13.3 empleado para la selección positiva.

(I. 4) CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DERIVADAS DE TEJIDO NORMAL

Cuando estas CE adquirieron suficiente capacidad replicativa se procedió a clonaras ya que presentaban cierto grado de heterogeneidad en su morfología que hacía pensar que algunas pudieran ser células contaminantes, principalmente pericitos o fibroblastos. El clonado se realizó por dilución límite y se establecieron sublíneas o clones REC (renal

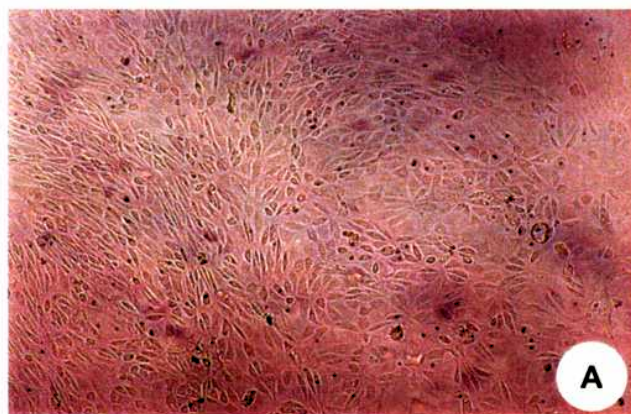


FIGURA 8:

Morfología de los putativos clones REC. (A) Células endoteliales purificadas de riñón murino provenientes de los primeros subcultivos. (B) Células endoteliales post clonación: A4, A3, A2 y B3 presentaron originalmente una morfología *cobblestone* mientras que (C) C2 conservó una distribución fusiforme.

endothelial cells) que podían presentar la morfología típica de empedrado (o *cobblestone*) o una distribución más fusiforme y compacta al estado de confluencia (Fig. 8).

En los clones obtenidos se determinó el nivel de expresión de CD31/PECAM, que es una de las principales moléculas marcadoras de expresión constitutiva en la superficie de las CE (Fig 9). Las células del clon A4 resultaron más positivas que cualquier otro clon testado y con niveles incluso superiores a los expresados por la línea microvascular 1G11. Las células del clon A3 presentaron una muy leve expresión y el resto de los clones fueron negativos.

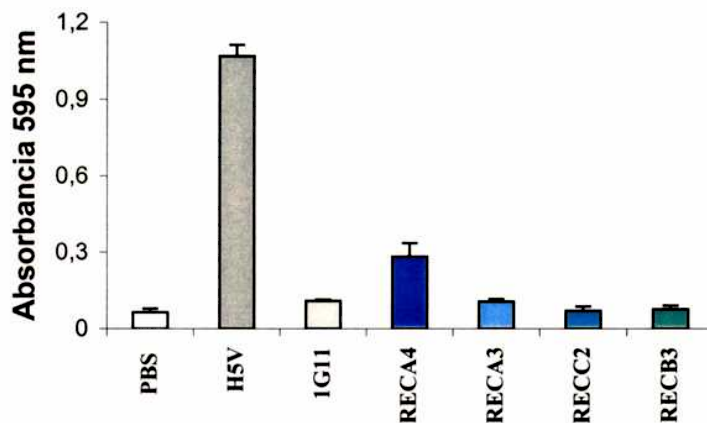


FIGURA 9: Expresión de CD31 / PECAM

Análisis comparativo de la expresión de CD31 en algunos de los clones putativos de CE derivadas de tejido renal. La determinación se realizó por ELISA sobre monocapas de CE confluentes y vivas. La fijación se realizó luego de la incubación con el AcM MEC 13.3. Cada valor corresponde al promedio de sextuplicados.

Como controles de la presencia de esta molécula de adhesión se utilizaron otras líneas endoteliales disponibles en nuestro laboratorio. La línea H5V se utilizó como control de altos niveles de expresión de CD31. Sin embargo, el fenotipo que estas células presentan dista del normal ya que han sido manipuladas y se comportan dando hemangiomas en ratones inmunosuprimidos. En cambio la línea 1G11 es de origen microvascular, proveniente de pulmón y no presenta un comportamiento transformado. Por lo tanto, ésta última constituye un mejor referente de los niveles esperables de expresión de CD31 en los clones obtenidos.

Luego, se determinó la presencia de otras moléculas de adhesión características de endotelio. Se observó un variado rango de positividad tanto para la expresión de VCAM-1 como de ICAM-1 (**Figura 10 A y B**). Las células A4 y 1G11 en reposo (sin estimulación con LPS) presentaron niveles comparables y altos de VCAM. Sólo A4 y C2 aumentaron significativamente la expresión post activación. Estos dos clones resultaron fuertemente positivos para la presencia de ICAM, pero sólo C2 respondió aumentando la expresión frente al estímulo de LPS.

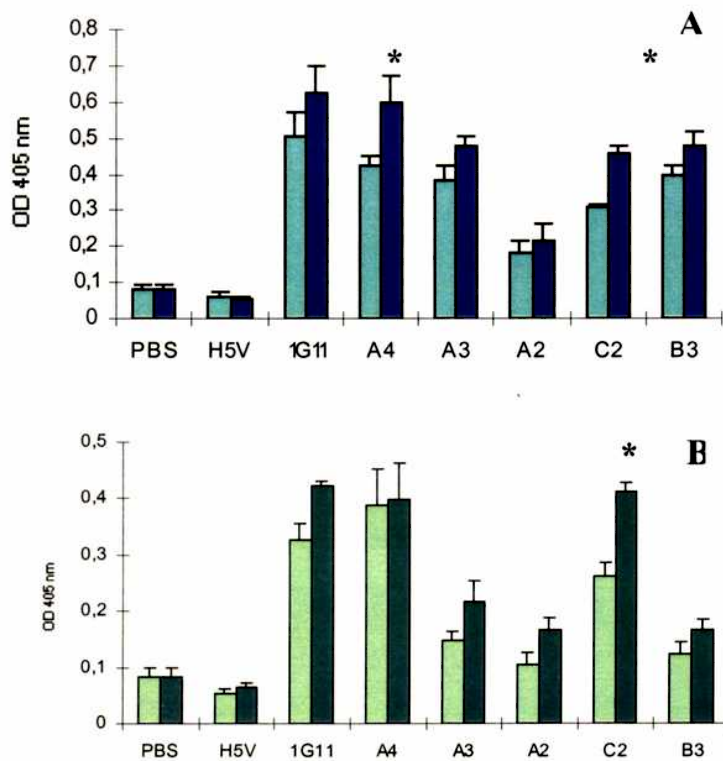


FIGURA 10:

Análisis comparativo de la expresión de (A) VCAM-1 y (B) ICAM-1 en presencia (barras claras) y ausencia de LPS (barras oscuras). La determinación se realizó por ELISA sobre monocapas de CE confluentes y vivas. Cada valor corresponde al promedio de sextuplicados. * $p < 0.05$ (CE en reposo vs. estimuladas con LPS)

La expresión del factor de von Willebrand -otra característica muy típica de las CE- se evidenció como un delicado puntillado intracitoplasmático en A4 (**Figura 11 A**). El clon A3 presentó una débil fluorescencia mientras que C2 y B3 fueron completamente negativos.

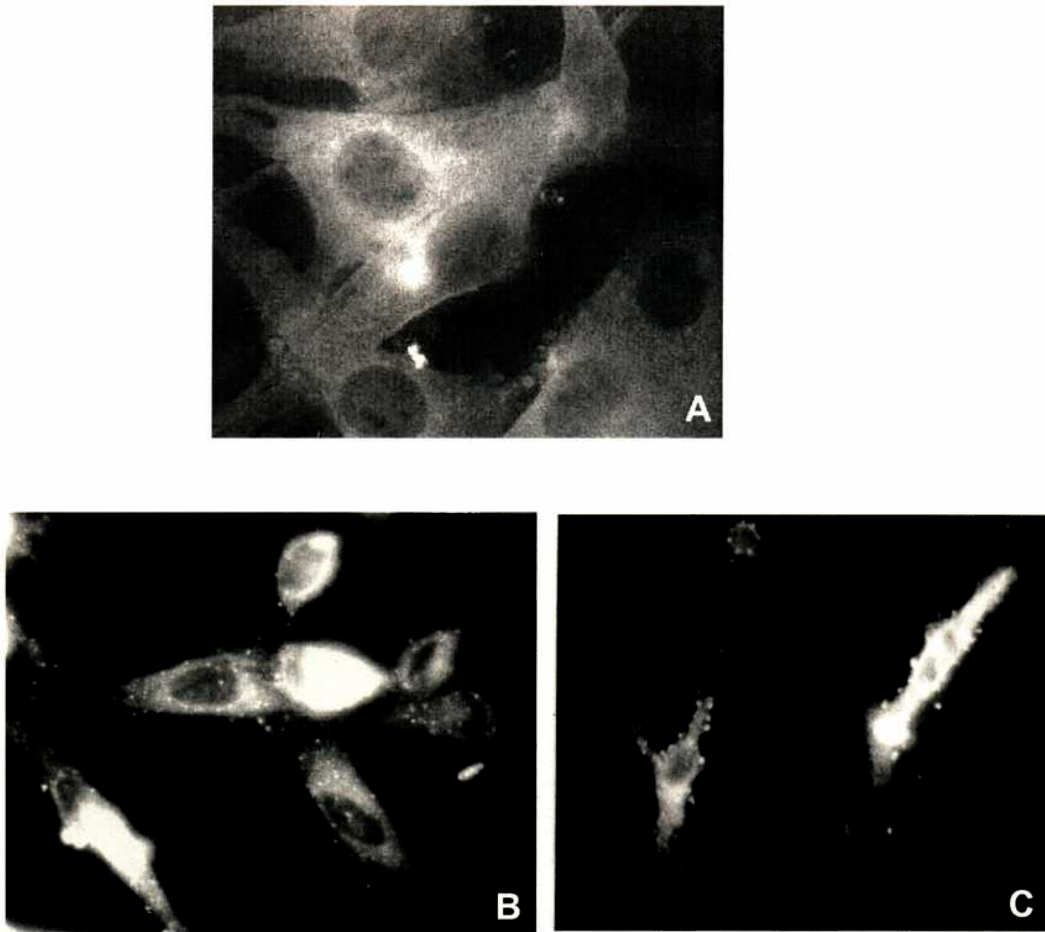


FIGURA 11:

(A) Detección del factor de von Willebrand en el citoplasma de células REC-A4 y (B) Incorporación de partículas de LDL acetilado en células REC-A4 y (C) macrófagos peritoneales luego de 4 hs en cultivo en presencia de LDL acetilado. Aumento original 1000X

Por lo tanto, teniendo en consideración los datos hasta aquí presentados, las células del clon A4 presentaron el fenotipo endotelial más conservado dado que resultaron positivas para los principales y más clásicos criterios de identificación de endotelio.

Sin embargo, se continuó con una caracterización más profunda. Específicamente, se ensayó la capacidad de captación de partículas de LDL- acetilado acopladas a un fluorocromo (**Fig. 11 C y D; Tabla II**). Esta sublínea clonal mostró una intensa avidez para capturar el LDL, casi comparable a la de los macrófagos utilizados como control positivo.

REC-A4 presentaron muy baja positividad para VE-caderina y la expresión inducible de ELAM es menor que el control de las células 1G11 (**Tabla II**). En cuanto al análisis de los filamentos del citoesqueleto, la negatividad para α -actina de músculo liso y citoqueratina (**Tabla II**) contribuyó a confirmar su origen endotelial. También se analizó la expresión de otras moléculas de adhesión ELAM y VE-caderina, tanto en estado de reposo como bajo inducción con LPS.

MARCADORES	REC-A4	1G11	Adenocarcinoma
Expresión del factor de von Willebrand	+	ND	ND
Captación de LDL acetilado	+	+	ND
Presencia de α -actina de músculo liso	-	-	-
Presencia de vimentina	+	+	+
Presencia de citoqueratina	-	-	+
Expresión de VE-caderina	+/-	++	ND
Expresión de ELAM	+	+++	ND
Inducción de ELAM por acción de LPS	++	++++	ND

TABLA II: Análisis semicuantitativo de otros marcadores característicos estudiados en el clon REC-A4. La intensidad de fluorescencia se registró como: (-) negativo, (+/-) muy débil, (+) moderada, (++) intensa, (+++) muy intensa, (nd) no determinado.

Si bien se detectó la expresión de vWF, por análisis con microscopía electrónica no fue posible detectar la existencia de cuerpos de Weibel-Pallade (compartimento subcelular donde vWF se almacena). Continuando con el análisis ultraestructural, presentan una característica morfología endotelial con pocas mitocondrias perinucleares, REG y REL hiperactivos y gran tráfico vesicular pinocítico. Se observaron regiones discretas de contacto célula-célula en lugar de extensos superficies de contacto como los que se observan entre CE de capilares continuos. Estas uniones presentaron gran proximidad entre las membranas (distancia menor a 30 nm) (**Figura 12**).

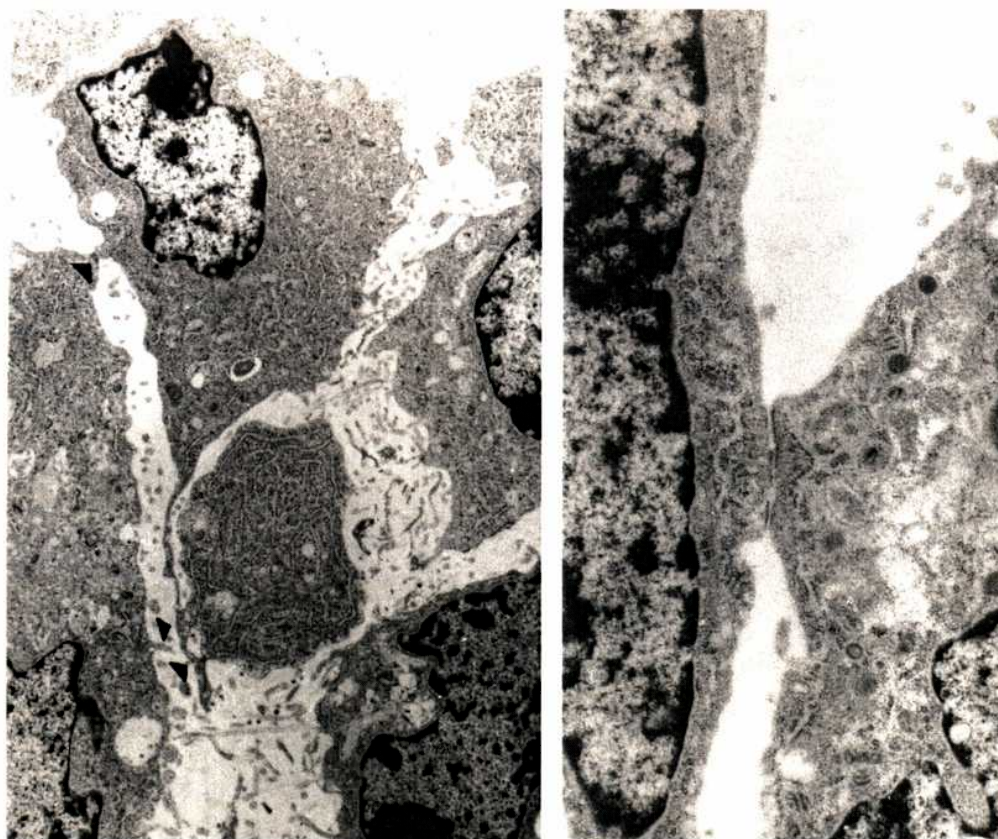


FIGURA 12: Microscopía electrónica de (A) dos células REC-A4 en cultivo donde se observan los contactos que se establecen entre ellas (10.000X). (B) Detalle de una de las uniones entre células donde se advierte el estrecho contacto entre sus membranas (40.000X).

Dada la heterogeneidad que caracteriza a las CE y como un modo de evaluar más específicamente un rasgo del endotelio renal, se realizaron ensayos de sensibilidad a la Shigatoxina. Las CE, según su origen, son particularmente dañadas por la toxina que producen *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Shiga toxina, Stx) y algunos tipos de *E. coli* (Shiga-like toxins) [Arbus, 1997]. Existen referencias [Louise y col., 1997] en cuanto a que el daño sufrido durante el progreso del Síndrome Urémico-Hemolítico se debería a la sensibilidad de las CE glomerulares a la Stx-1 y que este cuadro podría empeorar en presencia de endotoxinas circulantes. A raíz de ello, se determinó el grado de sensibilidad de REC-A4 a Stx-1 en ausencia y presencia de LPS en comparación con otra línea endotelial de pulmón (1G11). El estado de la toxina se constató con el control de células Vero, que presentan la máxima sensibilidad para Stx.

Se determinó que REC-A4 fue insensible a la toxina, aún luego de la preincubación con LPS (1,5 µg/ml durante 10 hs). Sin embargo, la co-incubación de las monocapas de REC-A4 durante 12 hs con LPS y Stx-1 en forma conjunta produjeron un efecto citotóxico mayor para las concentraciones más altas de toxina ensayadas. Las células 1G11, en cambio, presentaron un comportamiento diferente, mostrándose más sensibles a la toxina que a la presencia conjunta de LPS y Stx-1 (**Figura 13**).

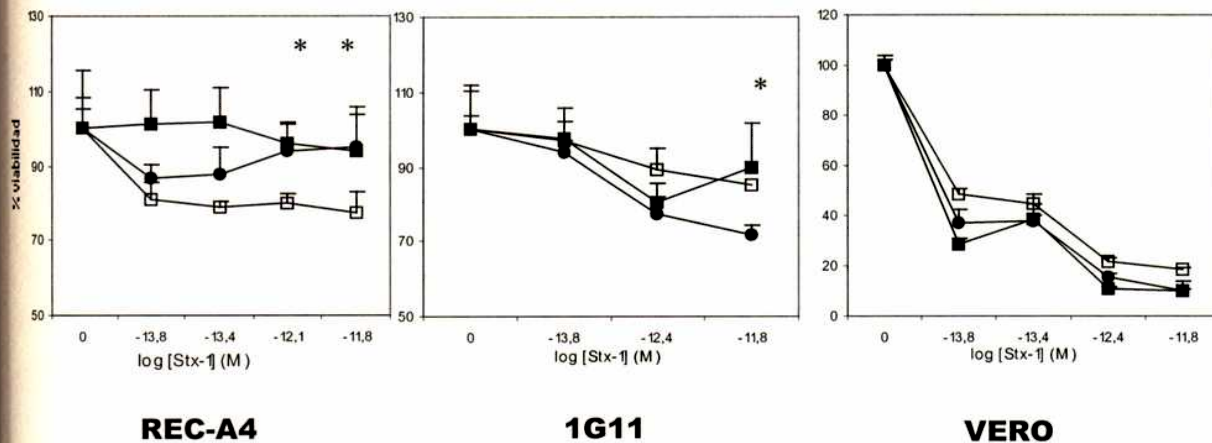


FIGURA 13: Citotoxicidad frente a Shigatoxina-1 sobre REC-A4, 1G11 y células Vero (control). Los resultados se representan como porcentaje de células viables luego de la incubación durante 2 días con Stx-1 (círculos oscuros), incubadas con Stx-1 luego de una preincubación con LPS (1,5µg/ml por 4 hs) (cuadrados oscuros) e incubadas en presencia conjunta de Stx-1 y LPS (cuadrados claros). Cada determinación representa la media de cuadruplicados. Los experimentos se repitieron tres veces. [* p< 0.04, Stx vs Stx co-incubado con LPS].

DISCUSIÓN

Virtualmente todos los tumores se encuentran vascularizados cuando son detectados. Sin embargo existe una etapa prevascular cuando el tumor se inicia constando de un limitado número de células que pueden proliferar escasamente, quedando el tumor restringido a unos pocos mm³. Cuando un número suficiente de ellas se tornan “angiogénicas”, comenzarán a secretar factores que inducen el desarrollo de la trama vascular y el crecimiento se torna dependiente de la angiogénesis que lo acompañe [Hanahan y Folkman, 1996].

La angiogénesis en tumores mamarios ha sido intensamente estudiada en los últimos años. Uno de los primeros trabajos en evaluar la densidad de vasos por inmunohistoquímica y relacionarlo con el destino del tumor fue Weidner y colaboradores [Weidner, 1991; Weidner, 1992], usando un anticuerpo anti-vWf (factor VIII) en biopsias de tumores humanos. Desde este trabajo original fueron necesarios muchos otros para validar y confirmar que una alta angiogénesis está relacionada a un mal pronóstico. Más aún, se probaron una variedad de anticuerpos reactivos dirigidos contra otras moléculas para el reconocimiento de las células endoteliales (CD31, CD34, lectina *Ulex europaeus* tipo I) con los cuales se constató que tal relación podía ser evaluada usando distintos marcadores para CE.

En este trabajo de Tesis realizamos, en tumores mamarios murinos, una cuantificación de los microvasos en las áreas de más activa neovascularización (*hot-spots*) evidenciando su presencia con el anticuerpo anti CD31 (MEC13.3). Así, encontramos que la tasa de crecimiento y la capacidad de producir metástasis están relacionadas a un mayor desarrollo angiogénico. La base del análisis en relación con las metástasis radica en que las áreas de más activa angiogénesis son probablemente las regiones más sensibles para la salida de las células tumorales a la circulación sistémica.

En el momento en que nuestro trabajo fue realizado [Vanzulli, 1997] representó una evidencia desde el modelo murino del valor pronóstico del estudio de la vascularización. Además, se demostró la utilidad del anticuerpo monoclonal MEC 13.3 para la evaluación histológica de la angiogénesis, referencia que es citada actualmente

en la hoja de datos del producto en el catálogo de Pharmingen, empresa que al presente, posee la comercialización de este AcM.

En este modelo mamario murino se pudo reproducir la situación observada para tumores humanos. Así, la respuesta ante la aplicación de cualquier terapia experimental que se desee ensayar sobre estos tumores mamarios podría ser monitoreada, entre otros aspectos, desde su impacto sobre la angiogénesis como una forma de evaluar el efecto sobre la progresión hacia la enfermedad metastásica y la efectividad de la terapia aplicada en controlar el crecimiento de metástasis distantes.

Ciertas innovaciones en el modo de cuantificación, por ejemplo la definición del parámetro “grado vascular” (cuantificación de los microvasos < 20 micrones de diámetro) no guarda correlación con el desarrollo de metástasis, mientras que en las mismas biopsias de carcinoma mamario, la densidad de vasos intratumorales correlacionó perfectamente con el potencial metastásico como ya es conocido [Djonov y col., 2002].

En este mismo contexto, y analizando una muestra de tumores lobulillares y ductales, encontramos que el tipo histológico no parece estar relacionado con la vascularización. En una publicación posterior a la realización de nuestro trabajo [Lee, 1998] tampoco se encuentran claras diferencias entre estos histotipos en términos de angiogénesis, determinada utilizando un anticuerpo contra factor de von Willebrand. En este sentido los datos existentes, derivados del análisis de biopsias de tumores humanos, no son muy concluyentes ya que, a diferencia de lo observado para la predicción del comportamiento metastásico, existen evidencias controversiales y aparentemente dependientes del anticuerpo utilizado para evidenciar la vascularización. Por ejemplo, Nakopoulou y colaboradores [1999] han informado que la inmunoreactividad para el factor VIII permite evidenciar que los carcinomas infiltrantes lobulares estarían frecuentemente relacionados a una mayor densidad de microvasos factor VIII+ que los ductales invasivos. Sin embargo, tal relación se pierde cuando sobre las mismas muestras realizan la inmunomarcación para CD31.

Más recientemente, Coradini [2002] sostiene la hipótesis que los carcinomas ductales y lobulares son dos entidades fenotípicas no relacionadas. Como tales, presentan características diferenciales en cuanto a los niveles de receptores a estrógenos,

proliferación y presencia de p53. Asimismo, se diferenciarían en la vascularización ya que estos autores encuentran que los tumores lobulares están asociados a un bajo contenido de VEGF en comparación con la angiogénesis de los tumores ductales.

La **neovascularización** es un proceso por el cual los nuevos vasos se originan a partir de otros preexistentes. Este proceso sería el responsable de la formación de cualquier estructura vascular en la vida postnatal en respuesta a procesos tanto fisiológicos como patológicos, como por ejemplo durante la formación de un tumor. Varios estudios sugieren, en cambio, la existencia de precursores circulantes de células endoteliales que surgen de sitios ajenos al lugar donde acontece la neovascularización [Kennedy, 1971; Asahara, 1997; Shi, 1998]. Por lo tanto sugieren que la **vasculogénesis** puede contribuir a la formación de la vasculatura en el adulto. Muy recientemente, se han publicado las primeras evidencias de vasculogénesis en tumores [Lyden, 2001; Bolontrade, 2002]. De ser cierto para otros tumores, las células inmunoreactivas para CD31 encontradas en nuestro trabajo durante la etapa temprana del desarrollo de los tumores podrían tratarse de células precursoras, del estilo de los descriptos durante la génesis vascular en embriones [Risau, 1988]. Por otro lado, existen evidencias que se pueden obtener células de fenotipo endotelial a partir de monocitos CD14 positivos en presencia de factores de crecimiento angiogénicos [Fernández Pujol, 2000]. Dado que en las etapas iniciales del crecimiento tumoral, las propias células tumorales son responsables de la producción de factores angiogénicos, no podemos descartar que las células evidenciadas como CD31+ en nuestras muestras tengan alguna relación con alguno de estos dos orígenes.

Aislamiento de CE a partir de tumores (TEC)

Se implementó una metodología con esferas inmunomagnéticas guiadas por la especificidad de reconocimiento del anticuerpo monoclonal MEC 13.3. Se lograron obtener CE de tejidos normales y tumores. Dos fueron los principales inconvenientes en el mantenimiento de las TEC. Por un lado, se utilizaron tumores generados por la inyección subcutánea de líneas celulares tumorales en cultivo. Cuando se utilizaron los tumores generados con estas líneas como fuente de tejido para el aislamiento de TEC, las escasas células tumorales remanentes luego del aislamiento, no encontraron

impedimento en retomar su crecimiento *in vitro*, invadiendo los cultivos en detrimento de la proliferación y mantenimiento de los islotes de TEC.

En cambio, cuando se eligieron los tumores mamarios murinos cuyas células nunca habían sido inmortalizadas en cultivo, las TEC derivadas a partir de ellos, proliferaron en forma de pequeños clusters con morfología típicamente *cobblestone*. Sin embargo, luego de uno o dos subcultivos, su capacidad replicativa disminuía considerablemente para luego tornarse senescentes y morir. Este comportamiento fue independiente del tejido tumoral de partida, ya que se observó para los aislamientos a partir de tumores mamarios metastásico y no metastásico, carcinoma de pulmón y melanoma.

Este clásico comportamiento observado luego de muchos intentos nos permitió reconocer la necesidad de medios más completos y ricos para aspirar a su mantenimiento en cultivo. Con este fin, se suplementaron los cultivos con ECGS y medios condicionados de distintas líneas tumorales, ya que algunos autores han reportado que los vasos de la microvasculatura tumoral -a diferencia de los vasos de tejidos normales- son muy dependientes de VEGF y que su adición al cultivo mejora las condiciones de crecimiento [Alessandri G y col., 1998]. Particularmente, los medios condicionados de la línea tumoral S180 (sarcoma) serían fuente de VEGF [Rosenthal, 1990] y otros factores de crecimiento. Sin embargo, en nuestra experiencia, no fue suficiente para suplementar los cultivos primarios de TEC.

Durante el transcurso de una pasantía realizada al Laboratorio de Inmunofarmacología del Instituto Mario Negri, Milán, Italia, trabajé con un cultivo “long-term” recientemente establecido de CE derivadas de un rhabdomyosarcoma. Estas TEC fueron positivas para CD31, VCAM-1, JAM, VE-caderina y un antígeno de alto peso molecular relacionado casi exclusivamente a las TEC y reconocido por el AcM MEC 102. Estas células no lograron mantenerse más allá del pasaje 20, ya que comienzan a sufrir grandes cambios morfológicos. Esto es otra evidencia de la gran dependencia que se establece con el microambiente tumoral [Sweeney, 2003]. No obstante, se realizó una caracterización funcional en pos de evaluar diferencias en la adhesión y trans migración respecto de líneas de CE derivadas de tejido normal. Para ello, los macrófagos marcados con ^{51}Cr se dejaron en contacto con monocapas de TEC o de CE normales por tiempos variables. Si bien no se observaron diferencias

significativas en cuanto a la adhesión a las TEC, la transmigración fue mucho mayor, indicando una mayor permeabilidad de las monocapas de TEC.

Aislamiento de CE a partir de tejidos normales

El lograr establecer una línea de CE derivada de tejido renal indica que los problemas planteados anteriormente no fueron de índole metodológica. La población de células proveniente de los cultivos primarios contenía células de fenotipo mixto por lo que fueron clonadas por dilución límite. Por la caracterización efectuada, se seleccionó el clon denominado REC-A4 que cumple con el fenotipo endotelial: CD31+, expresión basal e inducible de VCAM-1+, expresión basal alta de ICAM-1+ y expresión baja pero inducible de ELAM en cuanto al patrón de moléculas de adhesión. Además presentó el fenotipo ultraestructural de CE y presenta cierta sensibilidad a Stx-1, toxicidad que se logra aumentar con la co-incubación de la toxina y LPS.

El clásico criterio de identificación de CE humanas incluye apariencia de empedrado o *cobblestone* en cultivo, síntesis de factor de von Willebrand y presencia de cuerpos de Weibel-Palade citoplasmáticos donde el factor de vW se almacena. Sin embargo, existen datos respecto a que esta estructura subcelular no es un criterio ultraestructural confiable de determinación de CE murinas [Murray, 1987].

Las CE obtenidas en este trabajo son vWF positivas pero Weibel Pallade negativas, un perfil que indicaría además que provienen del lecho microvascular [Craig, 1998]. La presencia de vimentina es una característica importante de células de origen mesenquimal, tales como fibroblastos, células linfoides, células de tejido muscular liso y CE, pero también fue encontrado en células epiteliales provenientes de riñón humano [Holthofer, 1984]. De modo que para confirmar con mayor certeza el origen endotelial de la línea REC-A4, se determinó, no sólo la presencia de vimentina, sino también que las células son negativas para citoqueratina y para α -actina de músculo liso, excluyendo la posibilidad de ser células epiteliales renales o pericitos. Además son capaces de captar partículas de LDL acetilado con avidez, presentan expresión constitutiva de PECAM/CD31, VCAM-1 e ICAM-1. La inducibilidad de VCAM-1 en respuesta a estimulación corta con LPS (4h) es una característica bien establecida para el fenotipo endotelial [Pober, 1986; Manconi, 2000].

Con excepción de la expresión de ICAM-1, estas células presentan el perfil de moléculas de adhesión descrito para las CE glomerulares humanas, lo que sugiere que éste podría ser particularmente su origen [Murakamis, 2001].

Otro de los clones obtenidos, REC-A3, presentó la mayoría de las características marcadoras de CE, sin embargo los estudios se basaron en A4 debido a la baja capacidad replicativa en los cultivos del clon A3.

Para el caso de los clones A2 y B3, la ausencia de expresión de CD31 desde un inicio, a pesar de presentar morfología *cobblestone*, fue un criterio inicial para descartarlos como posibles candidatos endoteliales, y a raíz de ello, no se continuó con su caracterización.

Ultraestructuralmente, la ausencia de fenestras, una estructura esperable para CE derivadas de tejido renal, puede deberse a las condiciones de cultivo *in vitro*, ya que se ha descrito previamente la ausencia de esta estructura en células en cultivo [Folkman].

Sin embargo, existen autores que indican que podría evocarse su formación proveyéndoles los compuestos apropiados de matriz extracelular [Milici, 1985].

Justamente esta, más que una característica funcional, es una característica arquitectónica de la célula altamente dependiente de su interacción con el microambiente y quizás con otras células del tejido. También lo son muchos procesos fisiológicos y patológicos que suceden a nivel del lecho vascular [Mantovani, 1997; Boegehold, 1998; Thorin and Shreeve 1998; Lidington, 1999; Shappell, 2000; Naruse; 2000].

La falla renal aguda en el Síndrome urémico hemolítico (donde la Shigatoxina es el principal agente detonante del proceso) puede analizarse desde los cambios funcionales que suceden a nivel de las CE renales y en su relación con otros componentes que participan de este proceso. Como un primer intento de caracterizar la sensibilidad de esta línea de CE que hemos establecido frente a la Stx-1, se evaluó el efecto citotóxico de Stx-1 en comparación con otra línea de endotelio. Así, se encontró que REC-A4 es casi insensible al efecto de Stx-1 pero la línea se torna sensible cuando en el medio de incubación se encuentran conjuntamente Stx-1+LPS o Stx-1+TNF- α . Este comportamiento fue observado para CE humanas [Obrig, 1988; van Setten et al. 1997; Ramegowda et al. 1999] y dada la ausencia de líneas de endotelio renal murino, es un punto a favor de su utilidad como modelo *in vitro* para evaluar los efectos de esta

toxina. En contraposición, la línea de endotelio microvascular pulmonar no respondió a la presencia de Stx-1 y LPS. Esta diferencia pone de manifiesto otro rasgo de las CE que es su heterogeneidad funcional y particularmente, en lo que respecta al Síndrome urémico hemolítico, contribuye a comprender por qué el daño endotelial cursa predominantemente pero no exclusivamente a nivel del endotelio renal. Esta diferencia en la sensibilidad estaría relacionada a la cantidad de Gb3, receptor al que se une la toxina [Obrig,1993; Ohmi, 1998]. Por lo tanto, como hemos observado sobre REC-A4 y otros autores en líneas de CE humanas [Williams, 1999; Hughes, 2002], la presencia de endotoxinas circulantes y citoquinas proinflamatorias, activarían las células llevándolas a un estado de mayor susceptibilidad al daño celular, atribuible a un aumento de Gb3 [Ramegowda, 1999] que no hemos demostrado aún en nuestro modelo. Pero consistentes con el hecho de que el entorno y la interacción con otras células son cruciales, se deberían evaluar sobre REC-A4 la contribución al daño endotelial de otros factores, ya que se ha visto que la Stx-1 aumenta la expresión de moléculas de adhesión en superficie [Morigi et al. 1995], favoreciendo la adhesión de PMN activados y otros leucocitos, amplificando el daño y la inflamación [te Loo et al. 2000; Fernández et al. 2000, Zoja et al. 2002]. Esta línea de CE es la primera descrita hasta el presente derivada de endotelio renal murino y la importancia de su establecimiento radica en que contribuye a poder ensayar *in vitro* nuevas condiciones para elucidar como sucede el daño al endotelio a nivel microvascular, independizándose de la variabilidad funcional que a veces se presenta con los aislamientos de CE de cordón umbilical.

CAPÍTULO II



CAPITULO II

“Angiogénesis e infiltración espontánea en melanoma”

Las quemoquinas están involucradas en una variedad de procesos, desde la inflamación hasta las neoplasias. Existen numerosas evidencias experimentales que indican que los mecanismos que utilizan las células tumorales para invadir y posteriormente extravasar de los vasos -determinando así la posibilidad de metástasis- son similares a los normalmente utilizados por los glóbulos blancos [Springer, 1994]. Si bien el melanoma primario humano está frecuentemente asociado a una reacción linfoide e infiltración de monocitos/macrófagos [Broker y col., 1988], esta capacidad se pierde en las metástasis. La presencia de macrófagos infiltrantes activados por la CC quemoquina MCP-1 puede contribuir a la supresión del crecimiento tumoral en modelos animales [Rollins, 1991, Botazzi, 1992]. R ratones *nude* portadores de xenotransplantes tumorales tratados con anticuerpos monoclonales anti-MCP-1 o anti-macrófagos promueve el desarrollo de los tumores [Zhang, 1997]. Como contrapartida, la producción de MCPs por algunos tipos tumorales puede tener como resultado acrecentar la invasión y la metástasis [Neumark, 1999].

En cuanto a su relación con la angiogénesis, existen datos que la producción de MCP-1 por parte de células tumorales podría tener un efecto potenciador en el crecimiento tumoral y las metástasis, vía un aumento de la angiogénesis que a su vez permite un aumento del influjo de TAM angiogénicos [Folkman, 1995, Nesbit, 2001]. En este último trabajo, se propone que el efecto biológico de MCP-1 sobre tumores estaría relacionado a la cantidad de quemoquina producida en el microambiente tumoral, siendo las altas concentraciones las que inducen remisión tumoral pero concentraciones medias a bajas inducirían menor infiltración promoviendo el crecimiento tumoral [Nesbit, 2001].

En este marco, los objetivos propuestos fueron:

- 1) Analizar en biopsias quirúrgicas de melanomas metastásicos humanos el nivel de expresión de MCP-1 y si existe correlación con la angiogénesis.
- 2) Analizar el nivel de infiltración “espontánea” de células inflamatorias en el tumor
- 3) Desarrollar un modelo tumoral que permita avanzar en estudios sobre el rol de MCP-1 en aquellos aspectos donde el estudio con biopsias se torna limitado.

(II.1) MCP-1 EN MELANOMA HUMANO. RELACIÓN CON LA ANGIOGÉNESIS

El propósito, en este caso, consistió en analizar la expresión de MCP-1 en melanoma humano y si existe relación con los índices de vascularización. Para ello se tomaron 41 biopsias de melanoma metastásico humano. La valoración de la producción de MCP-1 se efectuó por inmunohistoquímica con un AcM específico y se restringió el análisis de la positividad sólo al citoplasma de la célula tumoral sin considerar el área nuclear al momento de cuantificar la intensidad de expresión con el analizador de imágenes (ver Materiales y Métodos).

Como se ilustra en las **Figuras 14 A y B**, se detectaron distintos niveles de expresión, vislumbrados como distintas intensidades del cromógeno. Estas diferencias no se deben a un sesgo experimental, ya que todas las muestras fueron coloreadas en simultáneo y con el mismo tiempo de revelado. Asimismo, cabe señalar que no existe una contribución de la melanina a la intensidad de la marcación, dado que las muestras corresponden a melanomas amelanóticos.

En todas las muestras analizadas el tejido tumoral resultó positivo en la inmunomarcación para MCP-1. En forma minoritaria, en el tejido normal circundante se observaron algunos otros tipos celulares que expresaban esta quemoquina, dentro de los cuales se encontraron algunas células endoteliales y macrófagos, conocidos también como productores de MCP-1.

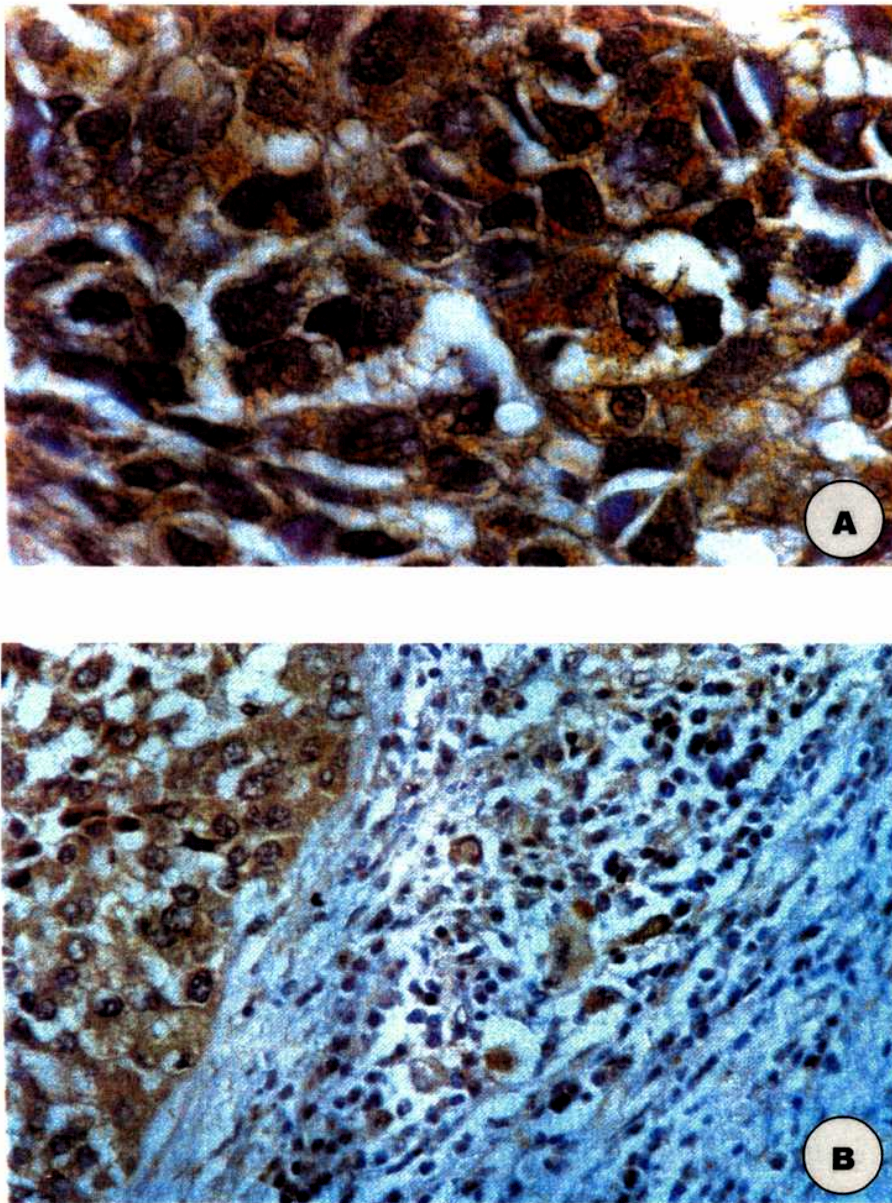


FIGURA 14: (A) Intensa tinción intracitoplasmática para MCP-1 en una biopsia de melanoma humano (400X). (B) Nido tumoral de un melanoma de intensidad de expresión moderada mostrando 100% de sus células MCP-1 positivas. Se observan células tumorales positivas infiltrando el tejido inflamatorio circundante (200X).

A pesar de que el 100% de los melanomas expresaban MCP-1, no todas las células tumorales del tejido resultaron positivas. Según la proporción encontrada se estableció el siguiente ranking de positividad: 25% corresponde a tumores que presentaron entre 1-25% de células reactivas; 50% (entre 26-50%); 75% (entre 51-75%) y 100%

corresponde al grupo de tumores que mostraron entre 76-100% de células MCP-1 positivas. La intensidad se definió como leve, moderada o marcada. Como se observa en la **Figura 15**, el 85% (35/41) de las biopsias presentaron más de la mitad de sus células positivas. Sólo aquellos tumores con el 100% de sus células positivas presentan niveles moderado y marcado de intensidad, que corresponden a la mayor inmunoreactividad para MCP-1 encontrada en estas biopsias.

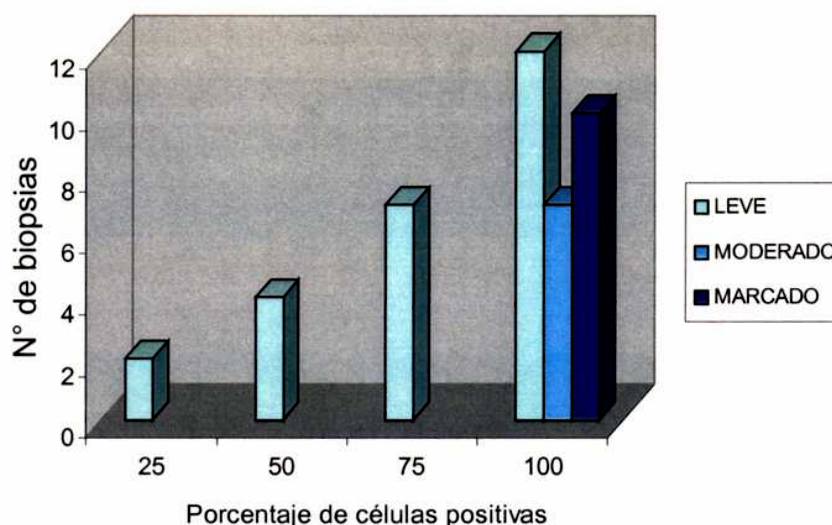


FIGURA 15 : Relación entre la intensidad de expresión de MCP-1 y porcentaje de células positivas en biopsias de melanomas metastásicos.

Con el fin de determinar cuales eran los niveles de vascularización se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CD34, molécula de adhesión presente en las células endoteliales (**Fig. 16**). En el análisis, se consideraron solamente las áreas intratumorales (se excluyen las áreas intraseptos y peritumorales), cuantificándose todas las estructuras CD34+ dentro del tejido tumoral independientemente de su tamaño. Los resultados obtenidos muestran que la vascularización fue alta en el 27% de las muestras, moderada en el 39% y baja en el 34%. Evaluándola en relación con el porcentaje de células reactivas para MCP-1 correspondiente a cada biopsia (**tabla III**) se advierte una tendencia de los tumores con una importante proporción de células positivas a estar moderada a altamente vascularizados, sin embargo no se llega a establecer una correlación fuerte (coeficiente de correlación de Spearmann, $R = 0,413$; $p < 0,006$).

ANGIOGENESIS	EXPRESIÓN DE MCP-1			
	Porcentaje de células positivas			
ALTO			♦♦	♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦
MODERADO		♦♦		♦♦♦♦♦♦ ♦♦♦♦♦♦
BAJO	♦♦	♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦♦♦
	25%	50%	75%	100%

TABLA III : Análisis semicuantitativo del porcentaje de células productoras de MCP-1 y número de estructuras CD34 positivas. Para la evaluación de la angiogénesis, se consideró "bajo" a menos de 20 vasos/campo; "moderado" entre 20-60 vasos/campo y "alto" a más de 60 vasos/campo de 200X.

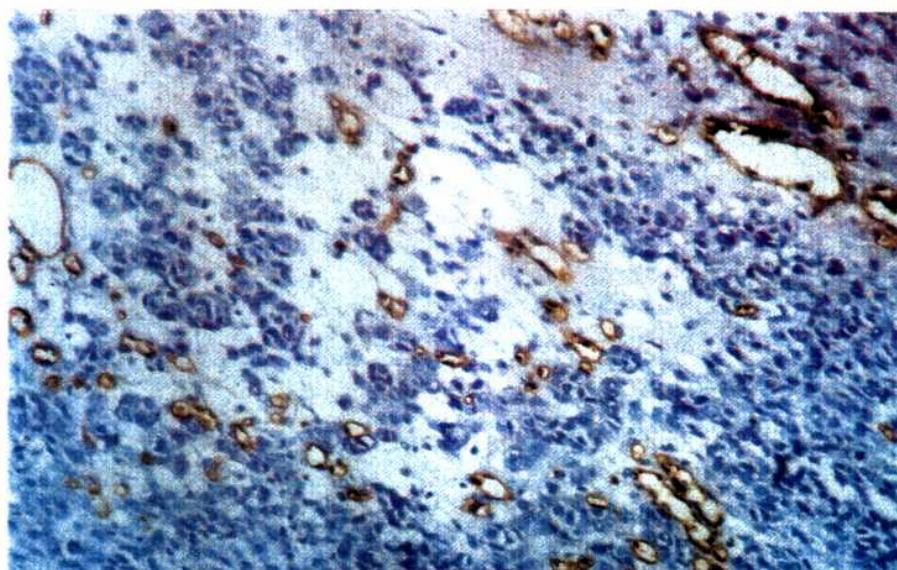


FIGURA 16: región de activa angiogénesis mostrando vasos de distinto calibre (100X)

Si el efecto de esta quemoquina sobre la vascularización fuese dependiente de la concentración, entonces correspondería analizar que pasa con la intensidad de MCP-1 en los tumores, más que el porcentaje de células que la producen. Por otro lado, si bien el modo más convencionalmente utilizado para analizar la vascularización es mediante

la cuantificación de vasos por área de tejido o por campo, existen reportes donde utilizan otras estrategias para valorar la importancia que tiene la aparición de una estructura vascular en la perfusión de O_2 y nutrientes para el desarrollo del tumor. Una de ellas es la determinación del área vascular. En el caso particular de las muestras analizadas en este estudio, se advierte una gran gama de calibres en los vasos que irrigan estos tumores (Fig. 16).

Para analizar la vascularización como áreas vasculares, se digitalizaron las imágenes de 10 campos de 400X/ preparado y con el auxilio de un software analizador de imágenes apropiado (ver Materiales y Métodos) se determinó el área de cada estructura intratumoral CD34+. Los valores se expresan como la suma de todas las área medidas / campo.

En la **Figura 17** se observa una correlación lineal positiva ($r = 0.895$; $p < 0.01$) entre ambas variables.

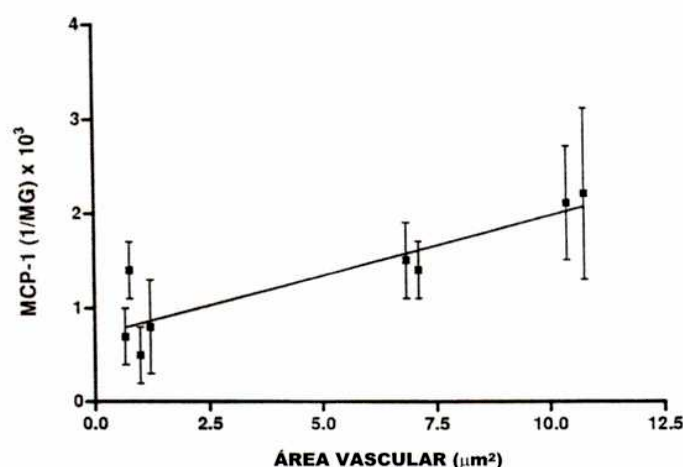


FIGURA 17: Expresión de MCP-1 fue evaluada a través de la intensidad del cromógeno en cinco campos de 400X (n=8). Se utilizó un analizador de imágenes para poder estimar la intensidad de MCP-1 y la vascularización, la cual se evaluó como áreas en 10 campos consecutivos de 100X.

(II. 2) PRESENCIA DE CÉLULAS INFILTRANTES

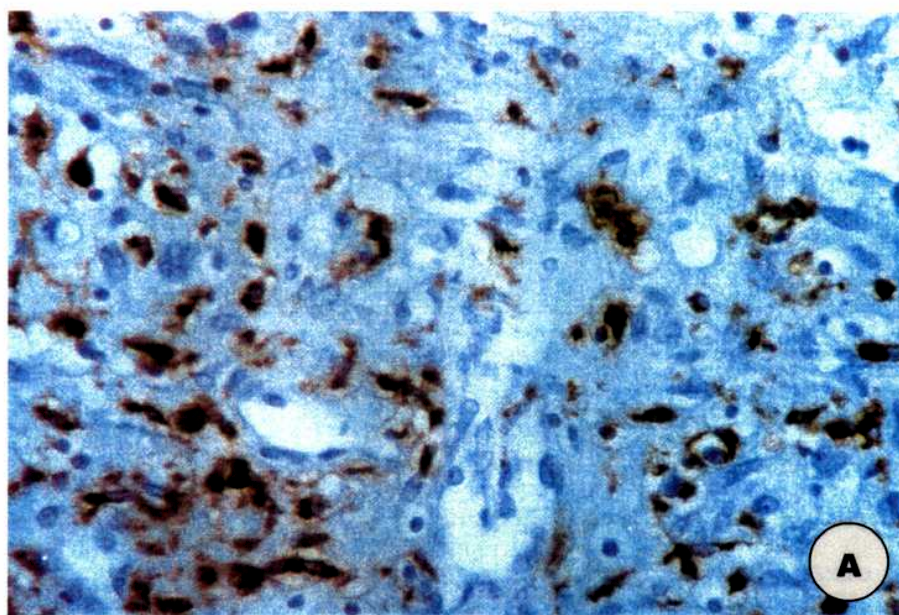
Se observó infiltrado linfoplasmocitario, claramente reconocible por la forma y picnosis de sus núcleos, en la región peritumoral conjuntamente con otras células del tipo macrofágico. En la región intratumoral, sólo se detectó la presencia de células

mononucleares del tipo macrófagos. Para confirmarlo, se utilizó el AcM anti-CD68 de manera de determinar la presencia de macrófagos intratumorales (TAM).

La distribución de TAM no fue homogénea: sólo una pequeña proporción de TAM se encontraba dispersa entre las células tumorales. Principalmente se determinó una marcada presencia próximos a áreas de nutrida red vascular, especialmente acompañando vasos de poco calibre (**Fig. 18**). En cambio, los vasos de mayor calibre no presentaron, en general, infiltrado circundante.

Esta evidencia puede tener dos significados: que la presencia de macrófagos en torno a estructuras microvasculares esté señalando la ruta por donde probablemente realizaran la extravasación al tejido frente al estímulo quimioattractante producido por el propio tumor; o bien que la vascularización que se observa sea la consecuencia de la presencia de TAM angiogénicos.

No se encontró relación entre la presencia de TAM y la intensidad de MCP-1 expresada por el tumor. Dado que MCP-1 es un estímulo quimiotáctico importante para estas células, podría esperarse que en las biopsias para las cuales se informó heterogeneidad en la intensidad de expresión de MCP-1, los macrófagos estuviesen asociados o cercanos a las células con mayor inmunoreactividad. Sin embargo este hecho no fue observado.



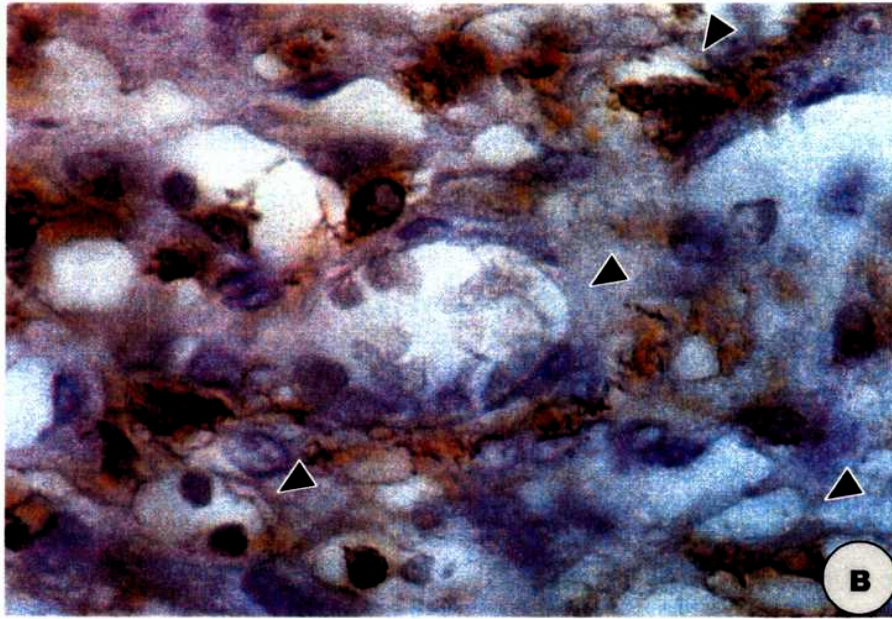


FIGURA 18:

A : Marcación anti CD68 para macrófagos revelando su distribución en un área angiogénica de un melanoma humano (200X). B : Detalle de la presencia perivascular de macrófagos. Las flechas señalan la presencia de los vasos más conspicuos y la presencia de macrófagos en torno a ellos (1000X).

(II. 3) TRANSFECCIÓN DE LA LINEA DE MELANOMA HUMANO IIB-MEL-J PARA LA EXPRESIÓN DE MCP-1

Muchos y dispares son los resultados reportados en cuanto a la influencia que puede tener la producción de la quemoquina MCP-1 por parte de las células tumorales y el infiltrado inflamatorio que evoca, en lo que respecta al futuro del tumor. Por lo tanto, un punto interesante de analizar sería la influencia de la expresión de esta quemoquina y del infiltrado inflamatorio en las etapas iniciales del establecimiento tumoral. Estos estudios requieren ser realizados en modelos experimentales para lo cual era necesario disponer de una línea tumoral productora de la quemoquina. En vista que las altas dosis inducirían remisión, resultó interesante estudiar las características del infiltrado inflamatorio en melanoma productores de MCP-1 en dosis mediana / bajas, que habiliten el crecimiento tumoral y permitieran seguir los cambios del infiltrado inflamatorio mientras el tumor se establece. Debido a que este estudio no puede realizarse utilizando biopsias, se procedió a la transfección de la línea IIB-MEL-J, negativa para la producción de MCP-1.

Para la transfección se utilizó el plásmido pLXSN de expresión en eucariotas, portador del cDNA para el MCP-1 humano. Para la misma se utilizó el método de lipofección y luego de ajustar las condiciones de cultivo de las células a transfectar y la concentración de plásmido a utilizar, se obtuvieron clones resistentes al antibiótico de selección (G418), los cuales se amplificaron en forma independiente. Se obtuvo un clon que denominamos **IIB-MEL-J-MCP-1**, productor de 940 pg/ml (dosado en el sobrenadante de cultivo condicionado durante 48 h. en ausencia de suero fetal). Esta concentración correspondería a una línea de moderada a baja producción de la quemoquina. Como control se transfectaron células de melanoma humano con el plásmido carente de inserto. Se seleccionó una sublínea o clon que denominamos IIB-MEL-J-pLXSN, el cual producía (al igual que la línea IIB-MEL-J parental), cantidades no dosables de MCP-1 $\leq$ a 12 pg/ml. Esto implica que la línea transfectada produce 78,3 veces más quemoquina que las líneas que se usarán como controles.

(II. 3. 1) Características *in vitro* de las células transfectadas

Fenotípicamente, la línea productora de MCP-1 tiene un tamaño celular más pequeño y forma monocapas algo más compactas que la línea de melanoma parental o la transfectada con el plásmido vacío (**Fig. 19**). No presenta diferencias significativas en su cinética de crecimiento en cultivo (**Fig. 20**), como tampoco se advirtieron diferencias en su crecimiento en ágar blando (datos no mostrados).

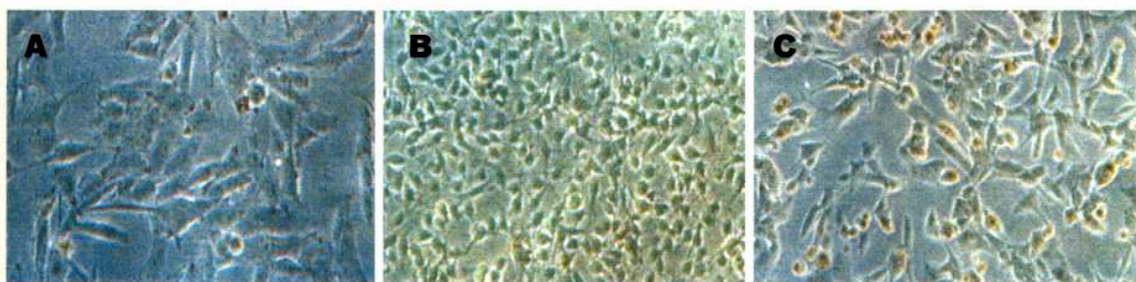


FIGURA 19: Fotos de las células de melanoma en cultivo: (A) IIB-MEL-J-MCP-1, (B) IIB-MEL-J-pLXSN, transfectada con el plásmido carente de inserto y (C) línea parental IIB-MEL-J (400X).

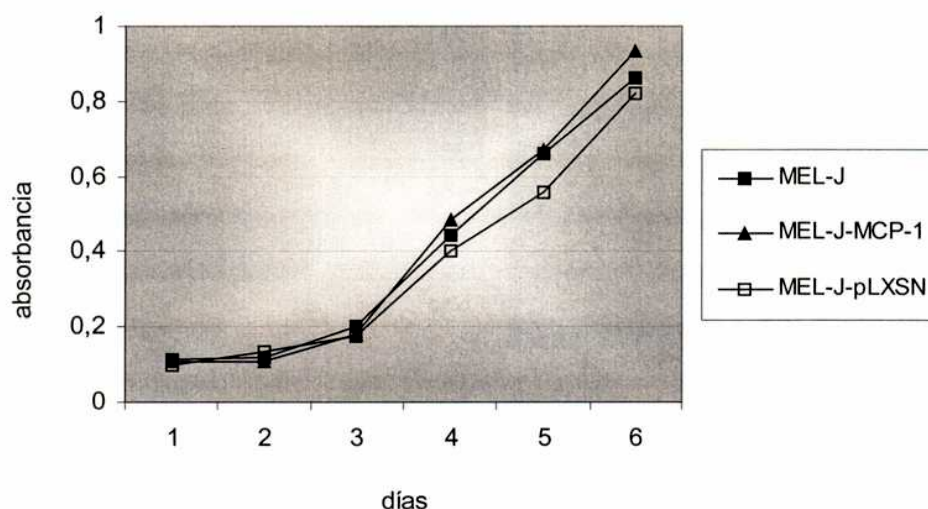


FIGURA 20: Curva de crecimiento de las distintas sublíneas de melanoma. Las células fueron desprendidas de las placas de cultivo con EDTA 1X, lavadas y 5000 células se plaquearon por cuadruplicado en placas de 96 pocillos. A los tiempos indicados las células se cuantificaron por tinción con MTT.

(II.3.2) Evaluación del potencial quimiotáctico de IIB-MEL-J-MCP-1 sobre células mononucleares. Ensayos *in vitro*

Considerando el efecto estimulador de la migración que desencadena MCP-1 sobre ciertos leucocitos, se consideró de interés evaluar si el sobrenadante condicionado de la sublínea transfectada podría reproducir tal efecto. Los leucocitos que se utilizaron fueron monocitos de sangre periférica y células dendríticas humanas, dado que son dos tipos celulares importantes para el inicio de una respuesta contra el tumor y que se sabe son blanco de acción de esta quemoquina.

Para ello, previamente, se realizó una curva dosis-respuesta con la quemoquina recombinante para células dendríticas maduras e inmaduras (**Figura 21, A y B**) y monocitos en presencia y ausencia de LPS (**Figura 21, C y D**).

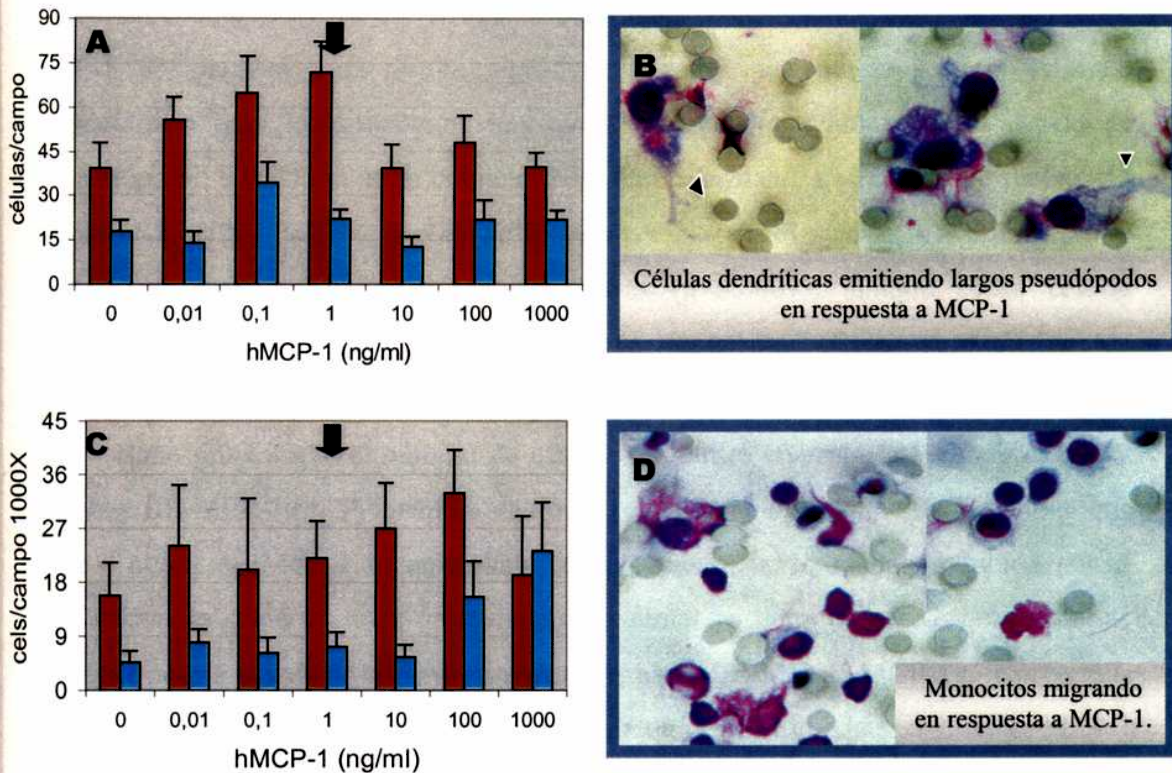


FIGURA 21:

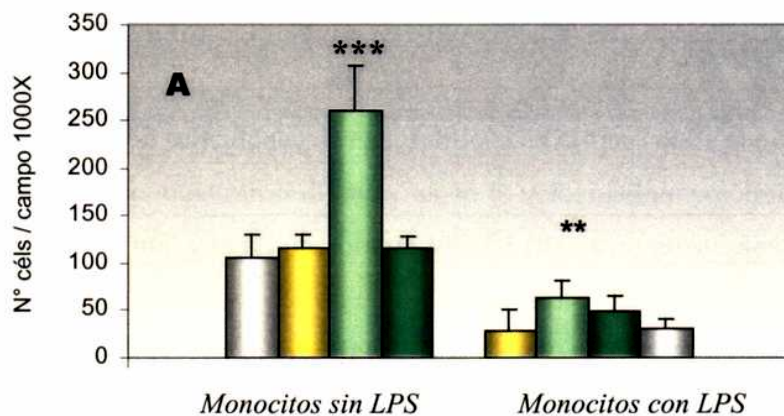
Análisis de la migración en cámara de Boyden de (A) células dendríticas y (C) monocitos humanos en respuesta a hMCP-1 recombinante.

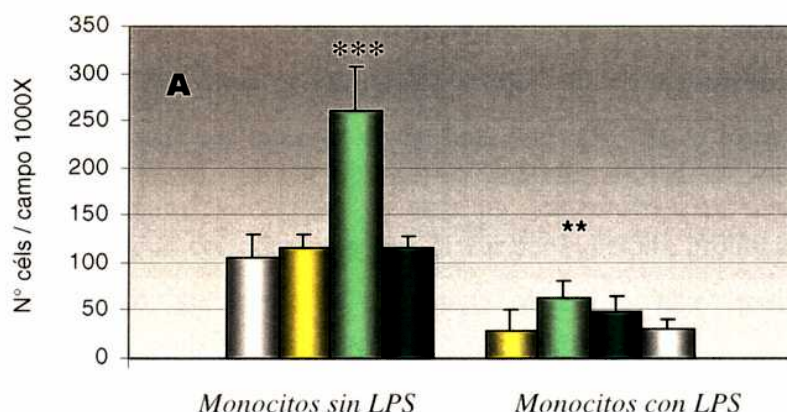
■ monocitos sin activar o células dendríticas inmaduras
 ■ monocitos activados o CD maduras con LPS (1.5µg/ml por 48 hs) Se cuantificaron células en 5 campos de 1000X por triplicado. La flecha indica la concentración correspondiente al clon IIB-MEL-J-MCP-1. Las fotos B y D corresponden a imágenes de las células respondedoras presentes en la cara migratoria de la membrana de quimiotaxis

A la concentración aproximada a la que produce la sublínea IIB-MEL-MCP-1 ($\approx$ 1ng/ml de MCP-1), los monocitos humanos no estimulados se tornan aproximadamente 30% más migratorios que estimulados con LPS y las células dendríticas inmaduras presentan un pico de migración, lo que representa además entre 70-90% mayor respecto de las CD maduras (dependiendo del aislamiento). Las células dendríticas maduras normalmente se presentan como células menos móviles frente a los estímulos que inducen la migración de células inmaduras [Vecchi, 1999] y este perfil se reprodujo tanto para el MCP-1 recombinante como para el sobrenadante del clon MCP-1 positivo (Fig. 22 B).

En cuanto al medio condicionado de la línea transfectada para la producción de MCP-1 se observó que resulta significativamente más potente como estímulo quimiotáctico para los monocitos humanos, independientemente de su estado de activación ($p < 0,0001$) si se lo compara con el sobrenadante de la línea de melanoma parental o aquella transfectada con el plásmido sin inserto (**Figura 22 A**). Este efecto se repite para las células dendríticas inmaduras ($p < 0,0001$), aunque sobre células dendríticas maduras con LPS no parece tener un efecto tan potente de quimioatracción ($p = 0,05$) (**Figura 22 B**).

Cabe señalar que el número de células migrantes en respuesta al sobrenadante del clon IIB-MEL-J-MCP-1 supera en forma considerable el número de células que atrae 1 ng/ml de MCP-1 recombinante (concentración aproximada producida por el clon). Debido a que la línea de melanoma parental ya tiene un efecto quimiotáctico basal, se podría adjudicar la mayor quimiotaxis hacia IIB-MEL-J-MCP-1 a la presencia de otras quemoquinas producidas por las células tumorales y que la secreción de MCP-1 estaría sumándose a ese efecto basal, potenciando su poder de reclutamiento.



**FIGURA 22:**

Análisis de la migración en cámara de Boyden de (A) monocitos, (B) células dendríticas inmaduras y (G) maduras en respuesta a:

- sobrenadante de cultivo sin suero de la línea de melanoma IIB-MEL-J,
- sobrenadante de cultivo sin suero de la línea productora de MCP-1,
- sobrenadante de cultivo sin suero de la línea portadora del plásmido pLXSN,
- medio de cultivo sin suero fetal.

Los valores corresponden al promedio del número de células en 5 campos de 1000X realizado por triplicado. (IIB-MEL-J vs IIB-MEL-J-MCP-1 *** $p < 0,0001$, ** $p = 0,001$).

(II.3.3) Evaluación del potencial quimiotáctico del IIB-MEL-J-MCP-1 sobre células mononucleares. Ensayos *in vivo*

La inyección subcutánea de esta sublínea en ratones *nude* condujo a la formación de tumores y no se registraron diferencias en la velocidad de crecimiento entre la línea de melanoma parental y la productora de MCP-1 (datos no mostrados).

A distintos tiempos post-inyección de las suspensiones celulares se resecaron los sitios de inyección donde se efectuó un análisis histológico para determinar el perfil de células infiltrantes *in vivo* en los estadios iniciales de establecimiento tumoral (Tabla III). Así se observó que se promueve un aumento moderado de macrófagos peritumorales y células mononucleares a los 4 días post-inoculación. Al día 11, la persistencia de macrófagos estuvo acompañada de edema (Figura 23 A) y numerosos fibroblastos con una presencia diferencial de macrófagos y linfocitos que se mantiene hasta un mes post-inoculación de las células. Tal aumento estuvo ausente en la línea parental IIB-MEL-J.

Realizando un análisis cuantitativo de las células infiltrantes, observamos diferencias significativas para la infiltración de células macrofágicas ($p = 0,01$, Wilcoxon rank test)

en todos los tiempos tanto peritumoral como intratumoralmente (**Figura 23 B y Tabla V**). La presencia de linfocitos peritumorales arrojó valores significativos ($p = 0,05$, Wilcoxon rank test) para los tumores de 30 días derivados de la línea productora de MCP-1.

En consecuencia, consideramos que la sublínea elegida productora de MCP-1 constituye un modelo interesante de melanoma MCP-1 positivo para extender los estudios sobre modulación de células inflamatorias en el sitio tumoral y analizar con mayor detalle los inmunofenotipos de las células mononucleares reclutadas de manera de discriminar qué subpoblaciones de macrófagos y tipo de células dendríticas se encuentran presentes.

Días post inyección	MACRÓFAGOS		LINFOCITOS		PMN		FIBROBLASTOS		EDEMA	
	Parental	Clon	Parental	Clon	Parental	Clon	Parental	Clon	Parental	Clon
4 días	+	++ / +++	+	± / +	+	++	-	-	-	-
11 días	+	++ / ++++	-	-	±	±	+	+++	-	+++
20 días	± / +	++ / ++++	- / ±	± / +	±	+	+	++	-	±
30 días	±	++	+	++	- / +	- / +	+	+	-	±

TABLA IV: Análisis semicuantitativo de los tipos celulares infiltrantes realizado sobre cortes histológicos contrastados con hematoxilina-eosina. Los símbolos implican: (-) ausente; (±) escaso; (+) moderado; (++) abundante y (+++++) muy abundante.

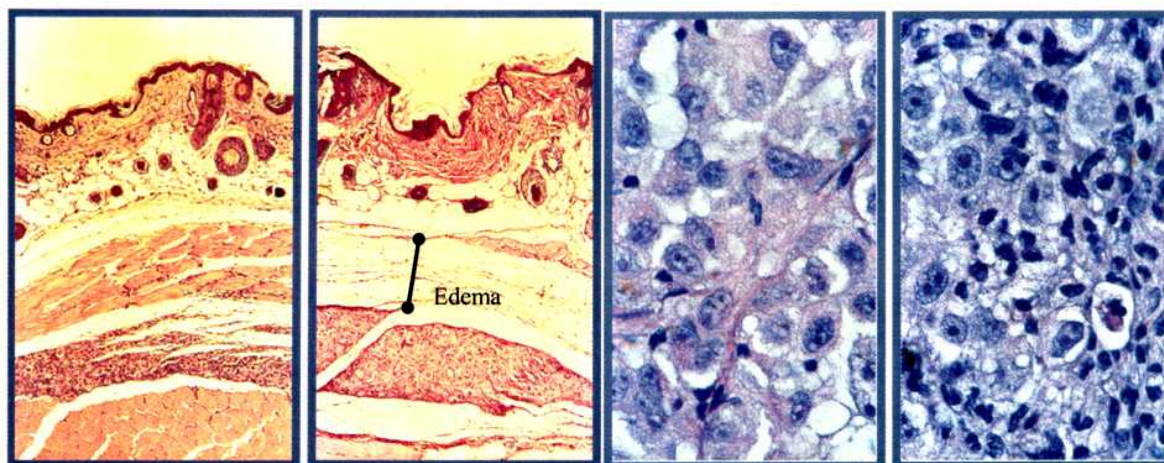


FIGURA 23: (A) Epidermis y dermis por encima del tejido tumoral (200X). (B) Presencia de edema peritumoral en el tumor generado con la sublínea productora de MCP-1 (200X). (C) Tejido tumoral sin infiltración (1000X). (D) Infiltrado de macrófagos y algunos linfocitos intratumorales (1000X).

Días	PERITUMORAL					
	M0		Ly		PMN	
	parental	clon	parental	clon	parental	clon
4	2 (0-11)	4** (0-26)	0 (0-4)	0 (0-3)	0 (0-3)	2** (0-22)
11	1 (0-4)	4** (0-14)	0	0	0 (0-2)	0 (0-2)
20	2 (0-20)	33** (0-70)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-6)
30	0 (0-37)	18** (0-64)	0 (0-2)	0* (0-7)	0 (0-3)	0

Días	INTRATUMORAL					
	M0		Ly		PMN	
	parental	clon	parental	clon	parental	clon
4	2 (0-10)	5** (0-33)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-8)
11	2 (0-6)	3* (0-9)	0	0	0 (0-1)	0
20	0 (0-2)	8** (0-30)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0
30	3 (0-18)	6** (0-19)	0	0 (0-4)	0	0

TABLA V: Análisis cuantitativo de la infiltración en el área peritumoral e intratumoral efectuado en 10 campos de 1000X. Los valores están expresados como medianas y rangos. ** $p=0.01$ y * $p=0.05$ (Wilcoxon rank test)

(II. 3. 4) Comportamiento migratorio de la línea transfectada

Además del cambio morfológico de las células de melanoma productoras de MCP-1, se consideró evaluar si presentaban algún cambio funcional como podría ser un cambio en su motilidad. Un candidato a utilizar fue el tripéptido formilado fMLP, dado que es un factor quimiotáctico potente, utilizado frecuentemente en ensayos de quimiotaxis debido a su capacidad de estimular la migración de muchos tipos celulares. Sin embargo, se ha informado que en células de melanoma y otros tumores, procesos como la migración, adhesión, diferenciación y proliferación, involucran la participación de integrinas que adhiere las células tumorales a componentes proteicos de la matriz extracelular [Juliano, 1993].

Para analizar entonces la migración de la línea IIB-MEL-J-MCP-1, se utilizó el ensayo en cámara de Boyden donde varias condiciones debieron ajustarse respecto de las quimiotaxis más convencionales. Las células se sembraron sobre membranas de 8 μm de poro previamente tratadas con gelatina estéril al 0,1% y al cabo de 12 h de incubación, se analizó el número de células migrantes en respuesta a estímulos como: medio sin suero, fMLP 10^{-8} M y medio condicionado de fibroblastos humanos (HFL-1), el cual contiene una mezcla de componentes de matriz capaces de estimular la migración de las células invasivas [Mensing H, 1984].

Como se observa en la **Figura 24**, las células transfectadas para la producción de MCP-1 presentan una motilidad mayor frente al péptido quimiotáctico fMLP aunque no logra alcanzar significancia estadística. No obstante, la mayor capacidad migratoria de estas células se pone de manifiesto claramente en respuesta al medio condicionado por células HFL-1 (** $p=0,0025$), efecto que no se presenta en las células parentales o transfectadas con el plásmido sin inserto. Considerando la importante respuesta a componentes de la matriz extracelular presentes en dicho medio condicionado, podría suponerse que la mayor motilidad de las células MEL-J-MCP-1 estaría relacionada con

la interacción de integrinas, que se sabe están presentes en células de melanoma [Juliano, 1993]. Este punto se tratará con mayor detalle en Discusión.

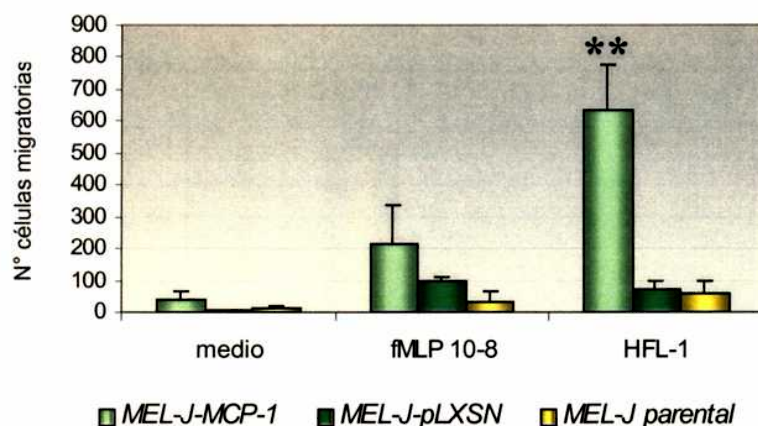


FIGURA 24: Quimiotaxis de las células de melanoma indicadas frente a diversos estímulos. Los datos corresponden al promedio del número total de células migrantes. Cada condición fue realizada por triplicado en dos experimentos independientes. **p= 0,0025

(II. 3. 5) Evaluación de la adhesión al endotelio

Otro aspecto que se consideró interesante analizar fue si la expresión de MCP-1 producía algún cambio en la sublínea en cuanto su capacidad de interactuar con el endotelio. Para ello, sobre monocapas de células endoteliales, se sembraron las células tumorales previamente marcadas con $^3\text{[H]}$ -timinidina. Luego de 30 min de adhesión y posteriores lavados se cuantificó la cantidad de radiactividad asociada al endotelio.

Los resultados obtenidos muestran que la línea IIB-MEL-J-MCP-1 se torna menos adherente que IIB-MEL-J parental y la transfectada con el plásmido sin inserto (**Fig 25**). Los porcentajes de adhesión fluctuaron dependiendo de los aislamientos de células endoteliales pero IIB-MEL-J-MCP-1 nunca superó el 20% de adhesión mientras que las otras dos líneas siempre presentaron valores de adhesión mayores al 60%. La pre-estimulación de las células endoteliales con LPS remeda una situación inflamatoria haciendo que el endotelio se torne más adhesivo para los monocitos circulantes [Maus,

2002]. Únicamente la línea productora de MCP-1 responde aumentando su adherencia al endotelio activado ($p=0.05$), rasgo que no se observa para ninguna de las líneas controles.

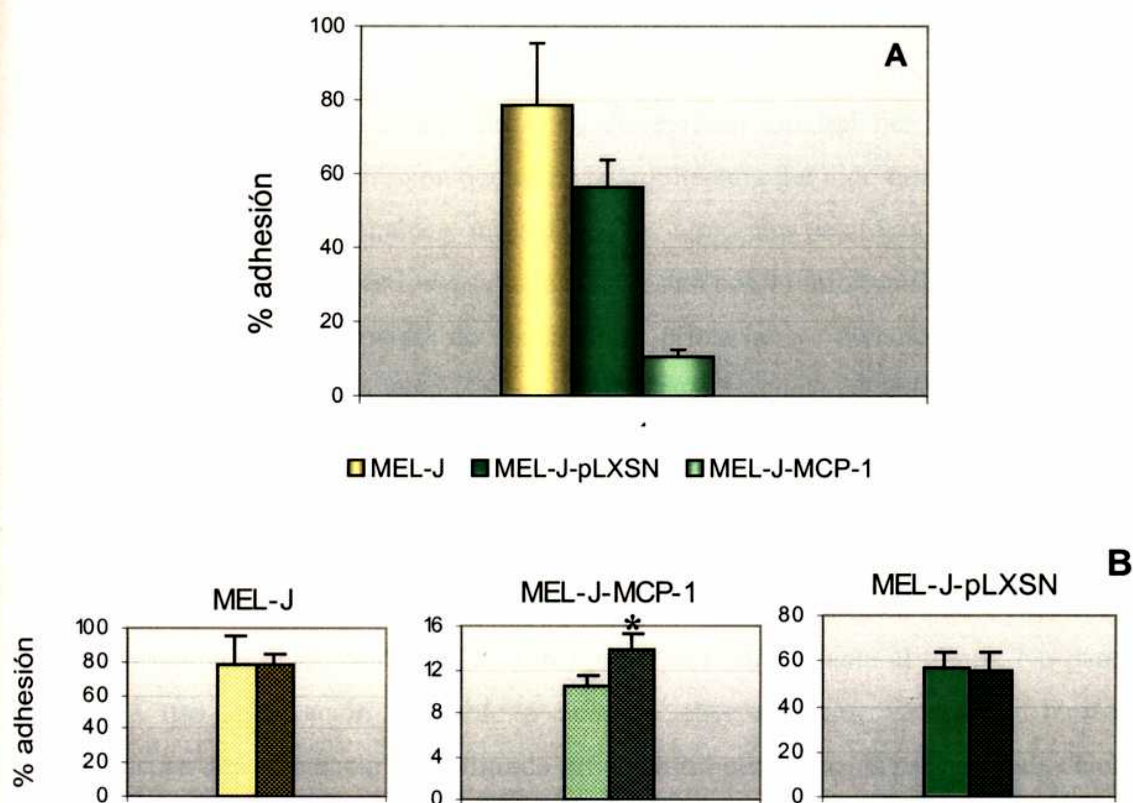


FIGURA 25: (A) Comparación de la adherencia de las líneas de melanoma al endotelio en reposo (B) Panel de gráficos mostrando la adhesión de cada una de las líneas al endotelio en reposo (barras claras) y post activación con LPS. Los datos corresponden a uno de tres experimentos representativos. Cada condición fue realizada por triplicado * $p=0,025$

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que el 100% (41/41) de los melanomas metastásicos humanos analizados expresan la quemoquina MCP-1, de los cuales el 85% (35/41) presentaron más del 51% de sus células MCP-1 positivas con una intensidad moderada a alta y un porcentaje menor de células positivas de leve intensidad. La inmunoreactividad en las células positivas del epitelio tumoral fue homogéneamente citoplasmática y sin polarización dentro de la arquitectura del nido tumoral. También se observaron células endoteliales y macrófagos peritumorales positivos los cuales fueron excluidos del análisis. Nuestros resultados contrastan con lo informado previamente por otros autores para biopsias de melanoma primario y melanoma metastásico. Particularmente, Kunz y colaboradores [1999] encuentran una expresión débil de MCP-1 en células tumorales aisladas y localizan positividad principalmente en queratinocitos basales a la lesión y algunos macrófagos infiltrantes. Cuando la detección se efectuó mediante la evaluación de la expresión *in situ* del ARNm de MCP-1 [Graves, 1992], observaron una distribución principalmente focal, sugiriendo que sería la consecuencia de la particular influencia del tejido o infiltrado local circundante al tumor. No parece ser ésta una explicación aplicable a nuestras observaciones, ya que si bien no descartamos una influencia del infiltrado inflamatorio periférico, la presencia de células tumorales reactivas fue ubicua y no se restringió a aquéllas en contacto con el infiltrado.

El valor biológico de la expresión de esta quemoquina por parte de los tumores reviste un punto de relativo conflicto ya que no es posible lograr un consenso en cuanto al rol que podría tener su presencia para el destino final del tumor.

Como mencionáramos anteriormente, existen evidencias experimentales que sugieren que la expresión de MCP-1 puede influir negativamente en el crecimiento de ciertos tumores en humanos [Rollins, 1991; Nokihara, 1999] a través de la inducción de vascularización y promoviendo así el crecimiento tumoral e incluso acrecentando la invasión y la metástasis [Neumark, 1999]. Tales efectos estarían mediados por la llegada de monocitos al sitio tumoral, que producirían factores de crecimiento y mediadores angiogénicos (VEGF, TNF- α , bFGF, entre otros) que serían los responsables de una mayor vascularización o la proliferación directa de las células tumorales.

En cambio, en otros trabajos, la producción de MCP-1 produjo un retardo del crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma maligno [Botazzi, 1992], y la vacunación con células productoras de MCP-1 produjo una protección 100 veces mayor contra posteriores desafíos tumorales en un modelo de gliosarcoma [Manome, 1995].

Un trabajo reciente podría explicar en parte esta dualidad ya que señala que los efectos del MCP-1 sobre los tumores dependería de los niveles expresados por el tumor, siendo los altos niveles los que conducirían a contribuir al rechazo vía la acción tumoricida de los macrófagos reclutados [Nesbit, 2001].

Según nuestros resultados, el melanoma metastásico presenta cierta heterogeneidad de expresión de MCP-1 dentro del mismo tumor. Siendo así, y considerando que existe un efecto antitumoral indirecto hacia las células con altos niveles de MCP-1, se podría pensar que en etapas iniciales del establecimiento tumoral, esto podría generar una presión selectiva diferencial sobre las células del melanoma más intensamente positivas, que se verían particularmente atacadas por los macrófagos. Así, dentro de la misma masa tumoral, las zonas de células menos productoras, al inducir un menor aflujo de macrófagos, tendrían mayor facilidad de eludir la acción tumoricida y podrían proliferar aumentando en proporción. De ser así, después de un tiempo de establecido el tumor, encontraríamos células con moderada, baja o nula capacidad de producir MCP-1 que contribuiría al mantenimiento o progresión más que a regresión.

En las biopsias que hemos analizado, existen muestras con una reactividad muy marcada para MCP-1. Sin embargo, es difícil poder establecer si corresponde a un nivel “suficientemente elevado” para inducir regresión, como los niveles necesarios reportados por Nesbit para sus líneas. No obstante, manteniendo la coherencia de la hipótesis arriba propuesta, sería que esperar que cualquiera sea la inmunoreactividad que los tumores mostrasen, luego de un tiempo de establecidos, tales niveles estuviesen fomentando el mantenimiento o crecimiento tumoral y no su destrucción.

MCP-1 es una quemoquina prototípica para el reclutamiento de monocitos, y su expresión resulta en la aparición de infiltrados de macrófagos al sitio tumoral [Sica, 2002] y para algunos autores, tal infiltración correlaciona con la angiogénesis y el estadio tumoral [Torisu, 2000]. En nuestro caso, no fue posible encontrar correlación entre la presencia de TAM y la intensidad de MCP-1, dado que nos encontramos con

una particular distribución de los macrófagos, principalmente asociados a las zonas de angiogénesis microvascular. Esta disposición podría señalar la ruta de extravasación de los macrófagos atraídos por el estímulo quimiotáctico producido por el tumor; o bien podría ser una evidencia que la angiogénesis presente en tales sitios es una consecuencia del estímulo angiogénico directo producido por los TAM. En este último caso, sería necesario analizar si existe producción de TNF- α producido por los macrófagos estimulados por el MCP-1 de las células tumorales [Nesbit, 2001].

Además en nuestro trabajo sobre melanoma metastásico, las biopsias con mayor intensidad de MCP-1 resultaron las más profusamente vascularizadas. Esta evidencia estaría sugiriendo un efecto directo de MCP-1 sobre la angiogénesis, más que uno indirecto vía TAM. En el momento en que estos estudios se realizaron y sin mayores evidencias mecanicísticas, esta correlación no podía ser aceptada dado que sólo eran conocidos reportes sobre algunos miembros de las CXC quemoquinas con efectos proangiogénicos directos [Strieter, 1995]. Sin embargo, la aparición de un trabajo relativamente reciente [Salcedo, 2000] demuestra que las células endoteliales expresan CCR2, el receptor para MCP-1 produciendo un efecto directo sobre la angiogénesis (independientemente de respuesta inflamatoria). Asimismo, demuestran un efecto de MCP-1 sobre la progresión tumoral, dado que anticuerpos contra la quemoquina inhiben el desarrollo de micrometástasis pulmonares experimentales [Strieter, 1995].

Para el caso de melanoma, la importancia de la angiogénesis como indicador pronóstico es más controversial que para el cáncer de mama dado que los resultados son más variados. Por ejemplo, se ha visto que para melanoma cutáneo, la cuantificación del área vascular y las ramificaciones de los microvasos son mediciones que aportan mayor significancia para evaluar la neovascularización con sentido pronóstico que el número o densidad vascular [Massi, 2002]. En nuestro caso, las biopsias con altos recuentos de áreas vasculares correlacionan con menor sobrevida $p < 0,001$ (datos no mostrados). Posteriormente, también en melanoma metastásico como los analizados en este trabajo de Tesis, otros autores encuentran que las muestras más altamente vascularizadas se correspondían con períodos libre de enfermedad más breves [Vlaykova, 1999].

Para tener la posibilidad de analizar distintas etapas del establecimiento de los melanomas MCP-1 positivos, principalmente en cuanto a la presencia de infiltrado inflamatorio, se procedió a la transfección de la línea IIB-MEL-J, la cual resultó negativa para la producción de la quemoquina de interés. Luego de la transfección, se seleccionó un clon productor de MCP-1, el cual no presenta diferencias en su tasa de crecimiento *in vitro*. Sin perder su tumorigenicidad, la inyección subcutánea de estas células produjo tumores a los producidos por la línea parental. Se podría pensar que los niveles secretados por la sublínea no son suficientes para inducir un reclutamiento de macrófagos que determinen el destino del tumor. No obstante, el nivel de MCP-1, más de 70 veces superior al de la línea parental, es suficiente para inducir un claro efecto migratorio *in vitro* sobre monocitos y células dendríticas. La mayor capacidad de inducir quimiotaxis de monocitos de esta sublínea también se probó *in vivo* produciendo tumores más infiltrados tanto peri- como intratumoralmente que los producidos por la línea parental.

Como se mencionara anteriormente, no es claro aún el rol de los macrófagos infiltrantes en el crecimiento tumoral. Se considera que los macrófagos intratumorales (TAM) encontrados en tumores humanos y experimentales conducen a una inhibición del crecimiento tumoral [Rollins, 1991; Yashimura 1994; Nesbit, 2001]. En un trabajo de Zhang y colaboradores [1997], observaron que cuando se inhibe la llegada de TAM mediante el uso de anticuerpos monoclonales (anti-CD11b), esta estrategia resulta en un aumento significativo del crecimiento tumoral en estadios tempranos de la tumorigénesis.

En cambio, no existen tantos reportes donde se desglose el rol que los macrófagos peritumorales pueden tener sobre el destino del tumor. Están comúnmente presentes en tumores humanos y particularmente en tumores negativos para MCP-1 por lo que se podría pensar que resultan de una respuesta del huésped al crecimiento expansivo del tumor. No obstante, en vista de los resultados presentados en algunos trabajos, se perfila para ellos un rol igualmente controversial que para los TAM. Particularmente, se propone que soportan el crecimiento tumoral mediante la liberación de factores que estimulan el crecimiento del tumor [Norman, 1985]. Aunque para el grupo de D. Graves, la inhibición de tal reclutamiento peritumoral, resulta en una potenciación del crecimiento, demostrando que actuarían limitando la expansión del tumor [Zhang, 1997].

En resumen, el modelo de IIB-MEL-J-MCP-1 en ratones *nude* permite analizar el valor de los macrófagos reclutados en “estado puro” sobre el destino del tumor y dado que:

- (a) no existen diferencias de crecimiento entre los tumores MCP-1 + y los parentales,
 - (b) IIB-MEL-J-MCP-1 presenta un probado poder quimioattractante para monocitos tanto *in vitro* como *in vivo*,
 - (c) los tumores MCP-1+ presentan infiltrado peri e intratumoral,
- se propone que la presencia de macrófagos requeriría de la rama efectora de la respuesta celular para que exista una actividad antitumoral neta. En los trabajos antes citados donde trabajan con modelos inmunocompetentes, no se hace referencia al rol de los linfocitos para los cuales MCP-1 también es quimioattractante.

Por último, cabe señalar un efecto llamativo, consecuencia de la transfección para la producción de MCP-1. Las células de la sublínea IIB-MEL-J-MCP-1 exhiben una mayor motilidad, ausente en las líneas controles. Frente al estímulo clásico de fMLP se observó una tendencia migratoria mayor que la línea parental o la transfectada con el plásmido sin inserto, pero el aumento en la migración fue muy marcado frente al medio condicionado por células HFL-1 (rico en componentes de matriz extracelular) usado como quimioattractante.

En monocitos, es bien conocido el efecto de las quemoquinas sobre las integrinas induciendo un cambio conformacional de la forma inactiva a la forma activa [Springer, 1994]. También en monocitos, MCP-1 regula la expresión de las cadenas- α de la familia de las $\beta 2$ integrinas [Jiang, 1992; Vaddi, 1994]. Si bien no existen reportes de que $\beta 2$ integrinas estén presentes en células de melanoma, se sabe de la expresión de otras de ellas ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, etc..) [Zhu, 2002]. Específicamente para la línea IIB-MEL-J, resultados no publicados del laboratorio sugieren la presencia de integrinas ya que su capacidad invasiva fue inhibible por el péptido antagonista RGD.

Entonces, si un efecto semejante al que MCP-1 tiene sobre los monocitos, estuviese operando al nivel de las integrinas presentes en las células de melanoma, esto podría explicar los cambios en la adhesión al endotelio y en la capacidad migratoria de las células transfectadas MCP-1+ frente a componentes de la matriz extracelular presentes en el medio condicionado por fibroblastos. La formación de monocapas más compactas

sugiriendo un mayor contacto célula-célula podría ser, a su vez, otra manifestación de que podrían estar sucediendo cambios en las integrinas.

La incorporación del cromosoma 6 a una línea de melanoma maligno indujo cambios en el crecimiento dependiente de anclaje y por análisis por *microarray* de la línea modificada, se detectó la expresión aumentada de MCP-1 y conexina 43 [Su, 2000]. Cabe destacar que el gen de MCP-1 se encuentra ubicado en el cromosoma 17 (Introducción, sección II.1.5).

Por lo tanto, resulta interesante analizar en mayor detalle los cambios dependientes de MCP-1 presentes en IIB-MEL-J-MCP-1, además de resultar de utilidad como modelo in vivo para extender los estudios de modulación del infiltrado inflamatorio.

CAPÍTULO III



CAPÍTULO III

Estudio de la respuesta inflamatoria frente a distintos tratamientos

El tratamiento de la mayor parte de las neoplasias sigue siendo un desafío clínico, a pesar de los importantes avances recientes en el conocimiento de la biología tumoral y de la respuesta inmune contra el tumor. Para algunos casos de tumores refractarios a los tratamientos convencionales, se han puesto en práctica modalidades terapéuticas combinadas, donde se incluye radiación o quimioterapia con citoquinas como IL-2, IFN- γ , GM-CSF entre otras [Dezso, 1996; Nagai E, 1998; Redman, 1998]. Algunas de estas terapias duales se encuentran en etapa de ensayo clínico en pacientes [Redman, 1998].

La terapia con frío -crioterapia- es una rama de la criobiología que se vale de la aplicación terapéutica de temperaturas muy inferiores a 0 °C para la destrucción de tejidos en un área blanco seleccionada [Zouboulis, 1999]. El proceso de congelamiento induce necrosis debido al rápido congelamiento y la lenta recuperación de la temperatura [Mazur, 1984; Turk 1999; Zouboulis, 1999]. Existen pocos reportes respecto a las condiciones óptimas de congelamiento según el tipo de tejido a tratar [Turk 1999; Zouboulis, 1999]. Más aún, la fase inmunológica que acompaña al daño tisular no ha sido bien estudiada, por ejemplo, para lesiones malignas de piel [Zouboulis, 1999]. Por lo tanto, se requiere aún delinear las condiciones de la inducción de necrosis en algunos tejidos y realizar un estudio más detallado de la reacción inflamatoria y/o inmune acompañante.

Al respecto, trabajos recientes proponen que la muerte celular por necrosis [Galluci, 1999] puede activar señales endógenas de peligro que serían responsables, en parte, del reclutamiento de células dendríticas, las cuales son claves para el inicio del desarrollo de una respuesta inmune [Sauter, 2000].

Nuestro grupo está investigando la siguiente hipótesis:

“...diversos tratamientos efectivos actuarían desencadenando una respuesta de tipo inflamatoria a partir del daño producido a las células tumorales que redundaría en la liberación de citoquinas, quemoquinas y radicales libres, entre otros. Tal liberación de intermediarios produciría activación del endotelio y posterior influjo de células inflamatorias al tumor, determinándose un efecto en cascada que contribuiría a remover las células apoptóticas y/o necróticas, y tal vez a inducir una inmunidad retardada mediante células presentadoras de antígenos”.

Para poder realizar manipulaciones y estudios de la inflamación en función del tiempo se analizó el efecto de tratamientos como radioterapia y crioterapia sobre tumores humanos crecidos en ratones *nude*. Los objetivos propuestos para esta parte fueron:

- a) Estudiar los cambios en la activación del endotelio y variaciones del reclutamiento de granulocitos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos luego del tratamiento del tumor con la terapia seleccionada.
- b) Seleccionar la estrategia experimental que produzca las diferencias más significativas en términos de infiltración para continuar con el estudio del efecto de la adición de citoquinas sobre la respuesta inflamatoria, respuesta inmune y destino del tumor.

(III. 1.) RADIOTERAPIA

Para evaluar los objetivos antes propuestos usando como tratamiento la irradiación se utilizó un modelo de melanoma humano transplantado en ratones ‘nude’ (IIB-MEL-J_{nude}).

Ratones portadores de tumores fueron anestesiados e irradiados con 500 cGy/ratón en la zona del tumor. La penetración del haz de electrones garantizó un 85% de la radiación a un centímetro de profundidad, que era aproximadamente la dimensión mayor de los tumores utilizados. Luego a distintos tiempos, se tomaron muestras para el análisis histológico pertinente. Los resultados se presentan en la **Tabla VI**.

Como eventos tempranos, se observaron cambios en la arquitectura normal de las células: monstruosidades nucleares y vacuolización citoplasmática con agrandamiento

celular fueron los más conspicuos. La presencia de núcleos con granulado cromático y carionexis podrían ser síntomas de los inicios de un proceso apoptótico cuyos signos se advierten más marcados a la 26 horas post tratamiento. Posteriormente, se registró un aumento creciente e importante de áreas necróticas. En cuanto a las células inflamatorias, a excepción de la presencia de algunos PMN 7 horas post-tratamiento, no se observó infiltrado inflamatorio que acompañe el proceso de necrosis.

Horas post-tratamiento	Observaciones histológicas	Observaciones inmunohistoquímicas
0 (control)	necrosis periférica	pocas células infiltrantes
7	halo necrótico periférico importante algunos indicios de apoptosis	algunos PMN intratumorales estroma activo
26	halo de necrosis periférica muchas células con signos de apoptosis	sin infiltrado
48	muchas áreas de necrosis	sin infiltrado
196 (8 días)	muchísima necrosis y cambios celulares	sin infiltrado

Tabla 3.1. Evolución histológica y inmunohistoquímica de los tumores de melanoma en ratones *nude* sometidos a crioterapia.

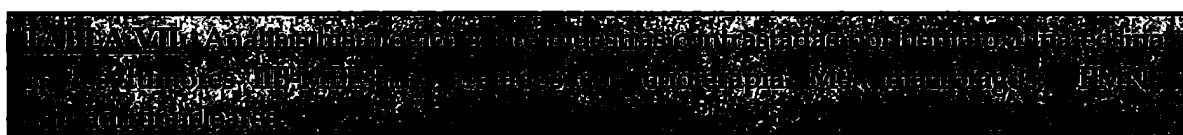
(III. 2) CRIOTERAPIA

Con el propósito de seguir indagando acerca de la posibilidad del reclutamiento de células inflamatorias frente al daño celular, se decidió probar cuál sería el efecto de producir muerte celular mediante un ciclo de congelación y descongelación.

Así, ratones *nude* portadores de melanomas subcutáneos producidos por la línea IIB-MEL-J se trataron con un rocío de nitrógeno líquido (según las pautas de aplicación

utilizadas en el tratamiento de pacientes). A distintos tiempos post tratamiento, los animales se sacrificaron, se tomaron muestras para el análisis histológico y los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla VII**.

TIEMPO POST TRATAMIENTO	PRESENCIA DE CAMBIO	INFLAMACIÓN
0 (control)	halo de necrosis periférica muchas vascularización intratumoral	sin infiltrado
24	marcada necrosis mucho edema endotelio dilatado	algunos PMN, bastantes MØ peritumorales, fibroblastos y escasos linfocitos.
97 (4 días)	necrosis tumoral muy importante menor número de vasos sanguíneos	infiltrado peritumoral : abundancia notable de MØ y fibroblastos con PMN y escasos linfocitos.
168 (7 días)	necrosis casi total	abundancia de MØ y fibroblastos pocos PMN
360 (15 días)	80-90% de necrosis	abundancia de MØ y fibroblastos pocos PMN



Como se observa, el tratamiento produce rápidamente una marcada necrosis que se ve acompañada de un infiltrado inflamatorio evidente y con múltiples tipos celulares. Entre ellos, parecería advertirse en primer lugar, una respuesta de células polimorfonucleares y escasos eosinófilos ante el estímulo. Luego, los macrófagos aumentan notablemente con una presencia minoritaria de linfocitos, los cuales podrían ser NK o linfocitos B o precursores inmaduros del linaje T por tratarse de ratones atímicos. Asimismo, se registra un aumento en el número de fibroblastos contribuyendo a la reparación del daño tisular.

(III. 3) CRIOTERAPIA + ADYUVANTES

Con el objeto de analizar posibles cambios en el perfil inflamatorio observado frente a la crioterapia, se le sumó la aplicación de QS21 (saponina de *Quillaja saponaria* Molina) 50 µg/ratón o de GM-CSF (500 U/ratón) ambos en forma de una única dosis intratumoral posterior a la inducción de la necrosis. Los resultados se resumen en la **Tabla VIII**.

Mientras que en los tumores de los animales controles, la masa tumoral se mostraba viable y bien delimitada, con bajo a nula infiltración y poca necrosis - inherente al crecimiento- en los tumores tratados con nitrógeno, el porcentaje de necrosis aumenta y la reacción inflamatoria se ve moderada.

La combinación de congelación con nitrógeno más GM-CSF resultó más potente inductor de la inflamación peri e intratumoral. Sin embargo, la combinación de nitrógeno con QS21 produjo un reclutamiento inflamatorio disminuido frente a la combinación GM-CSF/ congelación.

Tratamiento	Reacción inflamatoria	Reacción inflamatoria
Ninguno	+/-	---
Crioterapia	++	++
Crioterapia + QS21	++	++
Crioterapia + GM-CSF	++	++++



Sobre la base de estos resultados se seleccionó ensayar la inducción de necrosis con crioterapia sumada a la aplicación de GM-CSF para continuar con un estudio más

exhaustivo. Previamente, fue importante determinar cuales serían los puntos críticos para el análisis de los cambios inflamatorios. Por ello, antes de analizar con más detalle los efectos de la citoquina GM-CSF, se consideró importante evaluar la cinética de los eventos celulares y no celulares que tienen lugar posteriormente a la inducción de la necrosis, datos que por otra parte, no estaban exhaustivamente descriptos para melanomas.

Así, se observó que muy rápidamente, a 1,5 h. post inducción de la necrosis, los primeros eventos manifiestos fueron congestión, edema y activación de células endoteliales (**Tabla IX**). Los vasos intratumorales y periféricos mostraban células endoteliales hiperplásicas y agrandadas con aspecto epitelioide y protrusión nuclear, todos indicios de la activación del endotelio. Estas manifestaciones tempranas revirtieron a los 15 días del tratamiento donde fue posible observar células endoteliales con su morfología plana y característica, semejante a la presente en los vasos de los tumores no tratados.

El edema fue remitiendo en tanto comenzaba a evidenciarse un aumento de los fibroblastos peritumorales principalmente entre los días 7 y 15 post crioterapia. La acumulación de colágeno fue un fenómeno tardío.

La distribución de las células inflamatorias no es homogénea, sino que en zonas de alta infiltración peritumoral se advierten cúmulos celulares todavía mas densamente agrupados. En cuanto a su cinética, se registró una temprana respuesta de PMN, los cuales estaban densamente reclutados en la luz vascular con escasa a nula extravasación al tejido. Más tarde, los PMN se encontraban infiltrando masivamente el área peritumoral para alcanzar su máximo número a los 3 días posteriores a la aplicación de la crioterapia y finalmente a los 15 días, estas células registraban una notoria disminución.

A su vez, los macrófagos, estaban escasamente representados a las 24 horas de la aplicación del rocío de nitrógeno líquido, pero se tomaron más abundantes a los 3 días para hacer un máximo a los 7 días, y persistir hasta el final del período de observación (15 días).

Considerando estas observaciones, se eligieron los días 3 y 15 para proseguir con el análisis.

Tiempo post tratamiento	Macrófagos	PMN	Necrosis Tumoral	Fibroblastos	Congestión	Edema	Colágeno	Activación de CE
día -1 (sin tratam)	-	-	-	+	no	no	sin modif	no
1.5 h.	±	± +++ ^b	± ^c	+	+++	++++	sin modif	+
6.5 h.	±	+++	± ^c	+	+++	++++	sin modif	+
día 1	+	+++	± ^c	+	+++	++++	sin modif	+
día 3	+++	++++	++++	+	+++	+++	sin modif	++
día 7	++++	++	++++	++	+++	++	++	++
día 15	+++	+	++	+++	no	+	++++	+

TABLA IX: Los datos corresponden a una evaluación semicuantitativa en la periferia del tumor sobre secciones contrastadas con hematoxilina-eosina de dos experimentos independientes donde cada determinación se realizó por triplicado. (b) células observadas en el lumen de los vasos. (c) células tumorales con evidencias iniciales de necrosis. (d) CE, células endoteliales

(III. 4) CRIOTERAPIA + GM-CSF

Se estructuraron distintos grupos para este estudio con sus respectivos controles como se detalla a continuación:

GRUPOS	Animales		TRATAMIENTO
	día 3	día 15	
I	8	9	tumor sin tratar
II	8	10	crioterapia
III	8	10	rmGM-CSF intratumoral (i.t.)
IV	8	10	crioterapia + rmGM-CSF i.t.
V	8	8	vehículo i.t.
VI	8	8	crioterapia + vehículo i.t.

Mientras los tumores de los grupos I, III y V continuaron creciendo en ausencia de edema, en ambos grupos criotratados (II, IV y VI) el desarrollo tumoral se detuvo (Figura 26A).

La evaluación cuantitativa de la necrosis de los tumores del grupo II, IV concuerda con las estimaciones cualitativas previamente informadas, oscilando entre un 77-100% (**Figura 26B y 27 B**). En estos últimos grupos, se observaron 4/20 casos de regresión completa, donde el tumor fue totalmente reemplazado por masas necróticas y fibrosis. La presencia de células viables remanentes en el resto de los tumores se confirmó por la tinción nuclear en secciones de tejido y su proliferación sería el responsable del descenso en el porcentaje de necrosis registrado en los grupos II y IV al día 15 (**Fig 26A**). El edema se observó exclusivamente en los grupos que recibieron la crioterapia (**Fig. 26C**).

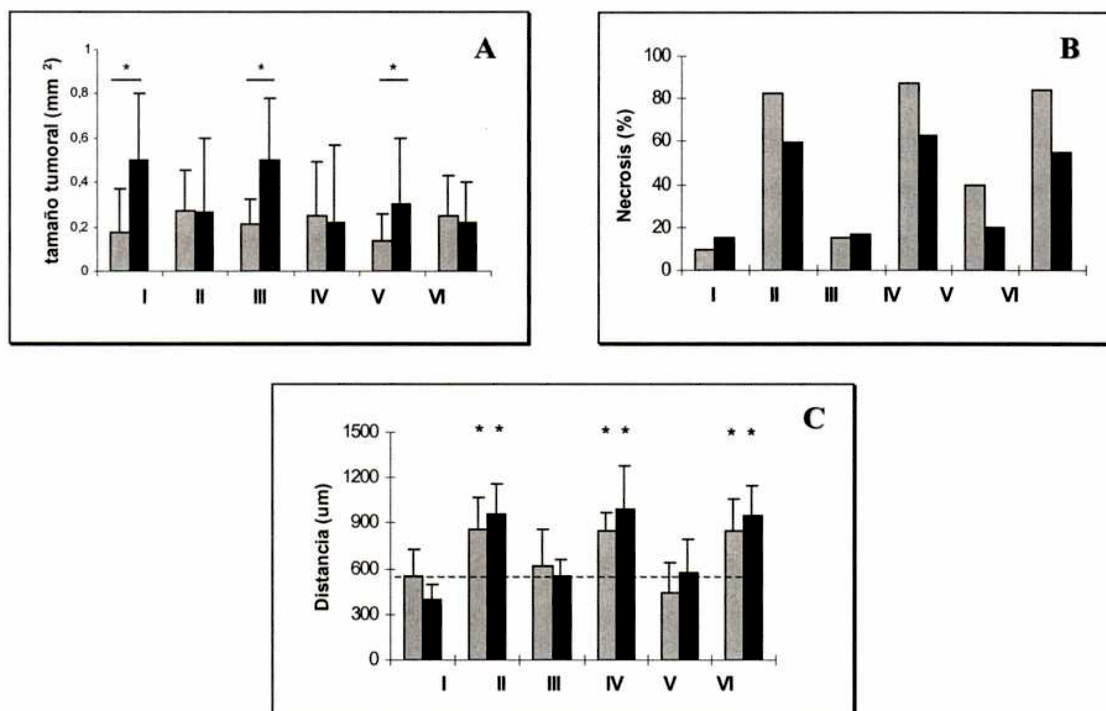


FIGURA 26 : En todos los casos las barras grises corresponden al análisis 3 días; negras: 15 días, después de la aplicación de nitrógeno líquido. (A): Perfil de la progresión de los tumores en los distintos grupos. (B): Cuantificación de la necrosis tumoral. Los valores se calcularon según se describe en Mat. y Métodos. (C): Evaluación del edema peritumoral. Las determinaciones se realizaron con la asistencia de un analizador de imágenes.

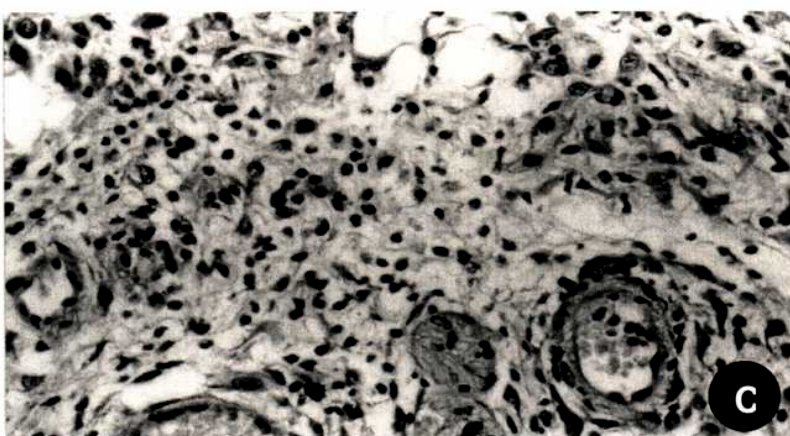
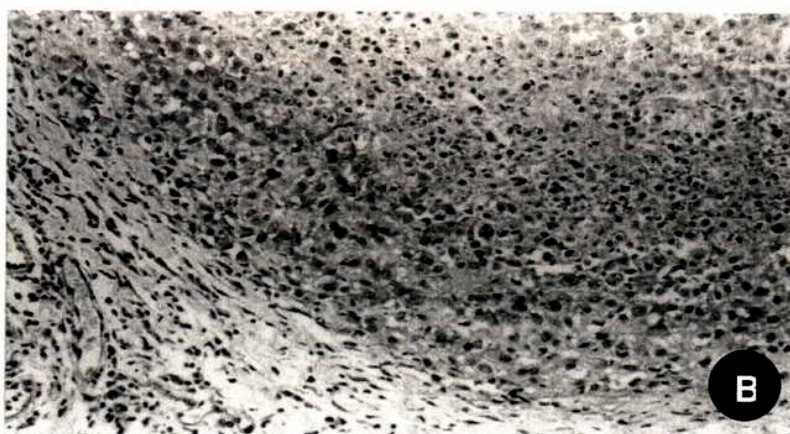
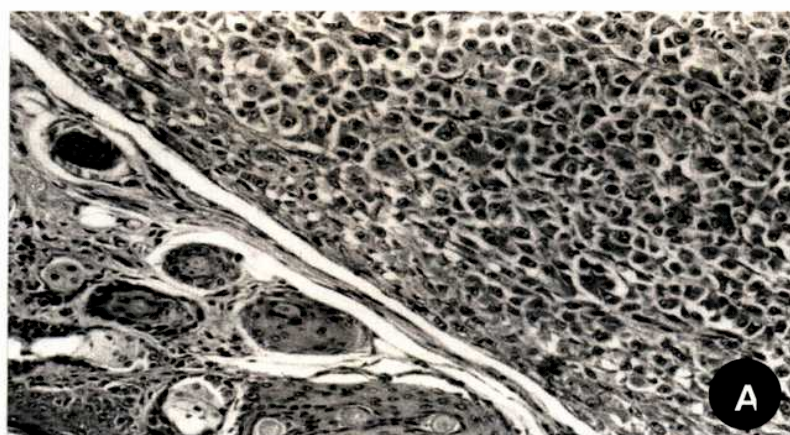


FIGURA 27:

(A) Áreas tumoral y peritumoral bien delimitadas en un tumor sin tratar (200X).

(B) Presencia de una amplia zona de infiltración peritumoral en un tumor donde se indujo necrosis por criocirugía (200X).

(C) Imagen con mayor detalle del infiltrado peritumoral inducido por la necrosis con crioterapia (400X)

En la **tabla X** se presenta un análisis cuantitativo de los dos tipos celulares predominantes en el infiltrado inflamatorio: PMN y macrófagos. Su identidad se confirmó por ensayo inmunohistoquímico con AcM específicos (ver tabla de anticuerpos, Mat & Métodos).

Peritumoralmente, al día 3, ambos grupos criotratados presentan un predominio significativo de PMN con campos de hasta 150 células. La población de

macrófagos también se vio significativamente reclutada a la periferia del tumor como consecuencia de la necrosis generada. En este caso fue posible encontrar aproximadamente 100 macrófagos en las áreas de máximo flujo celular (Tabla X).

En el grupo III (rm GM-CSF sólo) los macrófagos peritumorales fueron significativamente más abundantes que en el grupo I. Este aumento no supera los valores antes mencionados para los grupos criotratados. Probablemente, este efecto del GM-CSF también esté sucediendo en el grupo IV (crioterapia + rm GM-CSF), pero la alta densidad de infiltración evocada por la necrosis esta enmascarando este efecto (Tabla X).

Al final del período de observación (día 15) la intensidad de infiltración es menos pronunciada que a día 3 pero aún significativamente mayor para los grupos II y IV.

Grupos	PERITUMORAL				INTRATUMORAL			
	PMN		M		PMN		M	
	día 3	día 15	día 3	día 15	día 3	día 15	día 3	día 15
I	0	0	1	0	0	0	0	0
	(0-5)	(0-5)	(0-9)	(0-3)	(0-1)	(0-5)	(0-2)	(0-3)
II	20*	1*	12*	9*	0	0	0	0
	(2-150)	(0-20)	(3-150)	(0-28)	(0-12)	(0-4)	(0-2)	(0-3)
III	0	0	3*	0	0	0	0	0
	(0-8)	(0-16)	(0-19)	(0-9)	(0-1)	(0-5)	(0-6)	(0-2)
IV	20*	1	13*	4*	2*‡	1*	2*‡	2*
	(2-150)	(0-58)	(3-100)	(0-30)	(0-34)	(0-14)	(0-37)	(0-11)
V	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0-4)	(0-3)	(0-2)	(0-3)	(0-2)	(0-4)	(0-1)	(0-5)
VI	20*	1*	12*	5*	0	0	0	0
	(2-150)	(0-15)	(0-150)	(0-28)	(0-10)	(0-4)	(0-2)	(0-3)

TABLA X: Cuantificación intra y peritumoral de células inflamatorias en los diferentes grupos ensayados. Los conteos se realizaron en campos de 1000 X. Se evaluaron al menos 10 campos/muestra. Los valores se expresan como medianas. Los rangos se muestran entre paréntesis. * ($p < 0.01$), comparado con el grupo I; ‡ ($p < 0.001$), comparado con el grupo II (test de Wilcoxon).

Intratumoralmente, aunque la administración local de GM-CSF conjuntamente con la crioterapia no tuvo un efecto aditivo sobre el infiltrado que rodea al tumor, el reclutamiento intratumoral (después de 3 y 15 días del tratamiento) resultó significativamente aumentado. Los recuentos de PMN y macrófagos infiltrantes presentes dentro de la masa tumoral no superaron las 34-37 células/campo respectivamente. Pareciera entonces que, en esta región del tumor, la necrosis no presenta la misma potencia de infiltración que peritumoralmente (**Tabla X**).

Por lo tanto, *estos resultados estarían indicando que la adyuvancia local con rmGM-CSF luego de la crioterapia favorecería la infiltración intratumoral.*

(III.4.1) Caracterización por presencia de marcadores característicos de las células infiltrantes

Se investigó la presencia de células Natural Killer (NK) para lo cual se utilizó un anticuerpo monoclonal específico (TM β -1) que reconoce la cadena β del receptor de IL-2 presente en dichas células. A los 3 días de inducida la necrosis, no se observó un aumento significativo de NK en los infiltrados. En la dermis peritumoral de las muestras correspondientes a los grupos criotratados se detectaron tan sólo 35 NK vs. 0-7 NK en los grupos controles. Los valores corresponden al número de células detectadas en 100 campos de 1000X.

En vista de efecto del GM-CSF sobre la maduración y probablemente migración de células dendríticas, se evaluó la posibilidad de encontrar tales células formando parte de los infiltrados. De ser así, estas podrían tomar contacto con las células necróticas y contribuir al desarrollo de una respuesta específica (previo procesamiento y presentación de los antígenos tumorales). También por inmunohistoquímica, se analizó comparativamente la presencia de macrófagos y CDs en las muestras tumorales de los distintos grupos al día 3 post tratamiento (con los anticuerpos F4/80 para macrófagos y DEC-205 para CD) (**Fig. 29**). Así, en los tumores controles de los grupos sin tratamiento o que sólo recibieron una inyección de vehículo, se detectaron escasas

células de Langerhans en la epidermis (**Fig. 28**), y en dermis macrófagos aislados y células DEC-205⁺.

La sola inyección de GM-CSF produjo un aumento del número de células DEC-205⁺ de variada morfología en la capa basal de la epidermis y en la dermis. Los macrófagos se observaron más predominantemente localizados en el área peritumoral. En respuesta a la necrosis, el patrón de positividad para F4/80 cambió notoriamente. No sólo en cuanto al número de células positivas sino en la intensidad de tinción indicando una mayor densidad de antígeno, probablemente atribuible a un estado activado de esta población de macrófagos. Células DEC-205⁺ se encontraron aumentadas en la región de la dermis peritumoral. Cabe destacar que, ocasionalmente, se detectó la presencia de 'clusters' de células DEC-205⁺ - F4/80 negativas dentro de la luz de vénulas dérmicas peritumorales al tejido tumoral necrótico, evidenciando probablemente el tráfico celular que evoca la señal de daño (**Figura 29**).

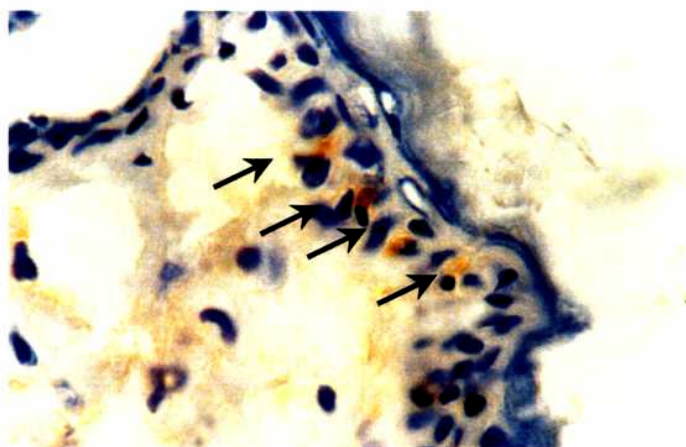


FIGURA 28:
Presencia de
células de
Langerhans
(flechas) en
epidermis
evidenciadas con
el AcM anti
DEC205

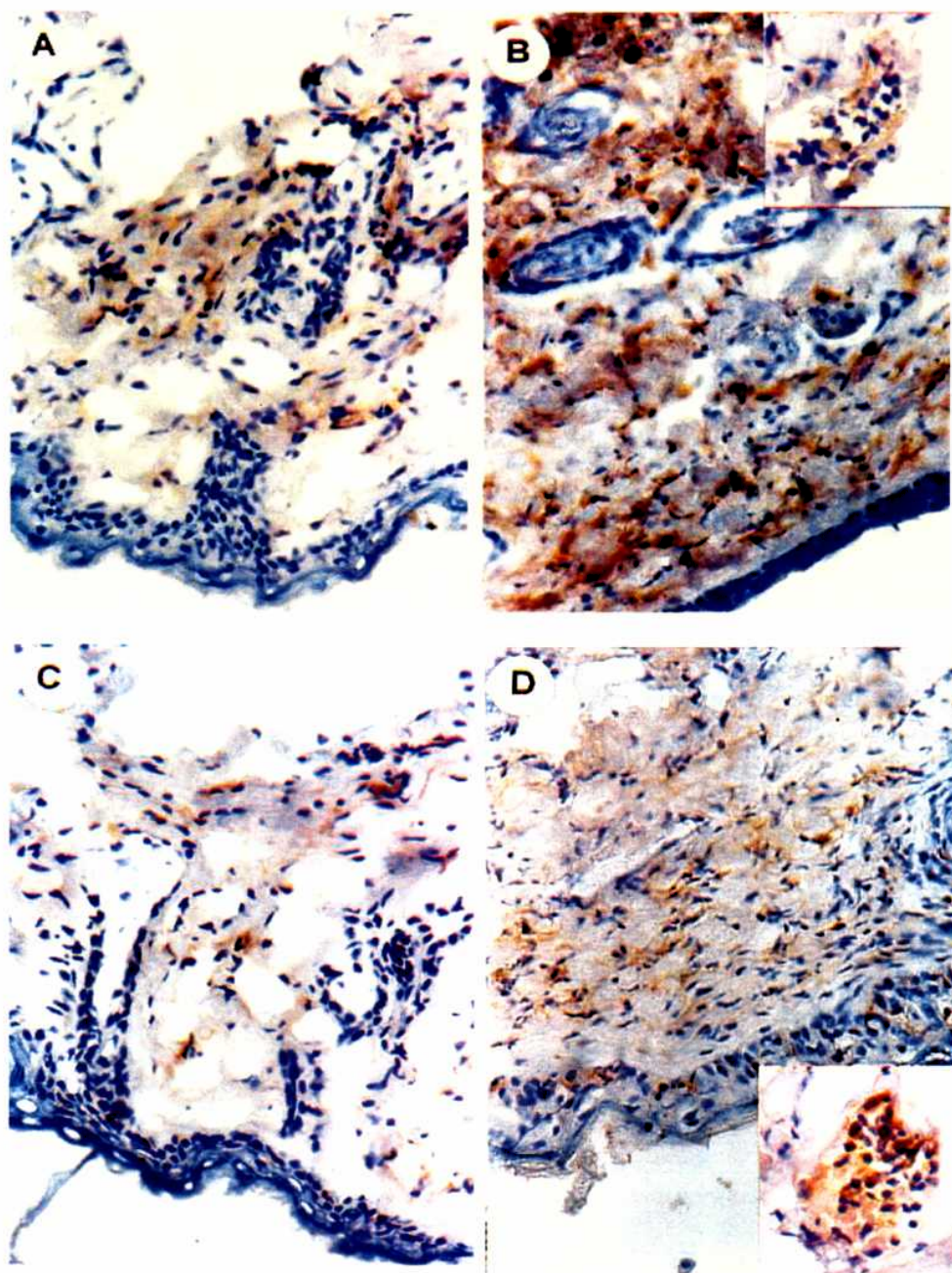
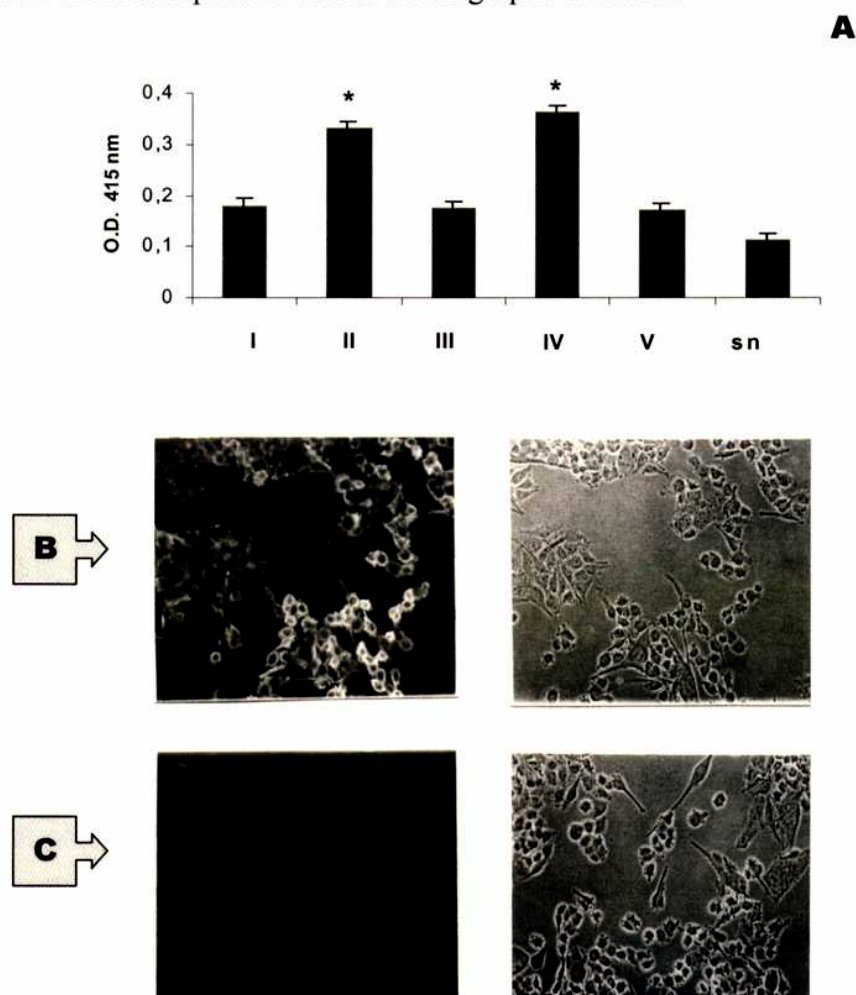


FIGURA 29: (A) Células F4/80 positivas en un tumor representativo del grupo I donde se visualiza escasa presencia de células comparado con (B) tumores correspondientes a los grupos II y IV donde se observa un muy abundante infiltrado de células positivas para este marcador. (C) Escasas células DEC 205 positivas en una sección histológica de tumor representativo del grupo I. (D) Sección tumoral correspondiente a los grupos II y IV con alta densidad de células dendríticas DEC 205 positivas. Inset: Detalle de la misma vénula dérmica con células F4/80 negativas y DEC205 muy positivas en la luz (1000X).

(III.4.2) Respuesta humoral

Para determinar si la crioterapia resulta en la generación de anticuerpos que puedan reconocer las células de melanoma, se evaluó la reactividad de los sueros de los ratones sacrificados a 15 días. Inicialmente, el *screening* de los sueros se efectuó por la técnica de ELISA (**Figura 30 A**). Un aumento significativo de la reactividad respecto al grupo I se observó en 4/10 y 4/12 ratones provenientes del grupo II y IV respectivamente. La inducción de anticuerpos contra las células de melanoma también se confirmó por inmunofluorescencia. El suero normal de ratones no portadores de tumor resultó completamente no reactivo.

Los sueros provenientes de los ratones del grupo II y IV revelaron una reactividad intensificada contra antígenos de superficie (**Figura 30 B y C**) e intracelulares (**Fig 30 D**), cuando se los comparan con la muy débil intensidad de marcación observada para los sueros de los grupos controles.



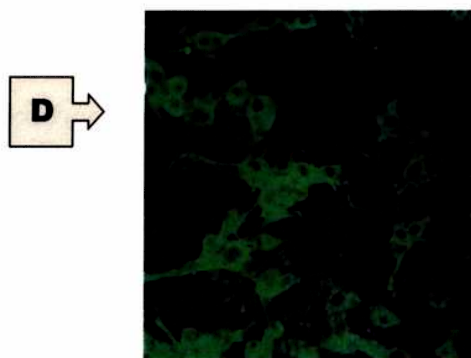


FIGURA 30: (A) Reactividad de los sueros evaluada por ELISA para todos los grupos ensayados, incluyendo suero normal de ratones (sn). * $p < 0.004$, grupos II/IV vs. grupos I, II y V. (B) Imagen de inmunofluorescencia de células IIB-MEL-J utilizando sueros reactivos del grupo IV y la correspondiente al contraste de fases, (C) Idem para sueros del grupo I. Aumento original 200X. (D) Reactividad de los sueros correspondientes al grupo IV sobre células IIB-MEL-J permeabilizadas. Aumento original 400X.

La observación de la formación de anticuerpos en los ratones tratados con criocirugía y no en los controles es **muy relevante** dado que no se encontró reactividad en los sueros de los ratones controles no tratados. Además, los anticuerpos pueden tener un rol en la defensa antitumoral a través de la activación por complemento o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos séricos se utilizó la técnica de inmunodifusión. Los isotipos detectados fueron principalmente IgM e IgG₃. Este último isotipo sólo se encontró aumentado en algunos ratones del grupo criotratado.

La especificidad de los anticuerpos presentes en suero se evaluó por inmunofluorescencia (**Tabla XI**). Los sueros de los ratones tratados con criocirugía (con o sin inyección de GM-CSF) revelan una intensa reactividad contra células IIB-MEL-J, tanto como para IIB-MEL-IAN, IIB-MEL-LES y MCF-7 (dos distintas líneas de melanoma humano y una línea de adenocarcinoma mamario humano, respectivamente). En contraposición, los sueros controles mostraron una débil positividad y los correspondientes a ratones normales no portadores de tumor son totalmente no reactivos (**Tabla XI**). Dado que también se encontró cierta positividad contra linfocitos humanos

y no contra monocitos parecería que, al menos una fracción de los anticuerpos desarrollados, estarían dirigidos contra antígenos humanos normales y vistos por el ratón “nude” como “moléculas no propias”. La inmunoreactividad contra líneas celulares murinas (B16F1, melanoma y 1G11 endotelio murino) fue extremadamente baja y sin diferencias respecto a los controles (**Tabla XI**).

TIPO CELULAR	LÍNEA	PBS	Suero Grupo I	Suero Grupo II	Suero Grupo IV
Melanoma humano	IIB-MEL-J	-	+	+++	+++
Melanoma humano	IIB-MEL-IAN	-	±	+++	+++
Melanoma humano	IIB-MEL-LES	-	+	+++	++
Adenocarcinoma de mama humano	MCF-7	-	+	+++	++
Melanoma murino	B16-F1	-	+	+	+
Células endoteliales microvasculares murinas	1G11	-	±	±	±
Células mononucleares humanas	sangre periférica	-	±	+ / ++ (Li) - (Mo)	+ / ++ (Li) - (Mo)

TABLA XI: Screening de la especificidad de los sueros reactivos de los grupos II y IV realizado por ELISA

Hasta aquí se puede concluir que la estrategia experimental que induce un mayor reclutamiento de células inflamatorias al sitio tumoral resulta ser la criocirugía, generando una señal de peligro a la cual responden células polimorfonucleares y monocito/macrofágicas y células dendríticas. Además la adyuvancia de la aplicación de GM-CSF aumenta el aflujo intratumoral de las mismas.

Por lo tanto, de aquí en más se consideró importante:

- c) ajustar la dosis y concentración de la citoquina GM-CSF inoculada,
- d) analizar el tiempo de permanencia del GM-CSF en el sitio de inyección.

(III.4.3) AJUSTE DE LA DOSIS DE GM-CSF Y ESTUDIO DE SU ESTABILIDAD
EN EL SITIO DE INYECCIÓN.

Dado los efectos positivos de la inyección de GM-CSF en el tumor en cuanto al reclutamiento de células dendríticas y macrófagos al sitio, se decidió ajustar la dosis a inyectar que pudiese aumentar más aún el aflujo de las células mencionadas. Para ello se analizó un rango de concentraciones desde 0 a 100 ng. Se tomaron muestras del sitio de inyección y se analizó la cantidad de células allí presentes (**Tabla XII**).

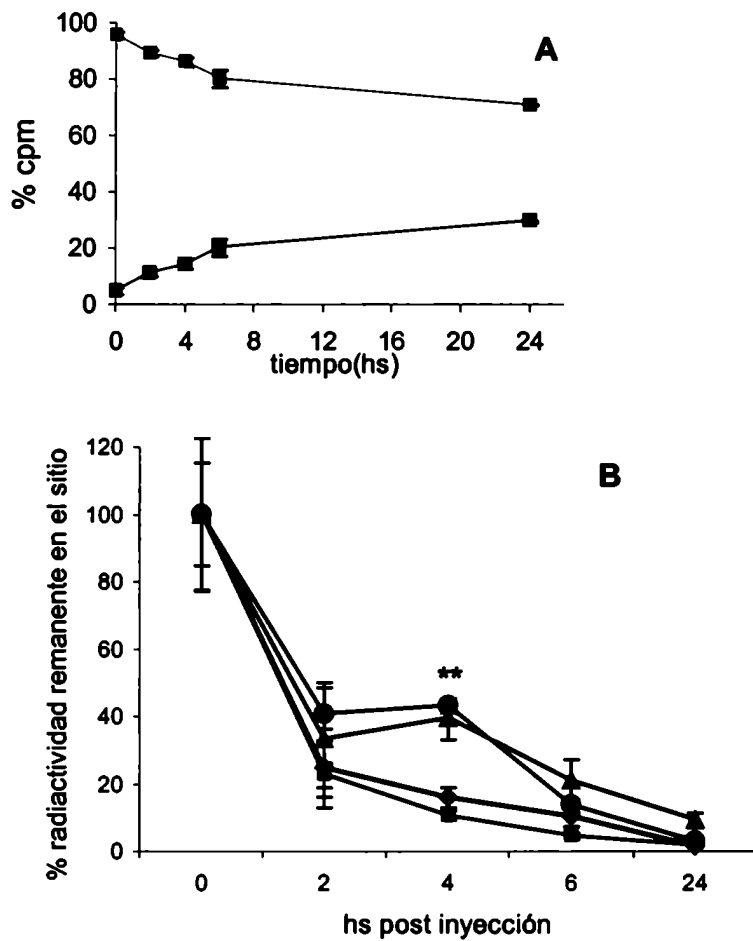
<i>Dosis subcutánea</i>	<i>Células F4/80 positivas</i>	<i>Células DEC205 positivas</i>
0 ng	Escasas, con positividad leve en estroma	Escasas en dermis
4 ng	Aumento (+) del número	Leve aumento (+) en dermis
25 ng	(++) y positividad intraepitelial leve	Leve aumento (+) en dermis
50 ng	(++)	(+)
100 ng	(+++++) en dermis	Aumento (++) intensidad leve

TABLA XII: Efecto sobre el reclutamiento de macrófagos y células dendríticas de la inyección de cantidades crecientes de GM-CSF.

Como se advierte, del rango ensayado, la dosis intratumoral que produce el mejor efecto en términos de reclutamiento de células mononucleares sin efectos adversos visibles en el ratón es de 100 ng. A esta dosis de GM-CSF, se registró un aumento de células caracterizadas como macrófagos y células dendríticas, ubicadas principalmente en forma peritumoral, aunque se advirtieron células F4/80 positivas intra epiteliales con menor representatividad.

Inyectar más de una dosis y lograr cierta persistencia en el sitio de aplicación en un cierto tiempo, son dos variables a considerar cuando el GM-CSF es administrado exógenamente. Este punto es importante teniendo en cuenta que muchos trabajos con enfoques experimentales terapéuticos y/o preventivos apelan a la administración de células tumorales manipuladas para la producción de la citoquina. Por lo tanto, se consideró importante evaluar el tiempo de permanencia del GM-CSF en su forma no degradada en el sitio de inyección. Para ello, se marcó la citoquina con ^{125}I por la técnica de Iodogen (ver Materiales y Métodos) y se inocularon ratones *nude* con 100 ng

de ^{125}I -GM-CSF en el subcutáneo de ratones normales. Dada la posibilidad de desacoplamiento del trazador y la citoquina se evaluó para cada tiempo, la cinética de la marca radiactiva asociada a proteínas (precipitable por tricloroacético, TCA) y la soluble (iodo libre) comparando los perfiles para ambos modos de inyección (Figura 31 A).

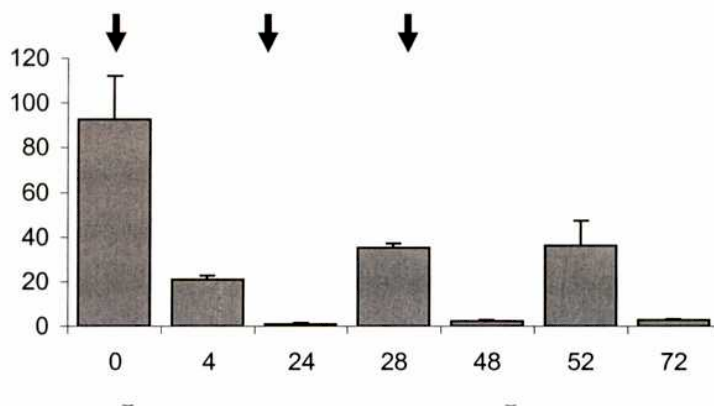


Como se advierte, después de 4 hs, se recupera más de un 80% de cpm TCA-precipitables y se detecta GM-CSF iodinado al menos durante 24 hs. Cabe preguntarse si la cinética de desacoplamiento y/o degradación del ^{125}I -GM-CSF será semejante si la administración fuese intratumoral. (**Figura 31 B**).

El ^{125}I -GM-CSF es eliminado rápidamente del sitio cuando se inyecta subcutáneamente, quedando aproximadamente un 25% a las dos horas post inyección y haciéndose casi cero luego de 24 h. Aunque para la administración intratumoral se ven estas mismas características (rápido descenso a las 2 h. y desaparición total a las 24 h.), la cinética se torna bifásica haciendo que, para tiempos entre las 2 y 4 hs post administración, la concentración local sea más sostenida y particularmente significativa para el punto de 4 h. La implicancia de esta observación es muy importante dado que esta permanencia local del GM-CSF permite un efecto estimulador más sostenido para las putativas células presentadoras de antígenos que se encuentren, arriben o maduren en ese sitio. Aunque luego la concentración disminuye, se ha logrado un efecto local que podría estar asociado al aumento intratumoral en el infiltrado inflamatorio observado en los experimentos con criocirugía + GM-CSF.

Este efecto no se logró reproducir cuando se co-inyectó la citoquina con una suspensión de células tumorales irradiadas, ni tampoco es dependiente de la perfusión vascular del tumor, dado que el perfil cinético para el tumor B16 (más vascularizado que el tumor MEL-J) no presenta diferencias respecto al observado para el tumor IIB-MEL-J (**Fig. 31 B**).

En vista de que la citoquina no es retenida subcutáneamente como sucede en el tumor, se evaluó si se podría lograr un efecto acumulativo en la administración subcutánea adoptando una estrategia de inoculación de más de una dosis de GM-CSF, espaciadas cada 24 h. Como se observa en la **Fig. 32** y acorde con lo antes mencionado, después de cada nueva administración de la citoquina iodinada existe un rápido descenso de la concentración a las 2 h. Sin embargo, y aunque discreto, se advierte un efecto acumulativo local que alcanza valores significativos luego de administradas la segunda y tercera dosis de ^{125}I -GM-CSF (a las 28, 52 y 72 h.).

**FIGURA 32:**

Esquema de tres inyecciones subcutáneas de 125I-GM-CSF administradas a 0, 24 y 48 horas (flechas). A los tiempos indicados se extrajeron los sitios y se procesaron como se detalla en Materiales & Métodos. El gráfico corresponde a uno de dos experimentos realizados.

Por lo tanto, en el caso que la citoquina sea administrada subcutáneamente esto permite definir un esquema de administración de varias dosis de 100 ng GM-CSF espaciadas cada 24 h., con lo cual se consigue una leve acumulación *in situ* ($\approx 36.6\%$ de la dosis inyectada 4 h. después de la inyección de la tercera dosis y un aumento de 2% 24 horas después de inyectada la tercera dosis). Este dato resulta particularmente interesante para su aplicación en estrategias vacunales donde se inyecte la citoquina conjuntamente con antígenos tumorales, ya que esto permitiría favorecer una captación de los antígenos en forma más eficiente.

DISCUSIÓN

La aplicación de radioterapia en melanoma IIB-MEL-J no indujo la llegada de una importante infiltración pero produjo anomalía, gigantismo y vacuolización de las células tumorales previo a la muerte. En cambio, los resultados obtenidos con crioterapia indujeron una mayor infiltración de varios tipos celulares con predominio de PMN y macrófagos. Aquí, el rápido congelamiento y la lenta recuperación de la temperatura es la clave de la destrucción por criocirugía (Orpwood, 1981; Mazur, 1984; Turk, 1999; Zouboulis, 1999], produciendo ruptura de membranas y liberación del contenido celular, lo que estaría comportándose como señales de atracción para las células inflamatorias.

Un análisis cuantitativo detallado de las células infiltrantes demostró que la necrosis inducida por la crioterapia aumentó en forma muy significativa la infiltración peritumoral. Tempranamente, 1,30 h. luego de la aplicación del rocío de nitrógeno líquido, se observó una rápida respuesta de PMN al sitio tumoral, con vasos densamente poblados pero poca extravasación. Luego, cambios morfológicos en las células endoteliales como hiperplasia, aspecto cuboide y protrusión nuclear indicaron un estado activado del endotelio, manifestaciones previamente reportadas por Cotran y Pober [1988]. En consecuencia, asumimos que tal inducción del endotelio, además del daño vascular, estarían favoreciendo la extravasación de las células inflamatorias que se detecta 6.5 hs luego del tratamiento. Los macrófagos se ven reclutados en una densidad muy importante entorno al día 3 post tratamiento y persisten en el sitio tumoral hasta el día 15. Cabe señalar que la temprana llegada de PMN y la posterior aparición de macrófagos reproduce la cinética descrita para fenómenos inflamatorios agudos [Melnicoff, 1989] e incluso a la reacción producida en melanomas luego de tratamientos con TNF- α y melfalán [Nooijen, 1998]. Estas semejanzas sugieren que una vez que la necrosis o daño se establece, los mecanismos inflamatorios son semejantes y la explicación radicaría en el perfil de citoquinas que se libera, siendo un pico de IL-8 y luego de MCP-1, los responsables del reclutamiento de PMN y macrófagos, respectivamente [Sallusto, 1999].

En este mismo modelo, la inyección intratumoral de GM-CSF resultó mejor adyuvante de la respuesta inflamatoria lograda con la crioterapia. Particularmente, de aplicación mejora significativamente la temprana infiltración *intratumoral* de PMN y macrófagos.

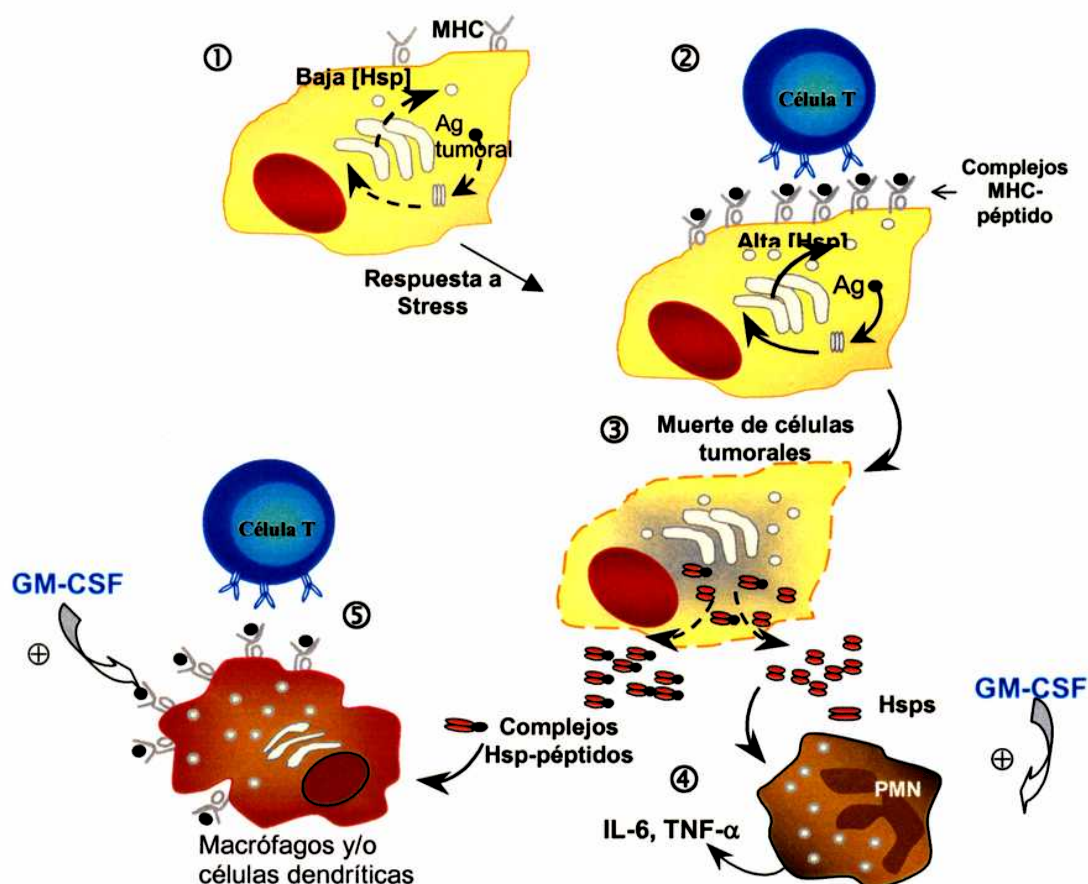
Otro de los puntos analizados fue la respuesta humoral al tratamiento con crioterapia. Considerando que el modelo murino carece de linfocitos T maduros, se considera de importancia el aumento (título 1/25-1/50) de los anticuerpos anti melanoma en 4/10 y 4/12 ratones tratados con crioterapia sólo y con crioterapia más GM-CSF, respectivamente. Esta evidencia permitiría sugerir que la inflamación inducida por la necrosis no transcurre sólo como un fenómeno de respuesta aguda al daño sino que, probablemente, sea entendida como una señal de peligro que - como proponen algunos autores [Sauter 2000]- induciría la llegada y activación de células. Además, los anticuerpos pueden tener una función importante en la respuesta contra células tumorales a través de la activación del complemento o mediante el proceso de ADCC. Es sabido que el tipo de anticuerpos que podrían favorecer estos procesos son anticuerpos del tipo IgG. La existencia de un timo quístico rudimentario en los ratones *nude* [Hsu, 1975] podría dar cuenta de los bajos niveles de IgG2a encontrados ocasionalmente en los sueros de algunos de los animales tratados (datos no mostrados). Principalmente los isotipos preponderantes fueron IgM e IgG3; y en este último caso, el switch de clase es T independiente [Mongini, 1982].

Para que exista una actividad citotóxica mediada por anticuerpos se requiere de anticuerpos específicos. En este modelo de tumores xenotransplantados fue en cierta forma predecible encontrar reactividad contra antígenos humanos normales tanto como contra antígenos tumorales, dado que ambos son “vistos” como “no propios” en el ratón *nude*. Entonces, la infiltración de granulocitos observada y los anticuerpos dirigidos contra las células tumorales podrían contribuir a destruir células tumorales por ADCC. La citotoxicidad hacia las células tumorales sería mayor en presencia del GM-CSF dado que se ha visto que esta citoquina puede preparar a los granulocitos para producir una mayor citotoxicidad (*priming*) [Kushner, 1989].

Según se ha reportado, la muerte celular por necrosis activa señales de stress responsables del reclutamiento de CD, efecto que no logran producir las células viables ni aquellas muertas por procesos apoptóticos [Galluci, 1999]. Más aún, la exposición de CD inmaduras a células necróticas proveen estímulos de maduración, críticos para el desarrollo de una respuesta inmune [Sauter, 2000]. Cabe recordar que las CD inmaduras se caracterizan por su avidez en captar y procesar antígenos, para luego durante la maduración, ganar capacidad presentadora en su tránsito a los ganglios [Banchereau, 1998]. En nuestro enfoque experimental encontramos que cuando se indujo necrosis por criocirugía, se evidenciaron cambios en la cantidad y distribución de las CD reclutadas. La migración de epidermis a capas más profundas de la dermis podrían reflejar la habilidad de estas células de presentar antígenos en su tránsito a los ganglios linfáticos drenantes [Kimber, 2000].

También es importante señalar el incremento en la población de macrófagos y su probable estado activado (sugerido por el aumento en la reactividad del marcador F4/80). Esta evidencia es de relevancia si se considera que no sólo las CD pueden actuar como células presentadoras de antígenos, dado que se ha visto que algunos monocitos inflamatorios pueden transformarse en macrófagos en el tejido subcutáneo, y después de realizar fagocitosis, logran diferenciarse a CD en el ganglio linfático [Randolf, 1999].

Por lo tanto, del daño tumoral, en conjunto con los PMN y macrófagos podría contribuir al establecimiento de una respuesta inmune contra el tumor. Esto sería debido a que, cuando las células tumorales mueren, liberan su contenido intracelular incluyendo proteínas heat-shock, con lo cual se activaría a los PMN circundantes para producir citoquinas proinflamatorias y reclutar células presentadoras. Complejos de proteínas heat-shock con péptidos antigénicos derivados del tumor podrían ser captados por los macrófagos activados y las CD, y a su vez cross-presentados a células T específicas vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (**Esquema**) [Wells, 2000, Bennet, 1997].



Adaptado de Wells 2000

Los resultados obtenidos sobre el efecto adyuvante del GM-CSF en el aflujo de células inflamatorias ubicadas intratumoralmente son interesantes considerando el efecto negativo para el crecimiento tumoral postulado para este tipo de infiltración, y sobre el cual se mencionara previamente (Capítulo II).

Si bien el valor inmunoestimulador de esta citoquina se refuerza gracias al creciente cúmulo de evidencias provenientes de su evaluación experimental y clínica [Dranoff, 1993; Si, 1996; Soiffer, 1998; Nasi, 1999; Klein, 2000], es muy dificultoso extrapolar esquemas y dosis de aplicación entre ambos sistemas: el humano y el experimental murino. Más complejo aún se torna el panorama cuando se tratan de comparar diversas estrategias de administración de la citoquina (intradérmico, como células transducidas o transfectadas para su producción, como plásmidos de expresión, intralesión, etc.). Pero si nos restringimos a la administración intratumoral, una dosis aplicable en humanos (10-80µg/ inyección/sitio tumoral; Nasi, 1999) sería de una gran

toxicidad para el ratón, ya que a tumores de dimensiones similares, habría varios órdenes menos de diferencia en el peso corporal del ratón.

Por ello, se consideró importante ajustar la dosis a administrar para garantizar un efecto positivo en términos de células reclutadas minimizando la toxicidad. Asimismo, las diferencias en el tiempo de retención del GM-CSF según el sitio donde se inyectase, llevó a buscar un esquema de administración que lograra simular el efecto algo mas sostenido observado en el tumor. Así, se encontró un efecto acumulativo tras aplicar tres dosis (una por día) de GM-CSF de 100 ng. De esta manera se lograría un microambiente estimulador más propicio para que las células presentadoras tengan chances de reconocer los antígenos liberados durante la necrosis o infundidos exógenamente, y puedan ser captarlos para migrar a los ganglios regionales para realizar la presentación antigénica.

Actualmente se dispone en el laboratorio de un modelo de vacuna anti melanoma donde la administración de células irradiadas en presencia de GM-CSF, más subsecuentes refuerzos de la citoquina en el sitio vacunal, mejoran su valor protector si se compara con la administración de sólo células tumorales. Asimismo, existen experimentos en marcha tendientes a evaluar los beneficios en la protección que pueda aportar la incorporación de células necróticas a este esquema vacunal.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis se ha centrado en estudiar la relación entre CE y células inflamatorias y el papel de la vascularización en el desarrollo tumoral, así como la evaluación del efecto de citoquinas como el GM-CSF y MCP-1 en la modulación del infiltrado inflamatorio en el tumor.

De los resultados presentados y discutidos en los capítulos precedentes pueden extraerse las siguientes conclusiones:

Se ha logrado una reproducible y clara inmunodetección de la presencia de la neovascularización tumoral en tumores mamarios murinos mediante la utilización del AcM MEC13.3, dirigido contra la molécula de adhesión CD31. El patrón angiogénico en estos tumores guardó relación con la tasa de crecimiento y el potencial metastásico. Esto implica disponer de una herramienta que **permite evaluar el comportamiento del tumor como indicador pronóstico a semejanza de lo observado en humanos**. Además se describió la presencia de células aisladas inmunoreactivas para CD31 que podrían estar relacionadas al establecimiento de la red vascular dado que presentaron una cinética inversa al desarrollo angiogénico.

El AcM antes mencionado permitió el aislamiento de CE microvasculares, lográndose el **establecimiento de una línea de CE murina derivada de tejido renal, REC-A4, que es la primera en su tipo para el modelo murino**. REC-A4 fue positiva para CD31 y otras moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y ELAM-1, presentó expresión de vWf, captación de partículas de LDL acetilado y sensibilidad a Shigatoxina-1 (13-20%). Esta susceptibilidad puede potenciarse en presencia de estímulos proinflamatorios, rasgo que explicaría la particular sensibilidad del endotelio renal al daño por la toxina en el Síndrome Urémico Hemolítico. **Las diferencias encontradas entre REC-A4 y la línea microvascular de pulmón utilizada como referencia en cuanto a la positividad para ELAM-1, VE-caderina y en la respuesta a Shigatoxina contribuye a comprender las diferencias locales de los endotelios de distintos tejidos.**

A través del estudio de melanomas metastásicos humanos, se determinó **que la quemoquina está presente en el 100% de las biopsias analizadas**. El porcentaje de células positivas para MCP-1 y su grado de expresión son variables pero se advierte que sólo aquellos tumores con el 100% de sus células positivas son los más intensamente reactivos para MCP-1. **La vascularización se correlacionó positivamente con la intensidad de expresión de MCP-1.**

La importante presencia de macrófagos infiltrantes dentro del tumor se encontró particularmente asociada a áreas de gran densidad microvascular pero no asociado a estructuras vasculares de gran calibre. Esta evidencia sugiere cierta asociación ya sea como consecuencia de la acción angiogénica de tales macrófagos, o debido a que revelan la vía de extravasación al tumor frente al estímulo quimioattractante que éste produce.

La transfección de la línea de melanoma humano IIB-MEL-J para la producción de MCP-1 produjo células con un fenotipo caracterizados por su menor tamaño, menor adhesión al endotelio y mayor capacidad migratoria frente a medios condicionados ricos en componentes de matriz extracelular, lo que podría estar evidenciando efectos regulatorios de MCP-1 sobre ciertas moléculas de adhesión del tipo integrinas o algunas otras proteínas relacionadas a la migración y adhesión.

Los tumores producidos por la línea productora de MCP-1 presentaron una infiltración significativa de macrófagos ubicados tanto peritumoralmente como intratumoralmente, algunos de los cuales presentaron signos de activación como la presencia de melanina y gran actividad en sus citoplasmas. Sin embargo, **la tumorigenicidad in vivo es semejante a la de la línea parental.** Estos hechos sugieren **la ausencia de una respuesta efectora antitumoral importante en este sistema.** Resulta ser, por lo tanto, un modelo interesante para intervenir exógenamente de manera de conseguir un aumento de la actividad contra el tumor.

La inducción de necrosis por crioterapia de melanomas humanos transplantados en ratones *nude* produjo eventos tempranos como congestión, edema y activación de CE.

La **extravasación de PMN** al sitio del tumor comenzó rápidamente, haciendo un pico a los 3 días post-tratamiento y **la llegada de macrófagos** fue máxima en torno al día 7 persistiendo hasta el final del período de observación (15 días).

El reclutamiento inflamatorio evocado por la necrosis produjo un importante infiltrado peritumoral en todos los grupos criotratados. Los datos obtenidos de las inmunohistoquímicas para marcadores específicos revelaron un aumento muy importante de células reactivas para F4/80 y DEC205. Particularmente, **las células DEC205+, escasas en la epidermis de los animales controles, aumentaron su representatividad en zonas de la dermis próximas al tumor luego del tratamiento.**

La adyuvancia con GM-CSF, en una única dosis 24h. después de la crioterapia, condujo a un aumento significativo del aflujo de PMN y macrófagos intratumorales.

A través del estudio de la estabilidad del **GM-CSF iodinado se determinó que la citoquina desaparece rápidamente después de su inyección subcutánea,** permaneciendo aproximadamente un 10% de las dosis inyectadas a las 4 h. y un 0.76% a las 24 h. La desaparición de esta citoquina administrada **intratumoralmente** presenta una curva bifásica y **a las 4 h. se advierte una retención significativamente mayor** (aproximadamente del 40%) del GM-CSF inicialmente inyectado. Este efecto no se reproduce al inyectar la citoquina conjuntamente con una suspensión de células tumorales.

La permanencia local del GM-CSF administrado intratumoralmente fue cuatro veces superior que si se administrase en forma subcutánea. Este efecto más sostenido redundaría en un estímulo funcional para las células presentadoras de antígenos que se encuentren, arriben o se diferencien en el sitio. Asimismo, **podría explicar el aumento de células infiltrantes intratumorales observados en los experimentos de inducción de necrosis por crioterapia y GM-CSF.**

Aplicando un esquema de inyección de varias dosis espaciadas cada 24 h para administraciones subcutáneas, se consiguió producir un efecto acumulativo.

Aunque modesto, este efecto reviste cierto interés al momento de implementar el uso de GM-CSF como adyuvante en esquemas vacunales.

Además, cabe destacar que este trabajo de Tesis contribuye con:

- (a) La obtención de la primera línea microvascular renal de origen murino, importante para el estudio de procesos fisiopatológicos que involucran CE tejido-específicas.**
- (b) El desarrollo de un modelo de estudio del melanoma humano productor de MCP-1 , modelo que resulta interesante para evaluar el rol de los macrófagos y los efectos regulatorios que induciría la expresión de la quemoquina en la biología de la célula del melanoma.**
- (c) Una estrategia experimental para promover -mediante una señal de peligro aguda- la llegada de células presentadoras de antígenos al tumor y un esquema de administración para GM-CSF que resulta adyuvante para el reclutamiento intratumoral y peritumoral de células inflamatorias al tumor.**

ABREVIATURAS

AcM:	anticuerpo monoclonal
ADCC:	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
CD:	células dendríticas
CE:	células endoteliales
cpm:	cuentas por minuto
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECGS:	factor de suplemento endotelial (endothelial cell growth supplement)
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
FBS:	suero fetal bovino
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF :	factor estimulador de colonias granulocito-macrofágicas
GM-CSF:	factor estimulante de colonias granulocito-macrofágicas
HBSS:	solución salina balanceada (Hank's balanced salt solution)
HUVEC:	células endoteliales de cordón umbilical
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ :	interferón gamma
JAM :	junctional adhesion molecule
LAM-1:	leukocyte adhesion molecule 1
LDL:	lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins)
LPS:	lipopolisacáridos bacterianos
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein 1
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
MTT:	3(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NK:	células natural killers
PBS:	buffer fosfato salino
PECAM-1:	platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-I
PMN:	linfocitos polimorfonucleares
QS21:	saponina de <i>Quillaja saponaria</i> Molina
REC:	células endoteliales renales (renal endothelial cells)
REG:	retículo endoplasmático granular
REL:	retículo endoplasmático liso
sbn:	sobrenadante
Stx-1:	Shigatoxina-1
TADC:	tumor-associated dendritic cells
TAM:	tumor-associated macrophages
TNF- α :	factor de necrosis tumoral
VCAM-1:	vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4:	very late activation antigen-4
vWF:	factor de von Willebrand

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFIA

- Alessandri G**, Chirivi RS, Castellani P, Nicoló G, Giavazzi R, Zardi L (1998). Isolation and characterization of human tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronectin. *Lab Invest* 78 (1): 127- 128.
- Alessandri G**, Cornagli-Ferraris P, Gullino PM (1997). Angiogenic and angiostatic microenvironment in tumors-role of gangliosides. *Acta Oncol.* 36(4): 383-7.
- Allavena P**, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A (2000). The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev.* 177:141-9. Review.
- Allport JR**, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW (1997). Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med* 197 Aug 18;186(4):517-27
- Alon R**, Feizi T, Yuen CT, Fuhlbrigge RC, Springer TA.J (1995). Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *Immunol*, May 15;154 (10):5356-66
- Arbus GS** (1997). Association of verotoxin-producing E. Coli and verotoxin with hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl* 58: S91-96.
- Asahara T**, Murohara t, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Scatteman G (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967.
- Augustin HG**, Kozian DH and Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 16 (12): 901.
- Baggiolini M** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 9;392 (6676):565-8.
- Baldwin GC**, Gasson JC, Kaufman SE, et al. Nonhaematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood* 1989; 73: 1033-7.
- Balkwill F** and Mantovani A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet* 257, 17.
- Ballaré C**, Barrio M, Portela P, Mordoh J: Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 41:15-22, 1995.
- Barkai N** and Leibler S (1997). Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 26; 387(6636):913-7.
- Bazan JF**, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 13;385 (6617):640-4.
- Benelli R**, Morini M, Crrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, Cassatella M, Noonan DM, Albini A (2002). Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J* Feb 16 (2):267-9.
- Bennett SR**, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, and Heath WR: Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186: 65-70, 1997.
- Berger AC**, Tang G, Alexander HR, Libutti SK (2000). Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived cytokine that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. *J Immunother.*23(5):519-27. Review.
- Boegehold MA** (1998). Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7 (1): 71-78.
- Bolontrade M**, Rong-Rong Zhou and Kleinerman E (2002). Vasculogenesis plays a role in the growth of Ewing's sarcoma in vivo. *Clin Cancer Res* 8, 3622-3627.
- Botazzi B**, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A (1992). Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol* 148: 1280-1285.
- Bover L**, Barrio M, Slavutsky I, Bravo AI, Quintans C, Bagnati A, Lema B, Schiaffi J, Yomha R, Mordoh J (1991). Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res Treat* 19(1):47-56.

- Brem SS, Jensen HM, Gullino PM** (1978). Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer Jan*; 41(1):239-44.
- Brockner EB, Zwadio G, Halzmann B, Macher E, Song C** (1988). Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int J Cancer* 41: 562-567.
- Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi E, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, Mantovani A** (1991). In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest*.87(3): 986-95.
- Burgess A, Camakaris J, Metcalf D**: Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem* 252 (6):1998-2003, 1977.
- Campbell JJ, Butcher EC** (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12(3):336-341.
- Cannistra StA, Vellenga E, Groshek P, Rambaldi A, Griffin JD**. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism. *Blood* 1988; 71 (3):672-6.
- Capurro M, Bover L, Portela P, Livingston P, and Mordoh J**: FC-2.15, a monoclonal antibody active against human breast cancer, specifically recognizes Lewis^x hapten. *Cancer Immunol Immunother* 45:334-339, 1998
- Cha JK, Jeong MH, Bae HR, Han JY, Jeong SJ, Jin HJ, Lim YJ, Kim SH, Kim JW** (2000). Activated platelets induce secretion of interleukin-1beta, monocyte chemotactic protein-1, and macrophage inflammatory protein-1alpha and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured endothelial cells. *J Korean Med Sci* 15 (3):273-8.
- Chaplain MA and Stuart AM** (1991). A mathematical model for the diffusion of tumour angiogenesis factor into the surrounding host tissue. *IMA J Math Appl Med Biol.* 8(3): 191-220
- Chen CF, Li S, Zhong Z, et al**. Association of BRCA1 with the hRad50. *Science* 1999;285:747.
- Christofori G, Semb H**. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:73.
- Clynes R., Takechi Y., Moroi Y., Houghton A. and Ravetch J.V**: Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:652-656, 1998.
- Collins RG, Jung U, Ramirez M, Bullard DC, Hicks MJ, Smith CW, Ley K, Beaudet AL** (2001). Dermal and pulmonary inflammatory disease in E-selectin and P-selectin double-null mice is reduced in triple-selectin-null mice. *Blood* 1;98(3):727-35
- Coradini D, Pellizzaro C, Veneroni S, Ventura L, Daidone MG** (2002). Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Br J Cancer* Nov 4;87(10):1105-11.
- Cotran RS, and Pober JS**: Endothelial activation. Its role in inflammatory and immune reactions. In: N. Simionescu and M. Simionescu (eds.), *Endothelial cell biology*, pp. 335-347, Plenum, New York (1988).
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, et al** (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490.
- Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC** (1998) Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res* 55: 65-76
- Crombie IK** (1981). Distribution of malignant melanoma on the body surface. *Br J Cancer* 43(6):842-9.
- Cullen KJ, Lippman ME**. Stromal-epithelial interactions in breast cancer. In: Lippman ME, Dickson RB, eds. *Genes, oncogenes and hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1992:413.
- Dalgleish AG, O'Byrne KJ** (2002). Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Adv Cancer Res.* 84:231-76.
- Davis TA, Monroy RL, Skelly RR, Donahue RE, Macvittie TJ**. Differential augmentation of in vivo natural killer cytotoxicity in normal primates with recombinant human interleukin-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 436-42.
- De Michele A, Weber BL**. Inherited genetic factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the breast*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:221
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM.** (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol.*151: 671.

- Devereux S, BullHA, Campos Costa D, Saib R, Linch DC.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced changes in cellular adhesion molecule expression and adhesion to endothelium: in vitro and in vivo studies in man. *Br J Haematol* 1989; 71: 323-30.
- Dezso B, Haas G, Hamzavi F, Kim S, montecillo E, Benson P, Edson Pontes J, Maughan R, Hillman G (1996).** The mechanism of local tumor irradiation combined with IL-2 therapy in murine renal carcinoma: histological evaluation of pulmonary metastases. *Clin Cancer Res* 2: 1543-1552.
- Diloo D, Bacon K, Holden W, et al (1996).** Combined chemokine and cytokine gene transfer enhance antitumor immunity. *Nat Med* 2: 1090-1095.
- Djonov V, Cresto N, Aebersold DM, Burri PH, Altermatt HJ, Hristic M, Berclaz G, Ziemiecki A, Andres AC (2002).** Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *Int J Oncol* 21 (1): 25-30.
- Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, De Calmanovici RW, Martin-Padura I, Breviario F, Garlanda C, Ramponi S, Mantovani A, Vecchi A (1997).** A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(8):1599-604.
- Dranoff G, Jaffee A, Lazenby P, Golumbeck H, Levistky K, Brose V, Jackson H, Pardoll D, Mulligan C:** Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific and long-lasting antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3539, 1993.
- Elliot JM, Vadas AM, Cleland LG, Gamble JR, Lopez AF.** IL-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulate two distinct phases of adhesion in human monocytes. *J Immunol* 1990; 145: 167-76.
- Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M. (2000).** Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived cytokine that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. *J Immunother* 23(5):519-27. Review.
- Fearon ER (1997).** Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278(5340): 1043-50.
- Fernández GC, Rubel C, Dran G, Gómez S, Isturiz MA, Palermo MS (2000).** Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Immunol* 95 (3):227-234.
- Fernández GC, Rubel C, Dran G, Gómez S, Isturiz MA, Palermo MS (2000).** Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clinical Immunol* 95 (3): 227-234.
- Fernández Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsasser HP, Muller R, Havemann K (2000).** Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 65 (5): 287-300.
- Fidler IJ (1975).** Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 35: 218-224.
- Fleischman J, Golde DW, Wisbart RH, Gasson JC.** Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1988; 68: 408-11.
- Folkman J (1985).** Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175-203. Review
- Folkman J (1995).** Clinical application of research on angiogenesis. *New Engl J Med* 333: 1757-1763.
- Folkman J and Hanahan D. (1991).** Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* 22: 339-347. Review
- Folkman J. (1971).** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* Nov 18; 285 (21): 1182-6. Review.
- Folkman, J (1995).** "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease", *Nature Medicine* 1(1): 27-31.
- Fraser HM, Lunn SF (2000).** Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull.* 56(3):787-97. Review.
- Fushimi T, Kojima A, Moore MA, Crystal RG (2000).** Macrophage inflammatory protein 3 α transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. *J Clin Invest* 105(10):1383-93.

- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P:** Natural adjuvants: endogenous activator of dendritic cells. *Nat Med* 5 (11):1249-1255, 1999.
- Garlanda C, Dejana E (1997)** Heterogeneity of endothelial cells. Specific Markers. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 17: 1193-1202.
- Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, De Rossi M, Wainstok de Calmanovici R, Carozzi F, Bussolino F, Colotta F, Mantovani A, Vecchi A (1994).** Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15):7291-7295.
- Geneser F.** Aparato Circulatorio In: *Histologia* 3rd edition, Chapter 15,ed Panamericana, pp 377-389
- Grabbe S, Kämpgen E and Schuler G (2000).** Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today* 21 (9): 431-433.
- Graves DT, Barnhill R, Galanopoulos T and Antoniadis HN (1992).** Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo. *Am J. Pathol* 140: 9.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo P (2000).** Cancer Statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 50: 7.
- Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ (2000).** Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404: 407-411.
- Guerra L, Mordoh J, Slavutsky I, Larripa I, Medrano EE (1989).** Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line. *Pigment Cell Res* 2(6):504-9.
- Gullino PM (1992).** Microenvironment and angiogenic response. *EXS.* 1992;61:125-8. Review.
- Gumkowski FG, Kamiska G, Kaminski M, Morissey LW, Auerbach R (1985)** Heterogeneity of mouse vascular endothelium. In vitro studies using lymphatic, large vessels and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels* 2: 11-23.
- Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, Charoenvit Y, Baumgartne R, Kumar S, Hoffman SL, Weiss WR (2000).** Plasmid vaccine expressing granulocyte- macrophage colony stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles. *J Immunol* 165: 3772-81.
- Hanahan D and Folkman J (1996).** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, Aug 9, 86, 353-364.
- Hartwell L (1997).** Theoretical biology. A robust view of biochemical pathways. *Nature* 26;387(6636):855, 857
- Hernberg M, Turunen J, Muhonen T, Pyrhönen S:** Tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother* 20: 488-495, 1997.
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD (1999)** New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 20, 18, 5356-53-62.
- Holthofer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I (1985).** Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest* 50: 552-559.
- Hsu CK, Whitney RA, Hansen CT:** Thymuslike lymph node in nude mice. *Nature* 257:681-682, 1975
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H:** Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264(5161):961-965, 1994.
- Hughes AK, Ergonul Z, Stricklett PK, Kohan DE (2002).** Molecular basis for high cells sensitivity to the cytotoxic effect of shigatoxin-1: upregulation of globotriaosylceramide expression. *J Am Soc Nephrol* 13 (9): 2239-2245
- Inaba K, Inaba M., Deguchi M et al. (1993).** Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc.Natl.Acad. Sci USA* 90: 3038-42.
- Jaffe EA (1987).** Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 18 (3):234-239.
- Jain, R. K., G. C. Koenig, M. Dellian, D. Fukumura, L. L. Munn, and R. J. Melder (1996).** Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer and Metastasis Reviews* 15(2): 195-204.

- Jiang Y, Beller D, Frendl G, Graves D (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 148 (8): 2423-2428.
- Juliano RL, Haskill S (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120: 577
- Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K (1998). Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* 1998 Oct 15;102(8):1526-33
- Kairiyama C, Slavutsky I, Larripa I, Morvillo V, Bravo AI, Bover L, Podhajcer OL, Mordoh J. (1995). Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Res* 8(3):121-31.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 25;266 (5189):1395-9.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 25;266 (5189):1395-9.
- Kennedy LJ and Weissman I (1971). Dual origin of intimal cells in cardiac-allograft arteriosclerosis. *N Engl J Med* 285: 884-887.
- Kielian T, Nagai E, Ikubo A, Rasmussen CA, Suzuki T (1999). Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor released by adenovirally transduced CT26 cells leads to the local expression of macrophage inflammatory protein 1 alpha and accumulation of dendritic cells at vaccination sites in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 48:123-131.
- Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Bhushan M, Griffiths CEM: Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *British J Dermatol* 142: 401-412, 2000.
- Klein C, Bueler H, Mulligan RC: Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 191 (10): 1699-1708, 2000.
- Kleinerman ES, Knowles RD, Lachman LB, Guttermna JU. Effect of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor on human monocyte activity in vitro and following intravenous administration. *Cancer Res* 1988; 48: 2604-9.
- Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K.(2000). Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* 15;164(6):3301-8.
- Kunz M, Toksoy A, Goebeler M, Engelhart E, Broker EB, Gillitzer R (1999). Strong expression of the lymphoattractant CXC chemokine Mig is associated with a heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma *J Pathol* 189; 552-559.
- Kushner BH, Cheung NK: GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* 73 (7): 1936-1941, 1989.
- Lafranie RM, Buchanan MR, Orr FW (1993). Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. *Cell Biophys* 23, 3-89.
- Lanari C, Montecchia MF, Pazos P, Simian M, Vanzulli S, Lamb C, Molinolo AA (1997). Progesterin-induced mammary adenocarcinomas in BALB/c mice. Progression from hormone-dependent to autonomous tumors. *Medicina (B Aires)* 57 Suppl 2:55-69.
- Laning J, Kawasaki H, Tanaka E, Luo Y and Dorf ME (1994). Inhibition in vivo of tumor growth by the beta chemokine, TCA3. *J Immunol* 153: 4625-4635.
- Landthaler M, Braun-Falco O. (1979). Familial-hereditary malignant melanoma. *Med Klin* 74(10):353-7.
- Lanzavecchia A (1998). Licence to kill. *Nature* 393, 413-414.
- Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, Ley K (1997). Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol* 10;136(3):717-27
- Lawrence MB, Springer TA. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 31;65(5):859-73.
- Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulsom R (1998). Invasive lobular and invasive ductal carcinomas of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol* 185(4):394-401.
- Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE (1998). Necrosis correlates with high vascular intensity and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79: 991-995.

- Levine HA**, Pamuk s, Sleeman BD, Nilsen-Hamilton M (2001). Mathematical modeling of capillary formation and development in tumor angiogenesis: penetration into the stroma. *Bull Math Biol.* 63(5):801-63
- Lewis WH** (1922). Endothelium in tissue culture. *Am J Anat* 30:39-59.
- Liao F**, Ali J, Greene T and Muller WA. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 1997 185:1349.
- Liaw D**, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genet* 1997; 16: 64.
- Lidington EA**, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML (1999). A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol* 7 (4): 239-246.
- Liesveld JL**, Abboud CN, Looney RJ, et al. Expression of Ig G Fc receptors in myeloid leukaemic cell lines. Effect of colony-stimulating factors and cytokines. *J Immunol* 1988; 140: 1527.
- Louise CB**, Tran MC, Obrig TC (1997). Sensitization of human umbilical vein endothelial cells to shiga toxin: involvement of protein kinase C and NF kappa B. *Infect Immun* 65: 3337-3344.
- Lu B**, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1- deficient mice. *J Exp Med* 187: 601-608.
- Lyden D**, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7(11):1194-201.
- Mac Micking J**, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 15: 323-350.
- Maciag T** (1979) ECGS. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76: 56-74.
- Maisonpierre PC**, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) *Science.* 277,55-60.
- Malkin D**, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233.
- Manconi F**, Markham R, Fraser I (2000). Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Meth in Cell Sci* 22: 89-99.
- Manome Y**, Wen PY, Hershowitz A, Tanaka T, Rollins BJ, Kufe DW, Fine HA (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene transduction: an effective tumor vaccine strategy for non-intracranial tumors. *Cancer Immunol Immunother* 41 (4): 227-235.
- Mantovani A** (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 30 (6): 254-257.
- Mantovani A**, Allavena P, Vecchi A, Sozzani S (1998). Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses. *Int J Clin Lab Res* 1998;28(2):77-82.
- Mantovani A**, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13:265-270.
- Mantovani A**, Bussolino F, Introna M (1997). Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 18, 5: 231.
- Maruyama Y** (1973). The human endothelial cells in tissue culture. *Am J Anat* 30: 39-59.
- Massi D**, Franchi A, Borgognoli L, Paglierani M, Reali UM, Santucci M (2002). Tumor angiogenesis as a prognostic factor in thick cutaneous malignant melanoma. A quantitative morphological analysis. *Virchows Arch Jan*, 440 (1): 22-28.
- Mastrangelo MJ**, Sulit HL, Prehn L, Bornstein RS, Yarbro JW, Prehn RT (1976). Intralesional BCG in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer* 37: 684-692.
- Maus U**, Henning S, Wenschuh H, Mayer K, Seeger W, Lohmeyer J (2002). Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (6): H2584-91.
- Mayer P**, Lam C, Obenaus H, Liehl E, Besemer J. Recombinant human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in non-human primates. *Blood* 1987; 70: 206-13.

- Mazur P** (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *AMC. J Physiol* 247:125-142.
- Melnicoff MJ**, et al (1989). Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation. Requirement for neutrophils. *Lab Invest* 59, 200-213.
- Mensing H**, Albin A, Krieg T y col (1984). Enhanced chemotaxis of tumor-derived and virus-transformed cells to fibronectin and fibroblast-conditioned medium. *Int J Cancer* 33, 43.
- Metcalf D** (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 67:257-267.
- Milici AJ**, Furie MB and Carley WW (1985). The formation of fenestration and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6181.
- Milstone DS**, Fukumura D, Padgett RC, O'Donnell PE, Davis VM, Benavidez OJ, Monsky WL, Melder RJ, Jain RK, Gimbrone MA Jr (1998). Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation* 5(2-3):153-71.
- Mongini PK**, Paul WE, Metcalf ES (1982). T cell regulation of immunoglobulin class expression in the antibody response to trinitrophenyl-ficoll. Evidence for T cell enhancement of the immunoglobulin class switch. *J Exp Med* 155(3): 884-902.
- Montesano R.**, S. Kumar L, Orci, and M. S. Pepper (1996). Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. *Laboratory Investigation* 75(2): 249-262.
- Morigi M**, Micheletti G, Figliuzzi M, Imberti B, Karmali M, Remuzzi A, Remuzzi G, Zoja C (1995). Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood* 86 (12): 4553-4558.
- Morrissey PJ**, Bressler L, Charrier K, Alpert A (1998). A response of resident murine peritoneal macrophages to in vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 140, 1910.
- Morrissey PJ**, Bressler L, Park LS, Alpert A, Gillis S (1987). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *J Immunol* 139: 1113-9.
- Morvillo V**, Bover L, Mordoh J (1996). Identification and characterization of 14 kDa immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-L, a human melanoma cell line. *Cell Molec Biol* 42:779-795.
- Mule JJ**, et al. (1996). RANTES secretion by gene modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cells subpopulations. *Hum Gen Ther* 7: 1545-1553.
- Muller WA** (1995). The use of anti-PECAM reagents in the control of inflammation Agents Actions Suppl 46:147-57.
- Muller WA** (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response.. *Lab Invest* 82(5): 521-34.
- Muller WA**, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 193 Aug 1;178(2):449-60.
- Murakami S**, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Oite T (2001). Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 62 (3): 383-391.
- Murray AB** (1987). Weibel Pallade bodies are not reliable ultrastructural markers for mouse endothelial cells. *Lab Anim Sci* 37: 483-485.
- Nagai E**, Ogawa T, Kielian T, Ikubo A, Suzuki T (1998). Irradiated tumor cells adenovirally engineered to secrete granulocyte-macrophage colony stimulating factor established antitumor immunity and eliminate pre-existing tumors in syngeneic mice. *Cancer Immunol Immunother* 47: 72-80.
- Nakashima E**, Kabota Y, Matsushita R, Ozaki E, Ichimura F, Kawahara S, Nakanishi I, Kuno K, Matsushima K (1998). Synergistic antitumor interaction of human monocyte chemoattractant protein-1 gene transfer and modulator for tumor-infiltrating macrophages. *Pharm Res* 15 (5): 685-689.
- Nakopoulou L**, Lekkas N, Lazaris AC, Athanassiadou P, Giannopoulou I, Mavrommatis J, Davaris P (1999). An immunohistochemical analysis of angiogenesis in invasive breast cancer with correlations to clinicopathologic predictors. *Anticancer Res* 19(5C):4547-53.

- Naruse K**, Fujieda M, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Fukui T, Kuroda N, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H (2000). An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. *Kidney Int* 57 (5): 1836-1846.
- Nasi ML**, Lieberman P, Busam KJ, Prieto V, Panageas KS, Lewis JJ, Houghton AN, Chapman PB: Intradermal injections of granulocyte-macrophage colony –stimulating factor (GM-CSF) in patients with metastatic melanoma recruits dendritic cells. *Cytokines Cell Mol Ther* 5 (3): 139-144, 1999.
- Negus RPK**, Stamp GWQ, Hadley J, Balkwill FR (1997). Quantitative assessment of leukocyte infiltrates in ovarian cancer and its relationship to the expression of CC chemokines. *Am J Pathol* 150: 1723-1734.
- Nesbit M**, Schaidt H, Miller TH, Herlyn M (2001). Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 166: 6483-6490.
- Neumark E**, Anavi R, Wittz IP and Ben Baruch A (1999). MCP-1 expression as a potential contributor to the high malignancy phenotype of murine mammary adenocarcinoma cells. *Immunol Lett* 68, 141-146.
- Newman PJ** (1997). The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.* 99:3.
- Nokihara H**, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Tsuruo T and Sone S (1999). Monocyte chemotactic cytokine gene modification of multidrug-resistant human lung cancer enhances antimetastatic effect of therapy with anti-P-glycoprotein antibody in SCID mice. *Int J Cancer* 80: 773-780.
- Nooijen P**, Eggermont A, Schalkwijk L, Henzen-Logmans S, de Waal R, Ruiter D (1998). Complete response of melanoma-in-transit metastasis after isolated limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and melphalan without massive tumor necrosis: a clinical and histopathological study of the delayed-type reaction pattern. *Cancer Res* 58:4880-4887.
- Obrig TG** Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Barley-Maloney L, Daniel TO (1993). Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem*, 268 (21): 15484-15488.
- Obrig TG**, Del Vecchio PJ, Brown JE, Moran TP, Rowland BM, Judge TK, Rothman SW (1988). Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 56(9): 2373-8.
- Ohmi K**, Kiyokawa N, Takeda T, Fujimoto J (1998). Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 137-141.
- Orlidge A**, D'Amore PA (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol. Sep*;105(3):1455-62.
- Orme ME**, Chaplain MA (1996). A mathematical model of the first steps of tumour-related angiogenesis: capillary sprout formation and secondary branching. *IMA J Math Appl Med Biol.* 13(2):73-98.
- Orpwood RD**: Biophysical and engineering aspects of cryosurgery. *Phys Med Biol* 26:555-557, 1981
- Oster W**, Lindemann A, Mertelsmann R, Hermann F. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and multi-lineage CSF recruit human monocytes to express granulocyte CSF. *Blood* 1989; 73: 64-7.
- Park LS**; Waldron PE, Friend D, et al. Interleukin-3, GM-CSF and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. *Blood* 1989;74:56-65.
- Pazos P**, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Pasqualini CD (1992). Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 20(2):133-8.
- Pearson JD** (1999). Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12(3) :329-41.
- Peipper SC**, Wang ZX, Neote K et al (1995). Duffy antigen receptor. *J Exp Med* 181: 1311-1317.
- Perussia B**, Kobayshi M, Rossi ME, Anegon I, Trinchieri G. Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: Role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol* 1987, 138:765-74.
- Pettet G**, Chaplain MA, McElwain DL, Byrne HM (1996). On the role of angiogenesis in wound healing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Nov 22;263(1376):1487-93.

- Petzelbauer P**, Watson CA, Pfau SE, and Pober JS (1995). IL-8 and angiogenesis: Evidence that human endothelial cells lack receptors and do not respond to IL-8 in vitro. *Cytokine* 7: 267-272.
- Pihan GA**, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 1998; 58:3974.
- Pober JS**, Gimbone MA, Lapierre LA, et al (1986). Overlapping patterns of human endothelial cells by IL-1, tumor necrosis factor and murine interferon. *J Immunol* 137: 1983-1986
- Porter GA**, Palade GE, Milici AJ (1990) Differential binding of the lectin Griffonia simplicifolia and Lycopersicon esculentum to microvascular endothelium: organ - specific localization and partial glycoprotein characterization. *Eur J Cell Biol* 51: 85-95.
- Ramanujan S**, Koenig GC, Padera TP, Stoll BR, Jain RK (2000). Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res.* Mar 1;60(5):1442-8
- Ramegowda B**, Samuel JE, Tesh VL (1999). Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis* Oct;180(4):1205-13.
- Randolph GJ**, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA: Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11(6): 753-761, 1999.
- Rigel DS** (1992). Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma. *Ann Plast Surg* 28(1):7-8.
- Risau W** (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, Apr 17 (6626):671-674 *Nature*, 386, 671-674
- Risau W**, Sariola H, Zerwes H, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem cell-derived embryonic bodies. *Development (Camb)*, 102: 471-478.
- Rollins BJ** (1997). Chemokines. *Blood* 1;90 (3):909-28.
- Rollins BJ**, Sunday MF (1991). Suppression of tumor formation by expression of the JE gene in malignant cells. *Mol Cell Biol* 11: 3125-3131.
- Romer LH**, McLean NV, Yan HC, Daise M, Sun J, DeLisser HM. (1995). IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol* 1995 Jun 15;154(12):6582-92.
- Rosenthal RE**, Megyesi JF, Henzel WJ, Ferrara N, Folkman J (1990). Conditioned medium from mouse sarcoma 180 cells contains vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 4 81): 53-59.
- Rot A** (1992). Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8 role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 13: 291-294.
- Salcedo R**, Ponce ML, Young H, Wasserman K, Ward J, Kleinman H, Oppenheim J, Murphy W (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96 (1): 34-40.
- Sallusto F**, Palermo B, Lenig D, et al (1999). Distinct pattern and kinetics of chemokine production regulate dendritic-cell function. *Eur J Immunol* 29: 1617-1625.
- Sauter B**, Alberta M, Francisco L, Larsson M, Somersana S, Bhardwaj N (2000). Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J Exp Med* 191 (3): 423-434.
- Schonbeck U**, Brandt E, Petersen F, Flad HD, Loppnow H (1995). IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. *J Immunol.* 154(5):2375-83
- Schreiber-Agus N**, Meng Y, Hoang T, et al. Role of Mx1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. *Nature* 1998; 393:483.
- Semsei I**, Ma S, Cutler RG. Tissue and age specific expression of the myc protooncogene family throughout the lifespan of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene* 1989; 4:465.
- Serraino D**, Frattini L, Gianni W, Campisi C, Pietropaolo M, Trimarco G, Marigliano V. (1998). Epidemiological aspects of cutaneous malignant melanoma (review). *Oncol Rep* 5(4):905-9.
- Shang XZ** and Issekutz AC (1999). Enhancement of monocyte transendothelial migration by GM-CSF: requirement for chemoattractant and CD11a/CD18 mechanisms. *Eur J Immunol* 29 (11): 3571-3552.

- Shappell SB**, Mendoza LH, Gurpinar T, Smith CW, Suki WN, Truong LD (2000). Expression of adhesion molecules in kidney with experimental chronic obstructive uropathy: the pathogenic role of ICAM-1 and VCAM-1.
- Shi Q**, Raffi S, Wu M, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita J, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, moore M, Storb RF, and Hammond WP (1998). Evidence of circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362-367.
- Shifren JL**, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN (1996). Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81(8):3112-3118.
- Shing Y**, Folkman j, Haudenschild C, Lund D, Crum R, Klansbrug M (1985). Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J Cell Biochem* 29 (4): 275-287.
- Shutt DC**, Daniels KJ, Carolan EJ, Hill AC, Soll DR (2000). Changes in the motility, morphology and F-actin architecture of human dendritic cells in an in vitro model of dendritic cell development. *Cell Motil Cytoskeleton* 46 (3): 200-221.
- Si Z**, Hersey P, Coates AS (1996). Clinical responses and lymphoid infiltrates in metastatic melanoma following treatment with intralesional GM-CSF. *Melanoma Res* 6:247-255.
- Sica A**, Sacan A, Mantovani A (2002). Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 2 (8): 1045-1054.
- Sisson SD**, Dinarello CA. Production of interleukin-1 α , interleukin-1 β , and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1988; 72: 1368-74.
- Soiffer R**, Lynch M, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schomollinger C, Hodi F, Liebster L, Lam P, Mentzer S (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13141.
- Soule HD**, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1415.
- Springer TA** (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
- Strieter MR**, Polverini RJ, Kunkel SL, et al. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270: 27348-27356.
- Su YA**, Bittner ML, Chen Y, Tao L, Jiang Y, Zhang Y, Stephan DA, Trent JM(2000). Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. *Mol Carcinog* 28 (2): 119-127.
- Suen TC**, Hung MC. c-myc reverses neu-induced transformed morphology by transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 1991; 11:354.
- Sweeney CJ**, Miller KD, Sledge GW. (2003). Resistance in the anti-angiogenic era: nay-saying or a word of caution?. *Trends Mol Med* 9(1):24-9.
- Szabolcs P**, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW (1996). Dendritic cells and macrophages can mature independently form a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood* 87 (11): 4520-4530.
- Takayama K**, Yokozeiki H, Ghoreishi M, Satoh T, Katayama I, Umeda T, Nishioka K (1999). IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the down regulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 113: 541-6.
- Tanaka T**, Okamura s, Okada K, et al. Protective effect of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor against *Pseudomonas aeruginosa* infection in leukocytopenic mice *Infect Immun* 1989; 57: 1792-9.
- te Loo DM**, Monnes LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyer F, Demacker PN, van Den Heuvel LP, van Hinsbergh VW (2000). Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 95 (11): 3396-3402.
- Tedder TF**, Steeber DA, Chen A, Engel P (1999). The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB. J* 9, 866-873.
- Thorin E and Shreeve SM** (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther* 78: 155-166.

- Torisu H**, M Ono H, Kiryu M, Furue Y, Ohmoto J, Nakayama Y, Nishioka S, Sone and Kuwano M (2000). Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF-alpha and IL-7-alpha. *Int j Cancer* 85:182.
- Turk T**, Rees M, Pietrow P, Myers C, Mills C, Gillenwater J (1999). Determination of optimal freezing parameters of human prostate cancer in a nude mice model. *The Prostate* 38:137-143.
- Ueno T**, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6(8):3282-9.
- Ungari S**, Katari RS, Alessandri G, Gullino PM (1985). Cooperation between fibronectin and heparin in the mobilization of capillary endothelium. *Invasion Metastasis* 5(4):193-205.
- Vadas MA**, Nicola NA, Metcalf D. Activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony-stimulating factors. *J. Immunol* 1983; 76: 10-21.
- Vaddi K**, Newton RC (1994). Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 153 (10): 4721-4732.
- Valverius EM**, Ciardiello F, Heldin NE, et al. Stromal influences on transformation of human mammary epithelial cells over expressing c-myc and SV40T. *J Cell Physiol* 1990;145:207.
- van den Berg A**, Visser L, Poppema S (2000). High expression of the CC chemokine TARC in Reed Sternberg cells: a possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 154: 1685-1691.
- van Hinsbergh VW**, Collen A, Koolwijk P (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 936:426-37. Review.
- van Setten PA**, van Hinsbergh VW, van der Velden TJ, van de Kar NC, Vermeer M, Mahan JD, Assmann KJ, van den Heuvel LP, Monnens LA (1997). Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int Apr*;51(4):1245-56
- Vanzulli S**, Gazzaniga S, Braidot MF, Wainstok R (1997). Endothelial cell detection by MEC 13.3 mAb in mice mammary tumors. *Biocell* 21 (1): 39.
- Vecchi A**, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppaciaro A, Schnurch S, Risau W, Ruco L, Mantovani A, Dejana E (1994). Monoclonal antibody specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application and identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 63: 247-254.
- Vecchi A**, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bernasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S (1999). Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leuk Biol* 66: 489-494.
- Venkitaraman AR**. Breast cancer genes and DNA repair. *Science* 1999;286:1100.
- Vicari AR**, et al (2000). Antitumor effects of the mouse chemokine 6CKine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol* 165: 1992-2000.
- Vlaykova T**, Laurila P, Muhonen T, Hahka-Kemppinen M, Jekunen A, Alitalo K, Pyrhonen S. (1999). Prognostic value of tumour vascularity in metastatic melanoma and association of blood vessel density with vascular endothelial growth factor expression. *Melanoma Res Feb*; 9 (1): 59: 68.
- von Andrian UH**, Mackay CR.(2000). T cell function and migration. Two sides of the same coin. *New England J. Med.* 343 (14): 1020-1034. *N Engl J Med* 5;343(14):1020-34
- Wainstok de Calmanovici R**, Bover L, Bravo A, Mantovani A, Mordoh J (1996). Monocyte chemotactic protein-1 is highly expressed in melanomas. VIII PABMB Congress (Pan-American Association of Biochemistry and Molecular Biology), Pucón, Chile, 16-21 de Noviembre de 1996. Pucón, Chile.
- Walter S**, Botazzi B, Govoni D, Colotta F, Mantovani A (1991). Macrophage infiltration and growth of sarcoma clones expressing different amounts of monocyte chemotactic protein /JE. *Int J Cancer* 49: 431-435.
- Weidner N**, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastases in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.*, 143: 401-409.
- Weidner N**, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G (1992). Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst Dec*16, 84 (24): 1875-87.
- Weidner N**, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastases: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med Jan* 3; 324 81): 1-8.

- Weisbargt HR**, Golde DW, Clark SC, Wong GG, Gasson JC (1985). Human granulocyte colony stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 314: 361-4.
- Weisbart HR**, Kwan L, Golde DW, Gasson JC (1987). Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood* 69: 18-21.
- Wells A**, Malkovsky M (2000). Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated review. *Immunol Today* 21 (9): 129-132.
- Williams LA**, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol* 36(17):1175-88.
- Wing EJ**, Magee DM, Whiteside TL, Kalan SS, Shadduck RK (1989). Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* 73 (3):643-646.
- Yamashiro S**, Takeya T, Nishi J, Kuratsu T, Yoshimura Y, Ushio and Takahasi K (1994). Tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am. J. Pathol.* 145: 856.
- Yoshimura T**, Kuhki N, Moore SK, Apella E, Lerman MI and Leonard EJ (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 244, 487-493.
- Young DA**, Lowe ID, Slark StC. Comparison of the effects of IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture. *J. Immunol* 1990, 145: 607-15.
- Zhang L**, Khayat A, Cheng H, Graves DT (1997). The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth. *Lab Invest* 76: 579-590.
- Zhang L**, Yoshimura T, Graves DT (1997). Antibody to Mac-1 or monocyte chemoattractant protein-1 inhibits monocyte recruitment and promotes tumor growth. *J Immunol* 158: 4855-4861.
- Zhu N**, Eves PC, Katerinaki E, Szabo M, Morandini R, Ghanem G, Lorigan P, MacNeil S, Haycock JW (2002). Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor alpha and suppressed by alpha melanocyte stimulating hormone.
- Zlotnik A** and Yoshie O (2000). Chemokines: A new classification system and their role in immunity. Review. *Immunity* 12, 121-127.
- Zoja C**, Angioletti S, Donadelli R, Zanchi C, Tomasoni S, Binda E, Imberti B, Te Loo M, Monnens L, Remuzzi G, Morigi M (2002). Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent upregulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney Int* 62 (3): 846-856.
- Zouboulis ChC** (1999). Principles of Cutaneous Cryosurgery: An update. *Dermatology* 198:111-117.

❧ AGRADECIMIENTOS ❧

A la Dra. Rosa Wainstok por brindarme la posibilidad de trabajar en su laboratorio, por su dirección, consejos y supervisión en los trabajos realizados durante estos años, que son los que conforman este trabajo de Tesis.

Al Dr. José Mordoh por abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme colaborar con su grupo y desarrollar una parte importante del trabajo de Tesis en su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que me permitieron desarrollar esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por formarme en el grado académico y proporcionarme las herramientas y el ámbito para especializarme en el área y tema en que se desarrolló esta Tesis.

A la Fundación Instituto Leloir (ex Fundación Campomar) y en ella, a todos los que contribuyeron con su trabajo eficiente en permitir desarrollar el mío: Darío, Aida, Ana y la gente de Biblioteca, especialmente a Georgina y Juan por su colaboración para que este trabajo tome forma.

A la gente de la Secretaría del Departamento de Química Biológica: Luis, Martín y Lily por su orientación y colaboración en temas "académico-administrativos".

A la Dra. Inés Bravo por su colaboración en el procesamiento y análisis de algunos resultados de esta Tesis, y porque a través de ella, adquirí un importante aprendizaje y criterio para "entender" los tejidos.

Al Dr. Martinelli por su colaboración en los experimentos de criocirugía.

A la Dra Annunciata Vecchi del Istituto di Ricerche Farmacologiche, Mario Negri, Milán, Italia por darme la oportunidad de perfeccionarme y aprender algunas de las técnicas aplicadas en esta Tesis.

A Lorena por ser una gran compañera de laboratorio, por los innumerables aislamientos compartidos durante semanas y fines de semana y por su cariño y calidad como persona.

A mis compañeros del Laboratorio 101 con los que he compartido un tiempo muy importante de mi vida, por las ayudas recibidas y a quienes contribuyeron y

contribuyen cotidianamente con muestras de solidaridad, camaradería y buena predisposición.

A María Teresa y su team "HUVEC": Paula y Leticia, por su colaboración, buena predisposición y aliento.

A Laura Bover y Mariana Capurro por los buenos momentos compartidos y su colaboración al facilitarme algunos papers "difíciles". A Marcela Barrio por su orientación precisa en los ensayos de iodización. Y las tres por hacerme más sencillo el insertarme en un grupo nuevo.

A Adriana por cederme algunas de sus "hijas"; a Cynthia por facilitarme livianos jpg y a ambas por su colaboración, paciencia y cariño.

A mis queridos amigos de la Facu: Pato, Rubén, Laura "Lo" López, Marianita, Marcelo por muchas horas de charlas, mates y traspasadas; por compartir y construir juntos; por su apoyo y el gran cariño que me brindan, incluso algunos, desde la distancia.

A Carmen Aldonatti, Adriana Cochón y Silvia Billi, por estar siempre bien dispuestas a dar una mano y ...un rico café.

A mi hermana, por su aguante y su apoyo con innumerables actitudes cotidianas.

A mis padres, por guiarme y enseñarme dándome las herramientas para crecer, los estímulos para seguir y mejorar; pero por sobre todo, por darme una gran libertad para elegir y ser. A mi viejo, por su santa paciencia e infinita comprensión.

A todos, MUCHAS GRACIAS!!!