Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN LA ANGIOGÉNESIS Y LINFOANGIOGÉNESIS TUMORAL. PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Eulalia de la Torre

Director de tesis: Dra. María Elena Sales
Consejero de Estudios: Prof. Dra. Lilia Lauría de Cidre

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
CEFYBO – CONICET
Facultad de Medicina - UBA
Buenos Aires, 2007

RESUMEN

PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN LA ANGIOGÉNESIS Y LINFOANGIOGÉNESIS TUMORAL. PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL

La progresión tumoral es un proceso complejo con múltiples etapas. En este trabajo estudiamos el rol de los macrófagos (Mfs) de portadores del tumor LMM3, derivado de un adenocarcinoma mamario murino metastásico de aparición espontánea en la cepa BALB/c, en la angiogénesis y linfoangiogénesis, dos procesos cruciales en la tumorigénesis, así como su regulación por el sistema colinérgico no neuronal.

En nuestro modelo se purificaron Mfs peritoneales de portadores del tumor LMM3 a los 5, 7 y 14 días (MfsT5, MfsT7 y MfsT14) post-inoculación subcutánea. Observamos que el co-cultivo de células LMM3 con MfsT7 en la relación 100:1 potenció la neovascularización dérmica producida por las células LMM3, concomitantemente con un aumento en la expresión de CD31 y del factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A) marcadores angiogénicos.

Sólo los MfsT7 y los MfsT14 indujeron *per se,* una respuesta angiogénica positiva tan potente como la que producen las células LMM3. En esta respuesta participan principalmente productos de las enzimas arginasa y ciclooxigenasa (COX) que se expresan en ambas poblaciones celulares.

Demostramos que los Mfs expresan constitutivamente receptores muscarínicos y su estimulación con el agonista carbacol (CARB) potencia la

respuesta angiogénica exclusivamente en los MfsT7, principalmente por activación de los subtipos M_1 y M_3 que se acoplan a las enzimas arginasa y COX.

Los MfsT estimulan la linfoangiogénesis tumoral y son linfoangiogénicos *per se* porque producen un aumento de la expresión de LYVE-1 y VEGF-C, marcadores de vasos linfáticos, en el sitio de inoculación. El tratamiento de los MfsT7 con CARB sólo incrementó la expresión de VEGF-C.

Concluimos que sólo los MfsT7 potencian e inducen la respuesta angiogénica, efecto que es regulado por receptores muscarínicos. Además los MfsT promueven la linfoangiogénesis desde estadíos precoces de portación del tumor y este proceso no parece estar controlado por el sistema colinérgico no neuronal.

Palabras claves: macrófagos, angiogénesis, linfoangiogénesis, receptores muscarínicos, cáncer de mama.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF ANTIGEN PRESENTING CELLS IN TUMOR ANGIOGENESIS AND LYMPHANGIOGENESIS. ROLE OF NON-NEURONAL CHOLINERGIC SYSTEM

Tumor progression is a multiple step and very complex process. In this work, we investigate the role of peritoneal macrophages (Mps) purified from LMM3 tumor bearers in angiogenesis and lymphangiogenesis and the regulation of both processes by the non-neuronal cholinergic system. This tumor is a cell line obtained from a lung metastases of the mammary adenocarcinoma MM3 that spontaneously arose in BALB/c female mice.

In our model, peritoneal Mps were obtained from LMM3 tumor bearing mice 5, 7 and 14 days (T5Mps, T7Mps and T14Mps) after subcutaneous inoculation. We observed that co-cultivation of LMM3 cells with T7Mps (100:1) increased skin neovascular response induced by LMM3 cells and produced up-regulation of the angiogenic markers, CD31 and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A).

Only T7Mps and T14Mps were angiogenic *per se* and their responses were comparable to that exerted by LMM3 cells alone. Products of arginases and cyclooxygenases (COX) which are expressed in both populations of Mps, participated in neo-angiogenesis.

We demonstrated that Mps expressed functional muscarinic receptors and its stimulation by the synthetic agonist carbachol (CARB) in T7Mps potentiated blood vessels formation, mainly by activation of M_1 and M_3 receptors subtypes that could be coupled to arginase and COX.

TMps also stimulate lymphatic vessels formation induced by LMM3 cells. They are lymphangiogenic *per se,* and induce an increase in LYVE-1 and VEGF-C expression in the site of inoculation. Only the treatment of T7Mps with CARB increased VEGF-C expression.

We conclude that only T7Mps potentiate and induce angiogenesis, effect that is regulated by muscarinic receptors activation. In addition, TMps increase and induce lymphangiogenesis in very early tumor LMM3 bearers. Modulation of this process by non-neuronal cholinergic system needs further investigation.

Key words: macrophages, angiogenesis, lymphangiogenesis, muscarinic receptors, breast cancer.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se pudo realizar gracias al aporte técnico, intelectual y espiritual de mucha gente a quienes quiero agradecer.

En primer lugar quiero agradecerle a mi directora, Male. Por su estímulo constante, su apoyo y su paciencia infinita y fundamentalmente por brindarme su confianza y cariño. Por la ayuda invalorable en la redacción de este trabajo. Por ser una persona de gran corazón a quien quiero y una investigadora admirable. Gracias por todo!!!

A Ana Franchi por las sugerencias aportadas para la realización de esta tesis y brindarnos un lugar trabajo en el CEFYBO.

A Roberto Diez por ofrecernos el equipamiento de la Cátedra y brindarnos un lugar de trabajo agradable.

A Lilia Davel por enseñarme todo su conocimiento sobre la Angiogénesis y por su gran disposición para colaborar con este trabajo.

A Lilia Lauria por su ayuda en los ensayos de Inmunohistoquímica.

A Ale, Laura, Marita, Max, Pia, Gaby y Cristina por su ayuda siempre cordial, la compañía y por su buena onda que hacen más divertidos los días en el laboratorio.

A Mariana Farina y María Laura Ribeiro por su colaboración en los ensayos de COX.

A Adriana, Liliana, Ema, Jorge y Mario por la ayuda de todos los días.

A la Dra. Lustig, por ser un ejemplo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal.

A todo el personal del CEFYBO, a la gente del bioterio, de la administración y a los que colaboran para mantener el orden y la limpieza del material de laboratorio.

A mis amigas Florenses a quienes quiero muchísimo y me acompañan siempre.

A Marcos por su apoyo, ayuda y amor a lo largo de todos estos años.

A mis hermanas por ayudarme en todo y a Dulci que es el solcito de la familia.

A Mamá y a Papá por confiar siempre en mi, ayudarme y apoyarme incondicionalmente.

A mi amor, Marcos

A mis padres y hermanas

ABREVIATURAS

- Ac: acetilcolina.
- AG: aminoguanidina.
- AMPc: monofosfato cíclico de adenosina
- BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato-p-toluidina.
- CARB: cloruro de carbamilcolina.
- COX: ciclooxigenasa.
- DAG: diacilglicerol.
- D-MEM: medio de cultivo mínimo esencial.
- DTT: ditiotreitol.
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético.
- EGF: factor de crecimiento epidérmico.
- EGTA: ácido etilenglicoltetracético.
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.
- GC: guanilil ciclasa.
- G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos.
- GMPc: monofosfato cíclico de guanosina.
- HCl: ácido clorhídrico.
- HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.
- HIF-1: factor inducible por hipoxia-1.
- IL-1: interleuquina-1.
- IP_3: 1, 4, 5-trifosfato de inositol.
- INDO: indometacina.
- L-NAME: éster metílico de N^{ω}-nitro-L-arginina.
- L-NMMA: N^{G}-monometil-L-arginina.

- MAT: macrófagos asociados al tumor.
- MCP-1: proteína quimioatractante de monocitos-1
- M-CSF: factor estimulante de colonias macrofágicas.
- Mfs: macrófagos.
- MEC: matriz extracelular
- $MgCl_2$: cloruro de magnesio.
- MMPs: metaloproteasas.
- $MnCl_2$: cloruro de manganeso.
- NA: noradrenalina.
- NaCl: cloruro de sodio.
- $NaHCO_3$: bicarbonato de sodio.
- Na_2HPO_4: fosfato disódico.
- NaH_2PO_4: fosfato monosódico.
- $NaNO_2$: nitrato de sodio.
- NBT: nitro azul de tetrazolio.
- NCDC: 4-carboxifenil-N, N-difenilcarbamato.
- NO: óxido nítrico.
- NOHA: N^{ω}hidroxi-L-arginina.
- NOS: óxido nítrico sintasas.
- NS-398: N-(2-ciclohexil-oxi-4-nitrofenil)-metanosulfonamida.
- PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1.
- PBS: buffer fosfato salino.
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PG: prostaglandina.

- PIGF: factor de crecimiento placentario.
- PLC: fosfolipasa C
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- RM: receptor muscarínico.
- RN: receptor nicotínico.
- SCnN: sistema colinérgico no neuronal.
- SDS: dodecil sulfato de sodio.
- SFB: suero fetal bovino.
- SNA: Sistema Nervioso Autónomo.
- SNAP: Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático.
- SNC: Sistema Nervioso Central.
- SNS: Sistema Nervioso Somático.
- TEMED: N, N, N`, N`-di-dimetilaminoetanol.
- TGF-β: factor de crecimiento transformante-beta.
- TNF-α: Factor de necrosis tumoral-alfa.
- t-PA: activador del plasminógeno tipo tisular.
- u-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa.
- VAL: valina.
- VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

ÍNDICE

RESUMEN 2

ABSTRACT 5

AGRADECIMIENTOS 8

ABREVIATURAS 11

ÍNDICE 15

INTRODUCCIÓN 22

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ANGIOGÉNESIS 23
1.1. Etapas del proceso angiogénico 25
1.2. Angiogénesis tumoral 32
1.2.1. Modulación de la angiogénesis tumoral por células inmunes 38
1.2.2. Modulación de la angiogénesis tumoral por factores solubles 39
1.2.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular 39
1.2.2.2. Óxido nítrico 41
1.2.2.3. Prostaglandina E_2 43

2. EL SISTEMA COLINÉRGICO NEURONAL 46
2.1. Receptores colinérgicos muscarínicos 49
2.1.1. Transducción de señales 53

3. EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL 58

4. LINFOANGIOGÉNESIS 61
4.1. El sistema linfático 61
4.1.1. Órganos linfáticos centrales 61

4.1.2. Órganos linfáticos periféricos 62
4.1.3. El sistema circulatorio linfático 63

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 70

MATERIALES Y MÉTODOS 73

1. CULTIVO CELULAR 74

2. ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS IN VIVO 74

3. ANIMALES PORTADORES DE TUMOR 77

4. PURIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS 77

5. INMUNODETECCIÓN DE LOS MARCADORES ANGIOGÉNICOS
FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR-A
Y PECAM-1 79
5.1. Preparación de homogenatos de piel 79
5.2. Preparación de lisados celulares 80
5.3. Ensayos de Western blot ……80
5.4. Inmunohistoquímica de PECAM-1 82

6. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS 84
6.1. Inmunodetección de óxido nítrico sintasas 84
6.1.1. Preparación de lisados celulares 84
6.1.2. Ensayos de Western blot …… 84
6.2. Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasas 85

7. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ARGINASAS 86

7.1. Ensayos de Western blot ……86
7.2. Medición de la actividad de arginasas 87

8. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE CICLOOXIGENASAS 88
8.1. Inmunomarcación de ciclooxigenasas 88
8.1.1. Preparación de lisados celulares 88
8.1.2. Ensayos de Western blot …… 89
8.2. Medición de la actividad de ciclooxigenasas 89
8.2.1. Preparación de las muestras 89
8.2.2. Radioinmunoensayo 90

9. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS..91
9.1. Inmunomarcación de receptores muscarínicos 91
9.1.1. Preparación de las muestras 91
9.1.2. Ensayos de Western blot …… 91
9.2. Funcionalidad de los receptores muscarínicos 92
9.3. Detección de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A en macrófagos tratados con carbacol 93
9.3.1. Preparación de lisados celulares 93
9.3.2. Ensayos de Western blot …… 94

10. LINFOANGIOGÉNESIS 94
10.1. Inmunodetección de marcadores linfoangiogénicos LYVE-1 y factor de crecimiento del endotelio vascular-C 94

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 95

12. REACTIVOS GENERALES 95

RESULTADOS 100

1. ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3 101
1.2. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la angiogénesis inducida por las células LMM3 104
1.2.1. Expresión y actividad de óxido nítrico sintasas, arginasas y ciclooxigenasas en células LMM3 106

2. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3 108
2.1. Participación de óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la modulación de la angiogénesis tumoral producida por MfsT7 113

3. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR SON ANGIOGÉNICOS *PER SE* 115
3.1. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la angiogénesis inducida por macrófagos 118
3.1.1. Expresión y actividad de óxido nítrico sintasas, arginasas y ciclooxigenasas en macrófagos 120
3.2. Interacciones entre las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en macrófagos 125

4. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR 132
4.1. Participación de los subtipos de receptores muscarínicos en el efecto angiogénico del carbacol 135
4.2. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en el efecto angiogénico del carbacol 136
4.3. Modulación de la actividad de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa por carbacol 137
4.4. Participación de los distintos subtipos de receptores muscarínicos

en el efecto del carbacol 141
4.5. Efecto del carbacol sobre la expresión del factor de crecimiento
del endotelio vascular-A 143

5. LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3 145

6. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN
LA LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3 147

7. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DEL TUMOR LMM3
SON LINFOANGIOGÉNICOS *PER SE* 149

DISCUSIÓN 152

1. ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3.....153

2. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN LA
ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3 158

3. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR SON
ANGIOGÉNICOS *PER SE* 164

4. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN
LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR MACRÓFAGOS 169

5. LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3.
PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DEL TUMOR 175

6. PERSPECTIVAS FUTURAS 180

CONCLUSIONES 182

BIBLIOGRAFÍA 187

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ANGIOGÉNESIS

La **angiogénesis** es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y comprende una secuencia de eventos que es fundamental para muchos procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario, la reparación de heridas, la formación del cuerpo lúteo y del endometrio uterino en el ciclo menstrual durante la adultez.

En cambio, la **vasculogénesis** es el proceso de formación de vasos sanguíneos a partir del ensamblaje de angioblastos, precursores endoteliales diferenciados, en una red vascular primitiva. Subsecuentemente, las células endoteliales proliferan y el lecho vascular naciente se expande y remodela formando una red madura que posibilita la circulación sanguínea, siendo éste el proceso que se denomina angiogénesis (Carmeliet P, 2000). Además, colaboran otras células de soporte, como los pericitos y células musculares que favorecen la maduración y el funcionamiento de los vasos sanguíneos. Entre estas células existe una matriz extracelular (MEC) especializada que se denomina lámina basal.

En condiciones fisiológicas, la angiogénesis está estrictamente controlada mediante el equilibrio de factores anti-angiogénicos y pro-angiogénicos. Un cambio en el balance a favor de los factores pro-angiogénicos puede conducir a un crecimiento inadecuado de los vasos

sanguíneos, desempeñando un papel esencial en una serie de patologías: la ateroesclerosis, la artritis reumatoidea, la psoriasis, la retinopatía diabética y el crecimiento tumoral (Tabla 1). Así por ejemplo, en la artritis el crecimiento de un *pannus* vascular puede estar mediado por una concentración excesiva de factores angiogénicos producidos por los macrófagos (Mfs) infiltrantes, otras células del sistema inmune o células inflamatorias.

Procesos Fisiológicos	*Procesos Patológicos*
❖ **Cicatrización**	❖ **Crecimiento tumoral y metástasis**
❖ **Reparación de fracturas**	❖ **Psoriasis**
❖ **Formación del cuerpo lúteo**	❖ **Retinopatía diabética**
❖ **Vascularización del endometrio**	❖ **Artritis reumatoidea**
❖ **Implantación del embrión**	❖ **Hemangioma**
❖ **Desarrollo de la placenta**	❖ **Sarcoma de Kaposi**
❖ **Desarrollo embrionario y crecimiento postnatal**	❖ **Endometriosis**

Tabla 1: Algunos procesos fisiológicos y patológicos en los que está implicada la angiogénesis.

En la retina de pacientes diabéticos se produce con frecuencia una proliferación descontrolada de capilares que provoca alteraciones graves de la visión, pudiendo ser causa de ceguera.

Los tumores sólidos, al neovascularizarse reciben un suministro de sangre adecuado que aporta oxígeno y nutrientes y promueve su crecimiento local y la diseminación a órganos distantes del mismo con formación de metástasis.

Asimismo, otras patologías como la isquemia del miocardio o de los miembros inferiores, mejorarían mediante la promoción de la formación de vasos sanguíneos funcionales por factores pro-angiogénicos (Carmeliet P, 2003).

1.1. Etapas del proceso angiogénico

La **angiogénesis clásica** o **brotación** es un proceso complejo que consta de varias etapas que están muy reguladas en el tiempo y en el espacio. Cada paso implica una complicada interrelación entre reactividad celular, factores solubles y componentes de la MEC. Diversas señales son capaces de iniciar el proceso angiogénico, principalmente el estrés metabólico y la hipoxia pero también la respuesta inmune o inflamatoria. Todos estos procesos son controlados principalmente por factores proteicos que se unen a receptores de la membrana de las células endoteliales, originando una cascada fosforilativa y activando la expresión de genes específicos involucrados en la proliferación de dichas células (Nishida N y col., 2006).

En un intento de simplificación, el proceso angiogénico puede esquematizarse en cuatro etapas, cada una de las cuales supone un posible blanco para su intervención farmacológica (Fig. 1). Puede comenzar por la activación de las células endoteliales bajo la acción de una serie de citoquinas angiogénicas y de otros mediadores fisiológicos. Entre los factores de crecimiento promotores de la angiogénesis que están mejor caracterizados, se destacan algunos factores de tipo polipeptídico tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento placentario (PlGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (Fig. 1 A). Otros mediadores solubles de la angiogénesis son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el óxido nítrico (NO). La activación del endotelio quiescente por acción de las citoquinas mencionadas suele tener lugar mediante la unión a sus respectivos receptores del tipo tirosina quinasa. Algunos de estos receptores se expresan preferentemente en células endoteliales, como es el caso de los dos receptores de VEGF, denominados VEGFR-1/Flt-1 y VEGFR-2/Flk-1 (Yancopoulos GD y col., 2000). También se ha descrito un tercer receptor del tipo tirosina quinasa, el VEGFR-3, relacionado estructuralmente con los anteriores y que parece estar expresado en el endotelio linfático.

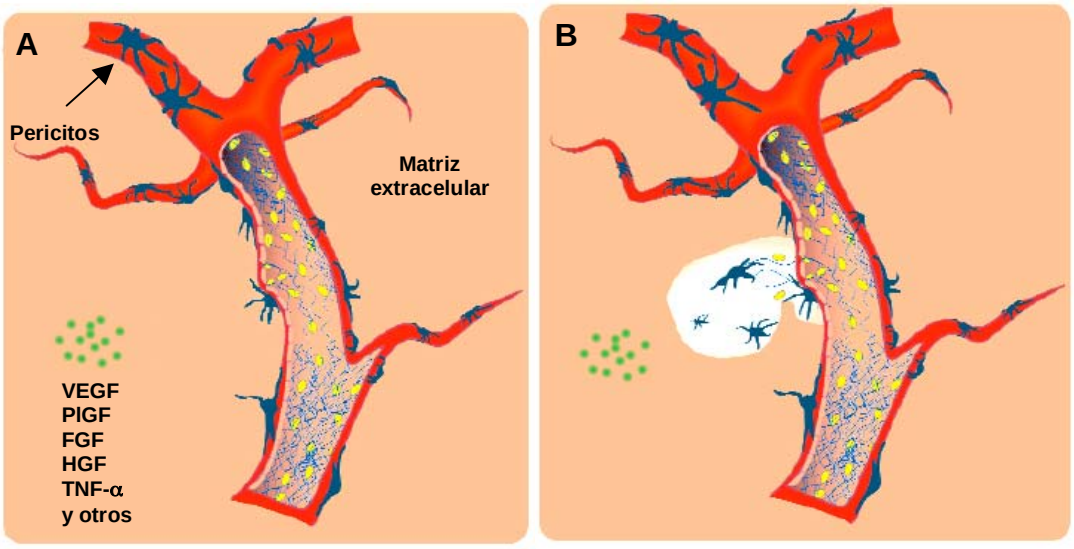

Figura 1: Etapas del proceso angiogénico. **A)** Iniciación de la angiogénesis y respuesta proliferativa. **B)** Producción de proteasas de la matriz extracelular. Degradación de la lámina basal. Pericitos (azules), células endoteliales (rosa) proteínas plasmáticas (líneas azules), factores angiogénicos (verdes).

Una vez que las células endoteliales se activan por acción del estímulo angiogénico, su fenotipo cambia notablemente. Además de producirse un cambio en su forma, de plana a redondeada, se produce la liberación de una serie de proteasas que le permitirán degradar su membrana basal. Para esto se requiere la separación de los pericitos que recubren la pared del vaso sanguíneo.

Aunque diversas familias de proteasas han sido implicadas en el proceso de la angiogénesis, las que parecen tener un papel más importante son el activador del plasminógeno y las metaloproteasas de la MEC (MMPs). Durante la migración de las células endoteliales, el FGF induce la expresión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) o de tipo tisular (t-PA), del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y del receptor de

u-PA. El factor angiogénico VEGF también estimula la producción por las células endoteliales de los activadores de plasminógeno y de sus inhibidores. Por otra parte las MMPs participan en situaciones que requieren angiogénesis, tales como la artritis y la cicatrización de heridas. Algunos factores angiogénicos, tales como VEGF, FGF, TNF-α e interleuquina-1 (IL-1) estimulan la producción de MMP-1, MMP-3 y MMP-9 por las células endoteliales. Además, algunos inhibidores de MMPs son inhibidores de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* (Griffioen AW y Molema G, 2000).

Durante la angiogénesis, la acción degradadora ejercida por las enzimas proteolíticas participa en al menos tres pasos del proceso: ruptura de la membrana basal, migración de las células endoteliales y formación del lumen vascular. Estas enzimas también pueden modular la actividad de los factores angiogénicos ya sea por la activación directa de citoquinas latentes, tales como el TGF-β, o de forma indirecta liberando citoquinas unidas a la MEC, como el FGF (Fig. 1 B).

En respuesta al estímulo angiogénico, las células endoteliales migran desde el lecho vascular hacia dicho estímulo, invadiendo el tejido conectivo y el parénquima. Además, la migración de estas células implica la interacción de las mismas con moléculas tales como fibronectina y laminina, mediada por sus receptores o por integrinas y proteínas de adhesión celular (Fig. 2 A).

El proceso de diferenciación de las células endoteliales para dar lugar a la formación de capilares no está completamente caracterizado, aunque debe estar perfectamente controlado de modo que las células endoteliales que proliferan no ocluyan el lumen de los capilares que se van formando. A medida que el nuevo brote se forma, algunas de las células vuelven al estado de reposo para formar las paredes de los nuevos capilares y comienzan a producir la MEC y la membrana basal necesarias para estabilizarlos (Fig. 2 B) (Rundhaug JE, 2005).

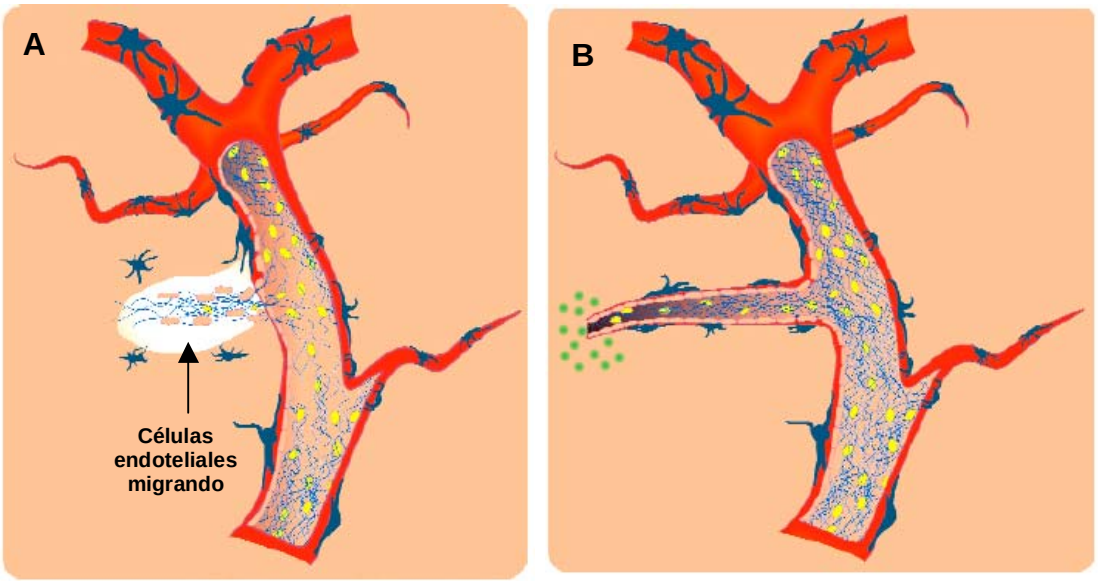

Figura 2: Etapas del proceso angiogénico. **A)** Migración del endotelio e invasión tisular. **B)** Síntesis de una nueva lámina basal y maduración de los vasos. Pericitos (azules), células endoteliales (rosa) proteínas plasmáticas (líneas azules), factores angiogénicos (verdes).

Existen otros mecanismos por los cuales se originan nuevos vasos sanguíneos en el adulto. Estos son la angiogénesis **sin brotación** o **intususcepción**, la **elongación** y la **incorporación de células**

progenitoras endoteliales circulantes (Fig. 3).

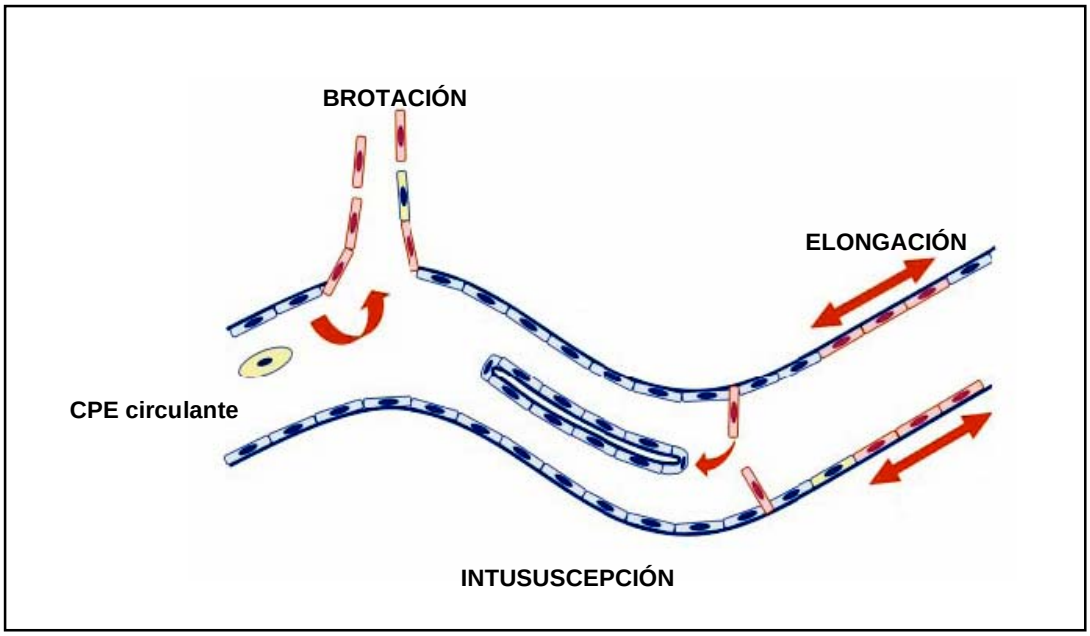

Figura 3: Representación esquemática de los 4 mecanismos de angiogénesis: brotación, sin brotación o intususcepción, elongación e incorporación de células progenitoras endoteliales (CPE) circulantes. Las células quiescentes se muestran en azul, las células endoteliales en proliferación en rojo y la CPE en amarillo.

La angiogénesis **sin brotación** o **intususcepción** es un proceso que comienza con el nacimiento de paredes microvasculares opuestas en el lumen capilar creando una zona de contacto entre células endoteliales (Fig. 4 a y b). Luego de que se produce el contacto (Fig. 4 c) la bicapa endotelial es perforada, entonces se produce una reorganización de contactos intercelulares y se forma un pilar transluminal que luego es invadido por fibroblastos y pericitos (Fig. 4 d). Este tipo de angiogénesis predomina durante la organogénesis del pulmón (Djonov V y col., 2003).

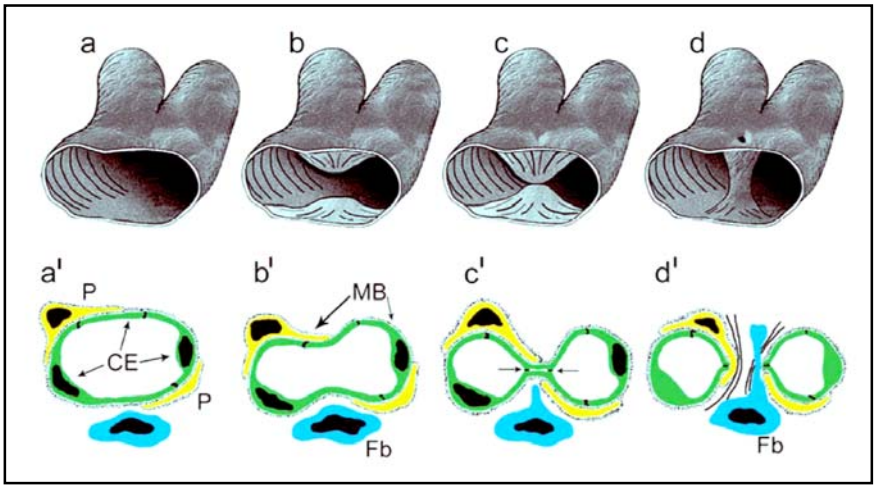

Figura 4: Esquema tridimensional que representa la generación de nuevos segmentos vasculares por intususcepción (a-d). Representación bidimensional del panel superior (a´-d´) Las células endoteliales (CE) situadas sobre los lados opuestos de un tubo capilar sobresalen en su lumen hasta que se ponen en contacto unas con otras (c´). Una vez establecido el contacto, se forman las uniones interendoteliales y se reorganiza la bicapa endotelial en el centro, formándose un pilar transluminal que es invadido por fibroblastos (Fb) y pericitos (P) (d´).

La **elongación** y ensanchamiento de los vasos ocurre probablemente en tejidos en crecimiento que constantemente se reorganizan en respuesta a las demandas metabólicas de las células circundantes, un proceso conocido como remodelación (Fig. 3) (Risau W, 1997).

El cuarto mecanismo mencionado consiste en una pequeña proporción de células mononucleares circulantes que fue identificada como **células progenitoras endoteliales (CPE)** que tienen la capacidad de incorporarse a vasos en crecimiento, pero no a vasos quiescentes. Estas células reflejan el fenotipo de angioblastos embrionarios, con la capacidad de circular, proliferar y diferenciarse en una célula endotelial madura (Fig. 3) (Asahara T y col., 1999; Gargett CE y Rogers PAW, 2001).

1.2. Angiogénesis tumoral

Los tumores inducen la formación de vasos sanguíneos por medio de la secreción de varios factores de crecimiento como el VEGF y el FGF. Para lograr el crecimiento del tumor desde unos pocos milímetros (1 ó 2 mm) a una masa de volumen mayor es necesario el aporte de oxígeno y nutrientes. La hipoxia es precisamente una señal potente para desencadenar el proceso de neovascularización y como consecuencia el crecimiento del tumor (Folkman J, 1990).

Por otra parte la angiogénesis es también imprescindible para la diseminación de un tumor, por vía hematógena. Las células malignas pueden desprenderse del tumor primario entrar en un vaso sanguíneo y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis.

Por muchos años, la vascularización tumoral fue explicada solamente por el crecimiento hacia el tumor de nuevos vasos a partir de otros preexistentes. Sin embargo, en los últimos años, se han reconocido otros mecanismos. Estos son la incorporación de CPE que ya hemos mencionado anteriormente, **vasos mosaico** y **mimetismo vascular**. Estos mecanismos diferentes pueden coexistir en el mismo tumor o pueden producirse en un tipo específico de tumor o en un ambiente determinado. Por ejemplo, en el melanoma uveal, un tumor ocular, se ha descripto mimetismo vascular y

angiogénesis con brotación cuando es implantado subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos (Folberg R y col., 2000).

El concepto de **mimetismo vascular** fue propuesto por Maniotis y col. en 1999. Bajo condiciones apropiadas del microambiente, células tumorales agresivas y descontroladas genéticamente forman canales microvasculares que funcionan como “vasos”. El canal formado por mimetismo vascular está compuesto por una membrana basal recubierta por células tumorales y sin células endoteliales. Las células sanguíneas pueden fluir a través del “vaso” y no se encuentran células inflamatorias alrededor del mismo (Fig. 5 A). Se distinguen tres procesos en la formación de los canales por este mecanismo: 1) plasticidad de células tumorales altamente malignas, 2) remodelación de la MEC y 3) conexión del canal con los vasos sanguíneos del hospedador para recibir el suministro de sangre desde los tejidos (Zhang S y col., 2007).

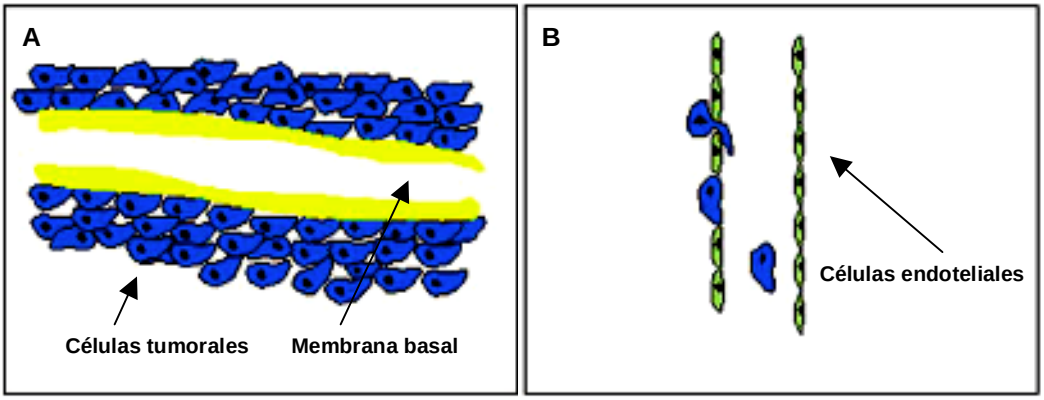

Figura 5: Mecanismos de vascularización tumoral. **A)** Mimetismo vascular, B) Vasos mosaico.

Está demostrado que los vasos sanguíneos en un tumor sólido pueden ser quiméricos es decir que en sus paredes se detectan tanto células endoteliales como tumorales, formando **vasos mosaico**. Las células tumorales en estos vasos pueden sufrir intravasación o permanecer temporariamente en la pared del capilar (Fig. 5 B) (Auguste P y col., 2005).

La angiogénesis es uno de los pasos de la progresión tumoral, proceso que también incluye a la llamada cascada metastásica. La diseminación tumoral puede producirse por vía: hematógena, linfática y local (invasión) (Liotta LA y col., 1991). La secuencia del proceso metastático, que es semejante en todos los tumores, comienza con la **neovascularización** que es imprescindible para la formación y llegada de nuevos vasos sanguíneos al tumor primario (Fig. 6).

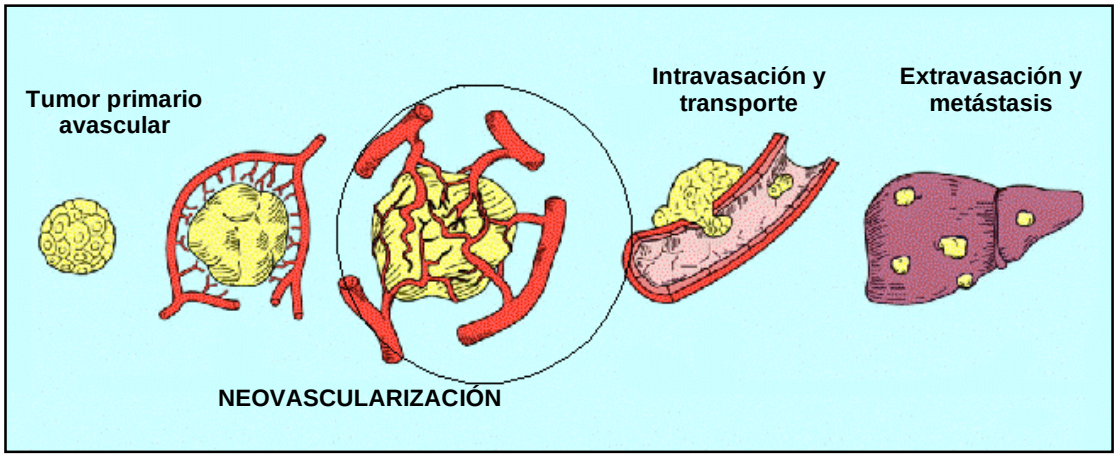

Figura 6: Esquema de la cascada metastásica.

Algunas células tumorales pueden regular negativamente la expresión de moléculas de adhesión, aumentando su movilidad y por lo tanto, lograr desprenderse de la lesión primaria pudiendo así **invadir** estructuras adyacentes como las membranas basales. Debido a que las paredes de los neovasos son delgadas y ofrecen poca resistencia a la penetración de las células tumorales se produce la **intravasación** y entrada a la circulación.

Además, la liberación por parte de la célula tumoral de enzimas que degradan la MEC y la membrana basal facilitan este proceso. Las células metastásicas se diseminan por vía hematógena formando agregados heterotípicos con plaquetas, con deposición de fibrina, que protege a las células tumorales del medio circundante y fundamentalmente del sistema inmune. Se sabe que la mayor parte de las células tumorales circulantes mueren rápidamente. Esto puede atribuirse a características de la propia célula tumoral como su morfología, agregación y expresión de moléculas de adhesión en su superficie. También factores del hospedador como la turbulencia sanguínea, células NK, Mfs y/o linfocitos influyen en la supervivencia de émbolos tumorales originados en la circulación. Más aún, el pasaje de las células tumorales a través de los capilares pueda llevar a la lisis celular ocasionada por fuerzas de rozamiento (Liotta y col., 1991).

Las pocas células tumorales que logran sobrevivir en la circulación se arrestan en los lechos capilares de órganos distantes específicos para cada tipo tumoral (órgano blanco). Esto es debido a la adhesión de éstas a células

endoteliales del capilar o a membranas basales subendoteliales expuestas. Las células tumorales pueden proliferar en el lumen de los vasos sanguíneos, pero la mayoría **extravasa** al parénquima del órgano blanco por mecanismos similares a los que operan durante la intravasación. Las células tumorales que poseen receptores de superficie adecuados pueden responder a factores de crecimiento liberados por el órgano blanco (efecto parácrino) y proliferar en el parénquima de dicho órgano, para lo que desarrollarán nuevamente una red vascular.

En la Tabla 2 se muestran factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos involucrados en la progresión tumoral. Algunos de estos factores son altamente específicos para el endotelio como el VEGF, mientras que otros tienen un amplio rango de actividades, como las MMPs (Rosen LS, 2002).

Se han observado marcadas diferencias entre la vasculatura normal y tumoral. Los vasos tumorales son altamente desorganizados, tortuosos y dilatados con diámetro desigual, con excesiva ramificación, desvíos y capa muscular incompleta o ausente (Carmeliet P y Jain RK, 2000). Sus paredes tienen numerosas “grietas", uniones interendoteliales ensanchadas y una membrana basal discontinua o ausente. Las células endoteliales presentan una morfología anormal y al proliferar se apilan y proyectan hacia el lumen.

Factores pro-angiogénicos	*Factores anti-angiogénicos*
❖ Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	❖ Angiostatina (fragmento del plasminógeno)
❖ Factor de crecimiento placentario (PlGF)	❖ Antitrombina III
❖ Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	❖ Inhibidor derivado de cartílago (CDI)
❖ Factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa) y básico (FGFb)	❖ Endostatina
❖ Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	❖ Fragmento de fibronectina
❖ Factor inducible por hipoxia (HIF)	❖ Heparinasas
❖ Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	❖ Gonadotrofina coriónica humana
❖ Factor de crecimiento transformante (TGF)-α y β	❖ Interferón α, β y γ
❖ Factor de necrosis tumoral (TNF)-α	❖ Factor inducible por interferón
❖ Oxido nítrico (NO)	❖ Interleuquina-12 (IL-12)
❖ Prostaglandina E_2 (PGE_2)	❖ Inhibidores de metaloproteasas de tejido (TIMPs)
❖ Metaloproteasas (MMPs)	❖ Inhibidor de ribonucleasa placentaria
❖ Folistatina	❖ Inhibidores de los activadores del plasminógeno
❖ Interleuquina-8 (IL-8)	❖ Factor de plaquetas 4 (PF4)
❖ Leptina	❖ Prolactina
❖ Angiogenina	❖ Retinoides
❖ Angiopoietina-1	❖ Trombospondina-1 (TSP-1)
❖ Pleiotrofina	❖ Vasculostatina
❖ Proliferina	❖ Vasostatina

Tabla 2: Factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos involucrados en la progresión tumoral.

Consecuentemente, los vasos tumorales son más permeables y la turbulencia del flujo sanguíneo contribuye a un aumento de la presión intersticial en el tumor (Jain RK y Carmeliet P, 2001).

1.2.1. Modulación de la angiogénesis tumoral por células inmunes

Los estímulos que inducen la vascularización no sólo provienen de las células neoplásicas sino también de células del estroma tumoral como: Mfs, linfocitos y mastocitos, que liberan factores de crecimiento, proteasas o productos de lisis de la MEC que actúan como factores pro-angiogénicos.

Los Mfs son liberados de la médula ósea como monocitos inmaduros. Después de circular por el torrente sanguíneo, son reclutados por quimioquinas hacia los distintos tejidos diferenciándose por ejemplo en células de la microglía en el cerebro, células de Kupffer en el hígado y células de Langerhans en la piel. Estas células tienen una variedad de fenotipos y funciones, dependiendo de la situación fisiológica o patológica que hubiera estimulado su reclutamiento. Estas funciones esenciales son: el remodelamiento de tejido, la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune adquirida en la que pueden ser efectoras de la citotoxicidad y secretar un gran número de factores solubles distintos (Lamagna C y col., 2006).

Los Mfs son el principal componente del infiltrado leucocitario en los tumores y cuando se hace referencia a ellos se los menciona como

componentes del estroma tumoral con la denominación de **Mfs asociados al tumor (MAT)**. Los Mfs son reclutados por las células tumorales que liberan mediadores solubles como la proteína quimioatractante de monocitos (MCP-1), G-CSF, factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF) y VEGF. Estos factores además de ser producidos por las células neoplásicas, también son producidos por fibroblastos y células musculares lisas. Los niveles de muchas de estas proteínas en tumores humanos se correlacionan positivamente con el número de MAT presentes en los mismos (Murdoch C y col., 2004).

Los MAT secretan una variedad de proteasas que degradan la membrana basal y la MEC alrededor del área donde proliferan las células tumorales. Esto también permite la liberación de factores angiogénicos que normalmente se encuentran secuestrados en dicha matriz. De este modo permiten el escape de las células tumorales hacia el estroma circundante.

1.2.2. Modulación de la angiogénesis tumoral por factores solubles

1.2.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular

El VEGF, originalmente llamado factor de permeabilidad vascular, es el factor mejor estudiado y uno de los más importantes en el proceso angiogénico (Senger DR y col., 1983). Es una proteína homodimérica capaz

de inducir la mitosis de células endoteliales e incrementar la permeabilidad vascular. Se han descripto por lo menos siete isoformas distintas de 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos que son producidas por “splicing alternativo” desde un único gen que contiene ocho exones. Las isoformas de 121 y 165 aminoácidos son las isoformas más abundantes. Se considera al VEGF, también conocido como VEGF-A, como el miembro fundador de una familia de factores integrada también por VEGF-B, C, D, E (este último de origen viral) y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (Maglione D y col., 1991). El VEGF-A se une a dos receptores que exhiben actividad tirosina quinasa, designados VEGFR-1 y VEGFR-2 expresados en células endoteliales sanguíneas (Griffioen AW y Molema G, 2000).

Varios mecanismos pueden regular la expresión de VEGF, por ejemplo en condiciones de hipoxia el factor inducible por hipoxia (HIF-1) se une a secuencias específicas localizadas en el promotor del VEGF aumentando su transcripción. El HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, HIF-1α y HIF-1β. En presencia de oxígeno, la subunidad α se modifica por hidroxilasas induciendo su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, el HIF-1α se transloca al núcleo, se une al HIF-1β y actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta a la hipoxia en su promotor (Josko J y Mazurek M, 2004). También citoquinas como TGF-β, oncogenes como *ras* o la inactivación de genes supresores de tumor pueden inducir la expresión de VEGF (Neufeld G y col., 1999).

1.2.2.2. Óxido nítrico

Existen numerosas evidencias a cerca de la participación del NO en la progresión tumoral (Wink DA y col., 1998). Esta molécula de señalización interviene en una gran variedad de procesos como la neurotransmisión, la activación del sistema inmune, la proliferación celular y la angiogénesis. Es producido a partir de L-arginina que se escinde en NO y citrulina por la acción de una familia de isoenzimas, las óxido nítrico sintasas (NOS). Las 3 isoformas identificadas son: la neuronal (nNOS) o NOS1, la endotelial (eNOS) o NOS3, que requieren del complejo calcio-calmodulina para su activación y la inducible (iNOS) o NOS2, que es independiente de calcio. Las isoformas 1 y 3 fueron originalmente consideradas constitutivas, pero luego se describió que podían ser inducidas, mientras que la NOS2 puede expresarse constitutivamente en algunos tejidos (Moncada S y Higgs A, 1993). Estas enzimas pueden ser inhibidas de manera no selectiva por N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), éster metílico de N^{ω}-nitro-L-arginina (L-NAME) o por aminoguanidina (AG), inhibidor selectivo de iNOS.

Niveles elevados de NO pueden participar en el desarrollo de diversas patologías, entre ellas el cáncer, donde se lo vincula con la estimulación de la angiogénesis y la producción de metástasis (Wink DA y col., 1998). A comienzos de los ´90 se relacionaba la producción de bajos niveles de NO formados a partir de L-arginina, por las isoformas NOS1 y NOS3, con efectos fisiológicos, mientras que altos niveles de NO eran

consecuencia de la inducción y activación de la isoforma NOS2 en estados patológicos. Sin embargo resultados más recientes muestran un gradiente de efectos que van de la citoprotección a la citotoxicidad, que pueden producirse a niveles de NO bajos, intermedios o altos y que están en relación directa con los niveles de L-arginina en el medio (Colosanti M y Suzuki H, 2000).

Como ya mencionamos la diseminación metastásica constituye una de las etapas de la tumorigénesis. Para que se produzca es necesario el desprendimiento de las células del tumor primario y el pasaje al torrente circulatorio. Este proceso esta relacionado con la capacidad migratoria de las células transformadas. Previamente demostramos que la migración de células LMM3, derivada de un adenocarcinoma mamario murino, era inhibida por el tratamiento de las mismas con L-NAME un inhibidor no selectivo de NOS o aminoguanidina, inhibidor selectivo de NOS2, lo que demostró la participación del NO en dicho proceso (Davel L y col., 2002).

La arginina además de ser sustrato de la NOS, es también metabolizada por la arginasa, que produce urea y ornitina. Esta última es utilizada por células eucariotas para la síntesis de poliaminas necesarias para la proliferación celular. Por lo tanto la actividad de esta vía puede estar en competencia directa con la de NOS si ambas enzimas se co-expresan en el mismo tipo celular, pues comparten el mismo sustrato.

Se han caracterizado funcional y molecularmente dos isoformas de arginasa: arginasa I, localizada en el citosol hepático y arginasa II, mitocondrial y de localización ubíqua (Wu G y Morris SM, 1998). Estas enzimas requieren manganeso, en estado de catión bivalente, que es crítico para su actividad catalítica. Existen inhibidores no selectivos de las arginasas como la N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) o aminoácidos que interfieren la actividad de dichas enzimas como la valina (Ash DE, 2004).

1.2.2.3. Prostaglandina E_2

Las prostaglandinas (PGs) son moléculas lipídicas pequeñas que regulan numerosos procesos fisiológicos como la filtración glomerular, la agregación plaquetaria, la inducción del parto normal y la respuesta inmune. La producción de PGs comienza con la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A_2 en respuesta a estímulos inflamatorios. El ácido araquidónico es convertido en prostaglandina H_2 por la enzima ciclooxigenasa (COX). Generalmente, la isoforma 1 de la COX se expresa constitutivamente en diversos tejidos y actúa manteniendo procesos homeostáticos, como la secreción del mucus que protege el epiltelio gástrico. En cambio, la isoforma 2 es principalmente una forma inducible vinculada con procesos inflamatorios y otros estados patológicos como el cáncer (Smith WL y col., 1994). Existen inhibidores no selectivos de COX como la indometacina o aspirina, e inhibidores selectivos como el NS-398 que reduce la actividad de COX-2.

Uno de los productos de la COX es la PGE_2, que es sintetizada y liberada por muchas células incluyendo fibroblastos, Mfs y células malignas. Ejerce su acción por unión a receptores específicos de los que se han descripto 4 subtipos: EP_1, EP_2, EP_3 y EP_4. Los mismos pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana, acoplados a diferentes proteínas G. Los receptores EP_1 están asociados a $G_{q/p}$ y la unión con el ligando resulta en un aumento del calcio intracelular. Los receptores EP_2 y EP_4 están acoplados a proteínas G_s y su activación estimula la síntesis del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Los receptores EP_3 se expresan en tres isoformas α, β y γ que están asociadas principalmente a G_i e inhiben la actividad de adenilil ciclasa (AC) (Breyer RM y col., 2001).

Existen numerosas evidencias que vinculan a la PGE_2 con diversas etapas de la progresión tumoral. En primer lugar se ha detectado una mayor expresión de COX-2 concomitantemente con un aumento en la síntesis y liberación de PGE_2 en tejidos transformados, comparándolos con sus homólogos normales (Chulada PC y col., 2000). Estos altos niveles de PGE_2 median probablemente el crecimiento neoplásico por varios mecanismos como la inhibición de la apoptosis y la inducción de la proliferación de células tumorales (Sumitani K y col., 2001). También se le atribuye a la PGE_2 la capacidad de alterar la morfología, aumentar la motilidad y la migración de células tumorales (Gullino PM, 1995).

En nuestro laboratorio demostramos que células de dos líneas de

adenocarcinomas mamarios murinos, LM2 y LM3, expresan diferencialmente ambas isoformas de COX, que producen PGE_2 como mediador de la neovascularización inducida por estas células in vivo (Davel L y col., 2004).

2. EL SISTEMA COLINERGICO NEURONAL

Constituye junto con el Sistema Nervioso Autónomo Simpático (SNAS) y el Sistema Nervioso Somático (SNS), una de las principales divisiones anatómicas del Sistema Nervioso Autónomo (SNA). También se denomina Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático (SNAP). La vía autónoma consta de dos neuronas dispuestas en serie, mientras que en la vía eferente somática es una única moto-neurona que conecta el Sistema Nervioso Central (SNC) con la fibra del músculo esquelético (Fig. 7). Las dos neuronas de la vía autónoma se conocen como pre-ganglionar y post-ganglionar.

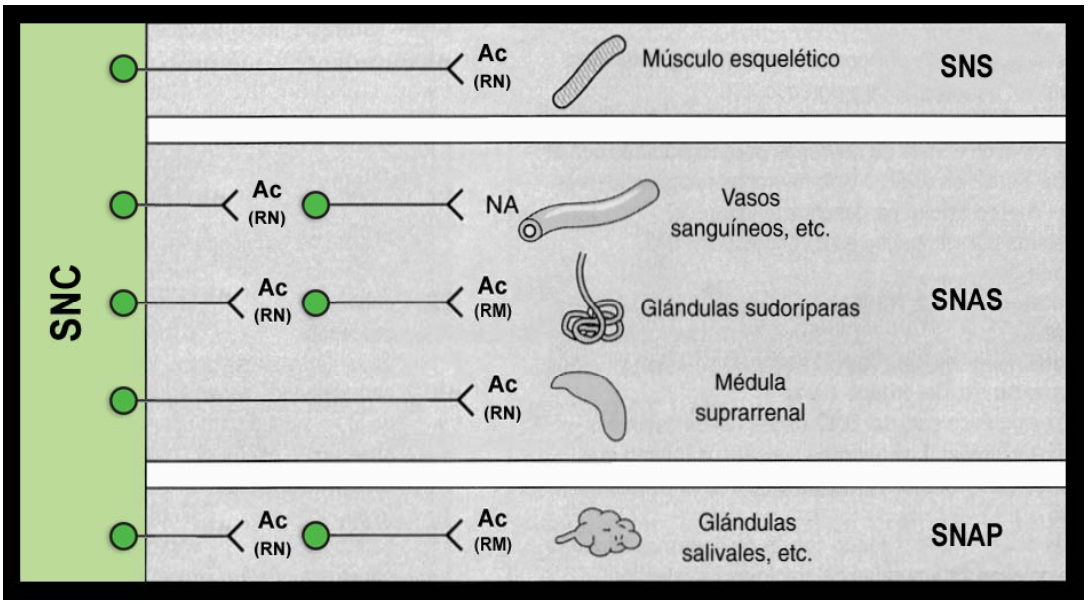

Figura 7: Vía eferente y autónoma indicando el receptor principal de acetilcolina (Ac), receptor nicotínico (RN) y receptor muscarínico (RM). Noradrenalina (NA).

Las neuronas pre-ganglionares simpáticas tienen sus cuerpos celulares en el asta lateral de la materia gris de los segmentos torácico y lumbar de la médula espinal y las fibras distales constituyen los nervios espinales que se conocen como haz simpático tóraco-lumbar. Después de salir de la médula, los axones se separan del nervio espinal como filamentos que se extienden hasta la cadena paravertebral de los ganglios simpáticos, situados a ambos lados de la columna vertebral (Fig. 8). Cada nervio pre-ganglionar se ramifica y establece contacto sináptico con las células post-ganglionares en varios ganglios simpáticos. Estos ganglios contienen los cuerpos celulares de las neuronas simpáticas post-ganglionares, cuyos axones se reagrupan en el nervio espinal.

Muchas de las fibras simpáticas post-ganglionares alcanzan sus destinos periféricos por medio de las ramificaciones de los nervios espinales; otras, destinadas a las vísceras abdominales y pélvicas, tienen sus cuerpos celulares en un grupo de ganglios pre-vertebrales de la cavidad abdominal. La inervación de la médula suprarrenal, que como respuesta al estímulo nervioso secreta catecolaminas, es la única excepción a la disposición de dos neuronas de las vías autónomas. En realidad, las células de la médula suprarrenal son neuronas simpáticas post-ganglionares modificadas y los nervios que llegan a la glándula son equivalentes a las fibras pre-ganglionares.

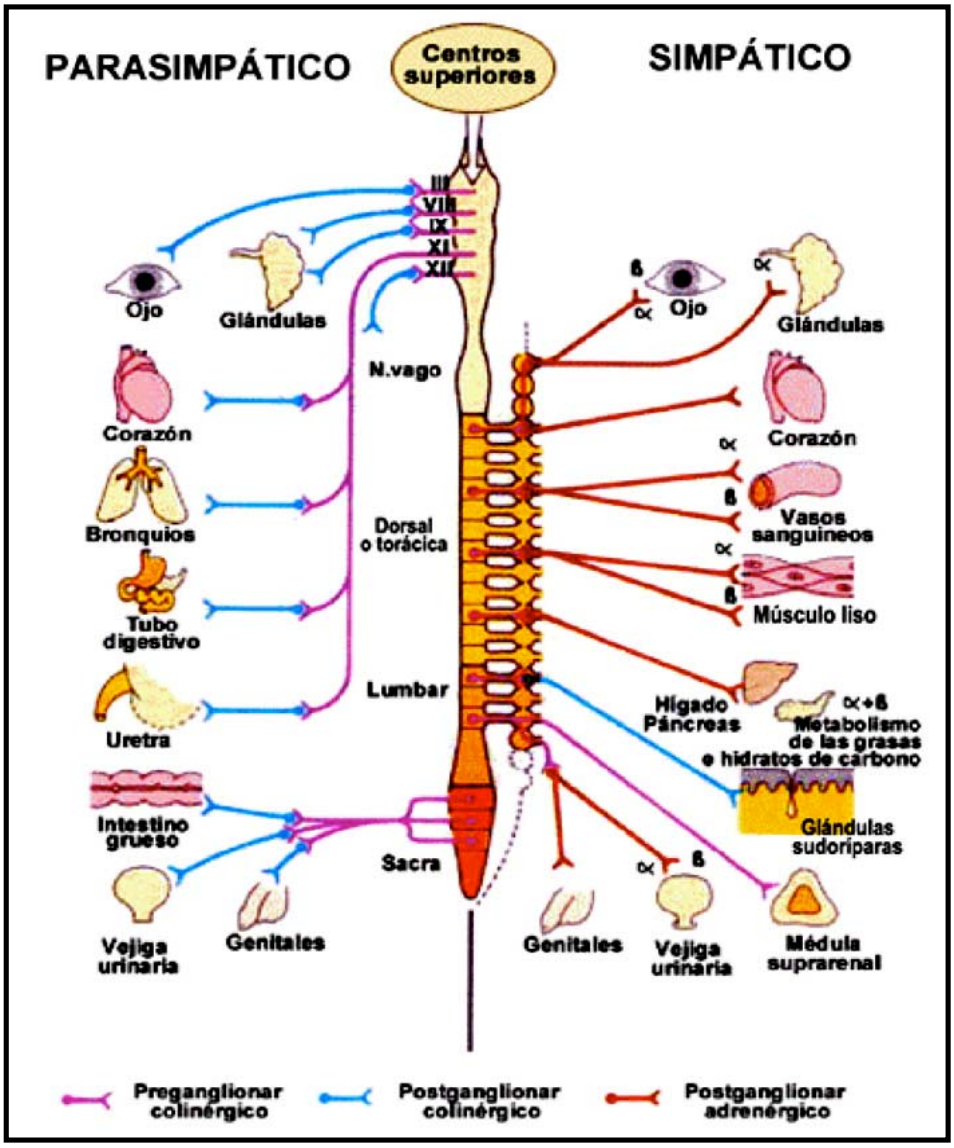

Figura 8: Estructura del Sistema Nervioso Autónomo en mamíferos identificando las fibras preganglionares y postganglionares colinérgicas y adrenérgicas.

En las vías parasimpáticas, las células post-ganglionares se encuentran en los órganos inervados y los ganglios parasimpáticos se localizan en la cabeza y el cuello (Fig. 8). Los nervios parasimpáticos se localizan en la región craneal y la región sacra de la médula espinal. El haz craneal consta de fibras pre-ganglionares en ciertos nervios craneales como el nervio ocular, los nervios faciales, el glosofaríngeo y el nervio vago. Los

ganglios están en estrecho contacto con los órganos diana y en comparación con las neuronas del SNS, las neuronas post-ganglionares son mas cortas. Las fibras parasimpáticas que inervan las vísceras pélvicas y abdominales forman el haz sacro. Estas fibras pre-ganglionares hacen sinapsis en un grupo de ganglios pélvicos dispersos y por consiguiente, las fibras cortas post-ganglionares se extienden hasta tejidos diana como la vejiga, el recto y los genitales. Los nervios pélvicos transportan tanto fibras simpáticas como parasimpáticas.

Los SNAS y SNAP pueden producir efectos opuestos en algunos tejidos como el músculo cardíaco, el músculo liso del intestino y de la vejiga; mientras que otros tejidos están regulados por una de las divisiones del SNA. Por ejemplo, las glándulas sudoríparas y la mayoría de los vasos sanguíneos sólo tienen inervación simpática y el músculo ciliar del ojo sólo tiene inervación parasimpática. El músculo liso bronquial tiene inervación parasimpática constrictora pero su tono es simpático, pues la adrenalina circulante inhibe el efecto parasimpático constrictor. Las arterias tienen inervación simpática vasoconstrictora y la vasodilatación se ejerce mediante la liberación de NO por las células endoteliales (Appenzeller O y Oribe E, 1997).

2.1. Receptores colinérgicos muscarínicos

La acetilcolina (Ac) es un neurotransmisor liberado de vesículas

desde las terminales nerviosas pre-sinápticas y se une a dos tipos distintos de receptores de la superficie celular: **nicotínicos** y **muscarínicos**, que difieren en estructura y función. El receptor nicotínico es una proteína pentamérica, cuyo nombre se debe a su afinidad por la nicotina. Ésta se une directamente a la subunidad α del receptor y estimula la abertura de un canal de sodio formado por varias combinaciones de subunidades α, β, γ, δ y ε.

Los receptores muscarínicos (RM) reciben su nombre por unir al alcaloide muscarina, derivado del hongo *Amanita muscaria*. A diferencia de los receptores nicotínicos, los RM están compuestos por una única cadena glicoproteica con siete dominios transmembrana que se acopla a proteína G (Felder CC, 1995). Estos siete dominios transmembrana hidrofóbicos están conectados por tres “loops” hidrofílicos extracelulares e intracelulares. Basados en datos de difracción electrónica de alta resolución de bacteriorrodopsina cristalizada, los siete dominios transmembrana se ensamblan en una estructura tipo anillo para formar un bolsillo donde se une el agonista (Balwin JM, 1994). El extremo amino terminal del receptor es extracelular y contiene potenciales sitios de glicosilación. El carboxilo terminal está localizado en la región citoplasmática de la membrana y contiene un residuo cisteína altamente conservado en esta familia de receptores.

Aún cuando primeramente se identificaron farmacológicamente tres

subtipos de RM, posteriormente por clonado molecular se describieron cinco subtipos denominados M_1-M_5 según el orden de su descubrimiento. La secuencia de aminoácidos de los cinco subtipos de RM está altamente conservada, con una similitud de por lo menos un 90% dentro de los siete dominios transmembrana hidrofóbicos. En la Tabla 3 se muestra comparativamente la homología secuencial y la localización de los cincos subtipos de RM conocidos hasta el momento (Bonner TI, 1989).

Especie	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Humano	460	466	590	479	532
Rata	458 (99%)	466 (95%)	589 (92%)	478 (95%)	531 (89%)
Ratón	460 (98%)			479 (95%)	
Distribución	cerebro (corteza, hipocampo), ganglios simpáticos, estómago.	corazón, cerebro, músculo liso.	músculo liso, glándulas, cerebro.	núcleo estriado, corteza cerebral, hipocampo, pulmón y glándula salival.	sustancia nigra, glándulas salivales, músculo ciliar del iris.

Tabla 3: Número de aminoácidos, porcentaje de identidad con la secuencia en humanos y localización de los distintos subtipos de receptores muscarínicos.

Se han descripto diferencias en los dominios citoplasmáticos y extracelulares hidrofílicos. Los dominios citoplasmáticos del receptor son responsables del acoplamiento a la proteína G y el análisis mutacional de

estas regiones permitió obtener información de los aminoácidos esenciales para ese acoplamiento (Wess JW, 1993).

Los receptores M_1 o neuronales se encuentran principalmente en el SNC, en las neuronas periféricas y en las células parietales gástricas. Median acciones excitatorias como por ejemplo, la estimulación de los ganglios simpáticos y de las neuronas centrales mediada por Ac. Esta excitación se produce por una disminución de la conductancia del potasio, que provoca la despolarización de la membrana. Estos receptores también modulan el aumento de la secreción de ácido gástrico. Su antagonista selectivo es la pirenzepina.

Los receptores M_2 o cardíacos se encuentran en el corazón y también en las terminaciones pre-sinápticas de las neuronas periféricas y centrales. Ejercen efectos inhibitorios, principalmente aumentando la conductancia del potasio e inhibiendo la abertura de los canales de calcio. Estos receptores se bloquean selectivamente con gallamina, metoctramina o AF-DX116.

Los receptores M_3 modulan la secreción de glándulas salivales, bronquiales y sudoríparas; la contracción del músculo liso visceral y la relajación del músculo liso vascular como resultado de la liberación de NO de las células endoteliales cercanas. El antagonista selectivo es el metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP) (Caulfield MP y Birdsall NJM, 1998; Appenzeller O y Oribe E, 1997).

Los receptores M_4 se distribuyen en el cerebro y con alta concentración en el hipocampo, corteza cerebral y particularmente en el núcleo estriado. También se han encontrado en pulmón y glándulas salivales. Dichos receptores parecen modular la actividad de dopamina en tractos motores y actúan como auto-receptores inhibitorios en el núcleo estriado (Bymaster FP y col., 2003).

Los receptores M_5 se identificaron hace más de una década y su localización se consideró, en aquel entonces, restringida al SNC. Actualmente se considera que participan en la transmisión dopaminérgica. Posteriormente, su identificación en glándulas salivales y en el músculo ciliar del iris sugiere una distribución mas amplia, pero estos datos son dispersos y por lo tanto, requieren mayores evidencias experimentales (Eglen RM y Nahorski SR, 2000)

2.1.1. Transducción de señales

La transducción de señales está determinada por elementos estructurales de los RM que permiten por un lado, la unión selectiva del agonista y por otro, la de una molécula transductora que es la proteína G. Esta proteína es un heterotrímero formado por una subunidad α y un complejo $\beta\gamma$, que da especificidad para el acoplamiento a un efector determinado. Al unirse el agonista al receptor, la subunidad α cambia de conformación y reemplaza GDP por GTP separándose del complejo $\beta\gamma$. La

subunidad α unida a GTP y el dímero $\beta\gamma$ interaccionan entonces con distintos sistemas efectores, que en la actualidad incluyen a la adenilil ciclasa (AC), guanilil ciclasa (GC), fosfodisterasas, fosfolipasa A_2, fosfolipasa C (PLC), fosfatidil inositol 3-quinasas (PI3K), etc. inhibiendo o activando la producción de segundos mensajeros como monofofato cíclico de adenosina (AMPc), monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), diacilglicerol (DAG), 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y ácido fosfatídico. También es sabido que la unión del agonista promueve la abertura de los canales de calcio que a su vez activan diversas vías enzimáticas (Felder CC, 1995; Marinissen M y Gutkind S, 2001).

Se ha demostrado que la subunidad $\beta\gamma$ juega un papel activo en la señalización. Por ejemplo, en células de mamíferos la subunidad $\beta\gamma$ es capaz de activar a la PLCβ y desencadenar el metabolismo de los fosfatidilinositoles (Camps M y col., 1992, Katz A y col., 1992).

Clásicamente, los agonistas colinérgicos muscarínicos como la Ac o su análogo sintético el carbacol (CARB) producen al unirse a receptores M_1, M_3 y M_5, el acoplamiento a proteína $G_{q/11}$ y la activación de PLC (Fig. 9) (Matsui M y col., 2000). Esta enzima hidroliza fosfolípidos de inositol, liberando IP_3 y DAG.

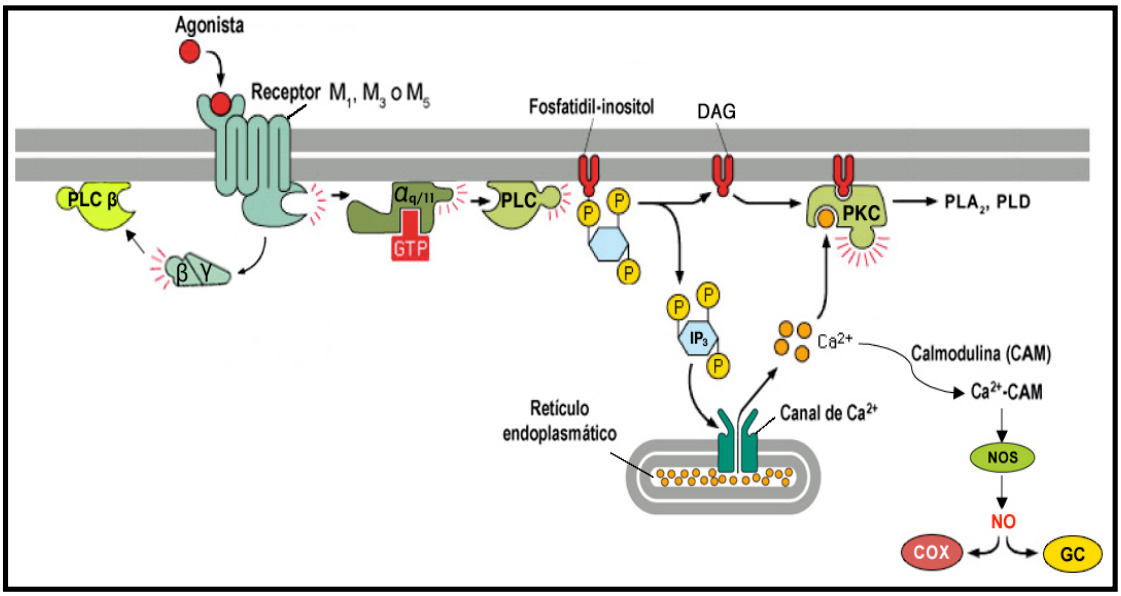

Figura 9: Vía clásica de señalización de los receptores M_1, M_3 y M_5. PLC: fosfolipasa C, PLA_2: fosfolipasa A_2, PLD: fosfolipasa D, DAG: diacilglicerol,

El incremento de calcio intracelular desencadenado por el IP_3, aumenta la actividad de diversas enzimas entre las que se encuentra la NOS que produce NO a partir de arginina. El NO puede a su vez, estimular a diversas hemoproteínas como la GC y la COX. Es sabido que uno de los productos de la COX, la PGE_2, puede a su vez modular la actividad de NOS, ejerciendo un efecto retroalimentador. La arginina, también puede ser metabolizada por las arginasas, que como ya mencionamos producen urea y ornitina.

El DAG producido por PLC activa a la enzima proteína quinasa C (PKC), considerada como un punto de “cross talk” entre distintas vías de señalización. Modelos de expresión de RM en células aisladas, han revelado

que la activación de los mismos puede estimular múltiples enzimas efectoras simultáneamente incluyendo fosfolipasa A_2, C y D, así como también tirosinas quinasas y una nueva clase de canales de calcio insensibles al voltaje (Felder CC, 1995, Matsui M y col, 2000).

Los subtipos M_2 y M_4 se asocian a una proteína Gi y producen la inhibición de AC, provocando una disminución de la concentración de AMPc (Fig. 10) (Matsui M y col., 2000). Estos receptores también son capaces de activar canales de potasio y modular la actividad de canales de calcio en ciertos tipos celulares (Caulfield MP y Birdsall NJM, 1998)

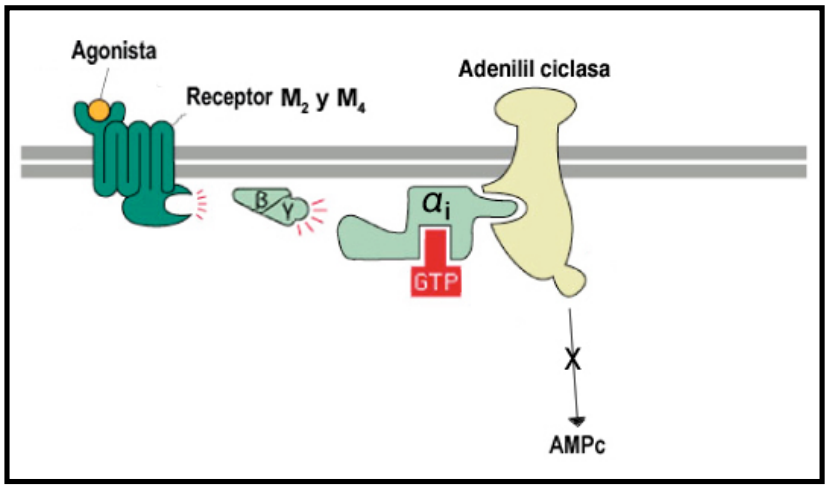

Figura 10: Vía clásica de señalización de los receptores M_2 y M_4.

Sin embargo, recientemente ha sido demostrado que muchas de las respuestas celulares mediadas por los receptores acoplados a proteína G no implican sólo la generación de segundos mensajeros convencionales, sino

que resulta en una integración intrincada de vías de señalización intracelular. Además, se han identificado nuevos efectores de dichos receptores que son independientes de la proteína G, por lo tanto, esto cambia la visión sobre los efectores asociados a receptores acoplados a proteína G (Marinissen M y Gutkind S, 2001). Por ejemplo, Jiménez E y Montiel M (2005) demostraron que la estimulación de RM en células tumorales de mama humana de la línea MCF-7 activó una vía de señalización que incluye a la familia de las tirosinas quinasas PKC-zeta, PI3K y Src que conducen a la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) /quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que células de adenocarcinomas mamarios murinos, LM2 y LM3, expresan constitutivamente RM y su activación con el agonista muscarínico CARB induce un incremento en la proliferación celular dependiente de la concentración que es bloqueada cuando las células son tratadas con inhibidores de la actividad de tirosinas quinasas (Español AJ y Sales ME, 2004; Español AJ, 2005).

3. EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL

Se ha considerado a la Ac como un ejemplo clásico de neurotransmisor en ambas divisiones del SNA (simpático y parasimpático). Sin embargo, también está presente en organismos que no poseen un sistema nervioso organizado como algas, protozoos y plantas (Wessler I y col., 2001)

En humanos tanto la Ac como la enzima que la sintetiza, la colina acetil-transferasa han sido detectadas en células epiteliales de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario; células de la epidermis, la pleura y el pericardio, también en células musculares e inmunes (monocitos, mastocitos y Mfs). Además, se ha detectado la presencia de acetilcolinesterasa, RN y RM en dichos tejidos. Por lo tanto el **Sistema Colinérgico no Neuronal** (SCnN) se considera constituido por la Ac, sus receptores y las enzimas que la sintetizan y la degradan presentes en células que no tienen origen nervioso; además se considera que la Ac en este sistema, actúa localmente como un mediador autócrino o parácrino. Sus efectos se producen por unión a los receptores de la célula blanco, interactuando con proteínas efectoras de señalización intracelular (Wessler y col., 2003).

La Ac no neuronal puede ser almacenada en organelas especializadas de donde se libera en respuesta a una señal específica propagada pero también puede ser sintetizada constitutivamente y liberada

por células no neuronales que han desarrollado mecanismos, para almacenar y regular la liberación de esta molécula (Wessler I y col., 1998).

En la Tabla 4 se resumen las diferencias, que se conocen hasta la actualidad entre el sistema colinérgico neuronal y el no neuronal.

Sistema Colinérgico Neuronal		*Sistema Colinérgico no Neuronal*
❖ **Terminal nervioso**	**SÍNTESIS**	❖ **Célula entera**
❖ **Vesículas pre-sinápticas**	**ALMACENAMIENTO**	❖ **Citosol(?)**
❖ **Exocitosis por diferencia de potencial**	**LIBERACIÓN**	❖ **Transportadores de cationes orgánicos (OCTs)**
❖ **Localización sináptica**	**RECEPTORES**	❖ **Expresados uniformemente**
❖ **Corta**	**ACCIÓN**	❖ **Continua**
❖ **Alta**	**ACTIVIDAD DE COLINESTERASA**	❖ **Baja**
❖ **Rápida**	**ELIMINACIÓN**	❖ **Lenta**

Tabla 4: Diferencias entre el sistema colinérgico neuronal y no-neuronal.

El conocimiento acerca de las funciones biológicas del SCnN ha crecido gradualmente. La Ac liberada por las células no neuronales, a través de mecanismos autócrinos o parácrinos, puede regular funciones celulares básicas como el contacto célula-célula, la expresión génica, la proliferación, la locomoción, la migración, la diferenciación, la organización del citoesqueleto, la actividad ciliar, la actividad eléctrica, la secreción, la

absorción y la respuesta inmune (Grando SA, 1997; Wessler I y col., 1999; Kawashima K y Fujii T, 2000).

4. LINFOANGIOGÉNESIS

4.1. El sistema linfático

Está formado por los **órganos linfáticos** y la **vasculatura linfática**. Los órganos linfáticos se clasifican en:

- centrales: timo, médula ósea e hígado fetal

- periféricos: bazo, ganglios linfáticos y tejidos asociados a mucosas, entre los que se encuentran las amígdalas, las placas de Peyer del íleon y el apéndice.

4.1.1. Órganos linfáticos centrales

Los órganos linfáticos centrales son los lugares en los que se produce mayoritariamente la linfopoyesis. En ellos, los linfocitos se diferencian a partir de las células madres linfoides, proliferan y dan lugar finalmente a células maduras funcionales. En los mamíferos, las células T se originan en la **médula ósea** y maduran en el **timo**, mientras que las células B se originan y maduran en el **hígado fetal** y en la médula ósea en el adulto. En los órganos linfoides centrales los linfocitos adquieren su repertorio de receptores específicos para el antígeno, que utilizarán posteriormente para reconocerlo a lo largo de su existencia. Las células son seleccionadas de tal forma que presentan tolerancia para los antígenos propios y por lo tanto, cuando son liberadas hacia la periferia, sólo reconocen a los antígenos

extraños. Una vez que los linfocitos T y B completaron la maduración, entran al torrente sanguíneo y migran a los órganos linfáticos periféricos.

El timo está dividido en lobulillos y está situado en la cavidad torácica, por encima del corazón. Cada uno de estos lobulillos está formado por una región cortical, que contiene linfocitos inmaduros estrechamente agrupados, células epiteliales denominadas reticulares que rodean a grupos de linfocitos y Mfs. También se distingue una región medular que está formada por linfocitos maduros y células epiteliales medulares. Esta disposición denota la existencia de un gradiente de diferenciación desde la corteza hasta la médula. Es decir que una vez que los linfocitos maduran entran a la médula y de allí pasan a la circulación sanguínea donde son transportados a los órganos linfáticos periféricos (Roitt IM, 2005).

Los precursores de los linfocitos B se desarrollan directamente en los islotes de células hematopoyéticas en el hígado fetal. La producción de células B por el hígado declina y es asumida en la vida adulta, en su mayor parte, por la médula ósea (von Boehmer H, 2000; Hardy RR y Hayakawa K, 2001).

4.1.2. Órganos linfáticos periféricos

En estos órganos los linfocitos pueden interactuar con las células accesorias presentadoras de antígenos. En el **bazo** las células del sistema

inmune responden a los antígenos transportados por la sangre, mientras que los **ganglios linfáticos** protegen al organismo frente a los antígenos que transporta el sistema linfático procedentes de la piel o de las mucosas internas. En ambos casos la respuesta frente a los antígenos consiste en la secreción de anticuerpos hacia la circulación y en reacciones locales mediadas por células.

El **tejido linfático asociado a mucosas** ejerce una protección frente a los antígenos que penetran directamente en el organismo a través de los epitelios mucosos y en él se produce el primer encuentro entre un antígeno que penetra desde el exterior y a través de las mucosas interactúa con las células inmunes (Roitt IM, 2005).

4.1.3. El sistema circulatorio linfático

El sistema circulatorio sanguíneo es cerrado y está formado por una bomba central, el corazón y una red vascular con arterias y venas. Mientras que el **sistema vascular linfático** es un sistema de drenaje cuyos vasos más pequeños, los **capilares linfáticos**, terminan en extremos ciegos y conducen un líquido claro, llamado **linfa**, desde los espacios intersticiales periféricos pasando luego a los **vasos linfáticos mayores**. Éstos por último, convergen en dos grandes conductos linfáticos: el torácico y la vena linfática derecha, que desembocan en las grandes venas de la base de cuello.

En la mayor parte de los tejidos y órganos los capilares sanguíneos están acompañados por un plexo de capilares linfáticos, es decir que el sistema linfático se localiza en forma paralela al sistema circulatorio sanguíneo.

A lo largo del curso de los vasos linfáticos se sitúan los ganglios linfáticos. La linfa que entra en los ganglios a través de los vasos linfáticos aferentes se reparte dentro de ellos para ser filtrada a través de un sistema laberíntico de diminutos canales revestidos de endotelio y células fagocíticas. La linfa entonces sale del ganglio a través de los vasos linfáticos eferentes quedando limpia de material extraño a medida que se filtra por los ganglios linfáticos. Muchos linfocitos que desde la sangre habían entrado en los ganglios, pasan a la linfa eferente y de esta manera son devueltos a la circulación sanguínea (Roitt IM, 2005).

Por lo tanto, la función principal del sistema vascular linfático es devolver a la sangre el líquido y las proteínas plasmáticas que se escapan de la circulación, los linfocitos del contingente re-circulante y añadir a la sangre las inmunoglobulinas formadas en los ganglios linfáticos.

Los capilares linfáticos consisten en una única capa de células endoteliales no fenestradas que se apoyan en una lámina basal incompleta y carecen de pericitos (Fig. 11).

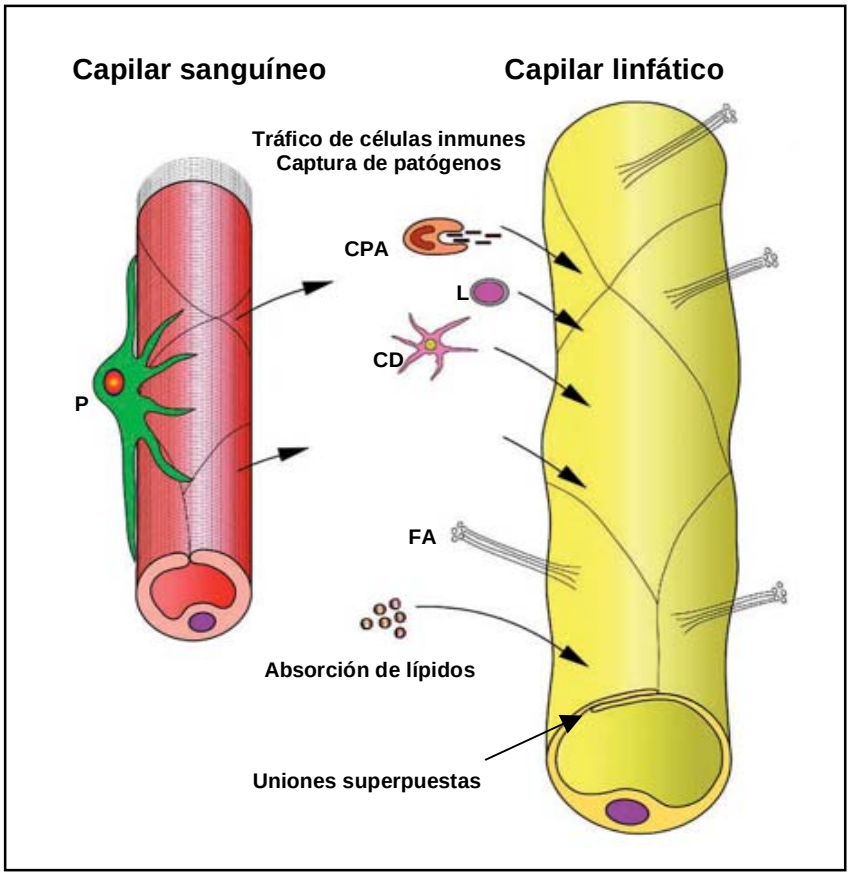

Figura 11: Características estructurales y funcionales de la vasculatura linfática en comparación con la vasculatura sanguínea. P: pericito, LB: lamina basal, CPA: célula presentadora de antígeno, L: linfocito, CD: célula dendrítica, FA: filamento de anclaje.

Además, generalmente poseen un lumen más amplio e irregular que los capilares sanguíneos. Una característica única de los capilares linfáticos es que las uniones intercelulares se forman por la superposición de las células endoteliales linfáticas adyacentes. Un incremento en el fluido intersticial causa que estas uniones se abran, permitiendo el fácil pasaje de fluido y partículas hacia el vaso. Una vez que el fluido entra al lumen, la diferencia de presión a través de la pared del vaso disminuye y las uniones

comienzan a cerrarse, previniendo que el flujo retrógrado vuelva al intersticio. La función del capilar linfático depende de su unión a la MEC. Las células endoteliales linfáticas se conectan al colágeno intersticial por filamentos de anclaje, compuesto por fibras elásticas, las cuales preservan la funcionalidad de los linfáticos cuando aumenta la presión intersticial previniendo el colapso de los mismos (Pepper MS y Skobe M, 2003).

La linfa recorre el sistema linfático valiéndose de una débil acción muscular, de la pulsación de las arterias cercanas y del movimiento de las extremidades (Jeltsch M y col., 2003).

Los vasos linfáticos mayores, a pesar de diferir en varios aspectos de los vasos sanguíneos, poseen características comunes. Ambos sistemas vasculares tienen un origen embrionario común, están cubiertos por un endotelio y están rodeados por una estructura de músculo liso (Witte MH y col., 1997). Además ciertos factores que estimulan el crecimiento de vasos sanguíneos también promueven el crecimiento linfático (Kubo H y col., 2002).

Los vasos linfáticos se desarrollan inmediatamente después que los vasos sanguíneos, ciertas células endoteliales venosas responden a señales que inducen linfáticos, diferenciándose a células de ese linaje y emitiendo brotes linfáticos. Este proceso de crecimiento de vasos linfáticos se denomina **linfoangiogénesis** (Fig. 12).

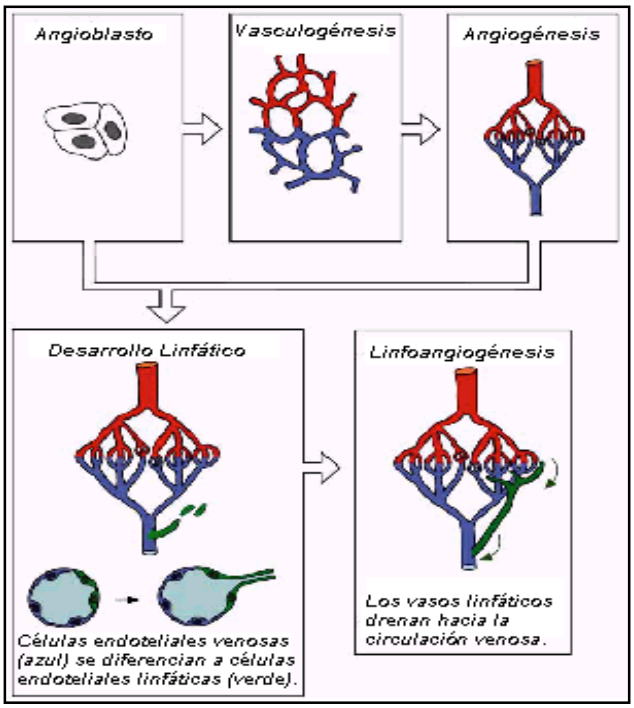

Figura 12: Esquema ilustrativo de la formación de los vasos sanguíneos y linfáticos.

Se ha demostrado que los vasos linfáticos también participan del proceso metastásico, pero a comparación de los vasos sanguíneos, poco se sabe acerca de la biología de los vasos linfáticos en tumores, la regulación de la linfoangiogénesis tumoral o los mecanismos que determinan las interacciones de las células tumorales con los vasos linfáticos. Existen evidencias de que las células tumorales se pueden diseminar a través del sistema linfático hacia los ganglios linfáticos y como éstos drenan en la circulación sanguínea, llegan finalmente a otros órganos distantes del tumor primario.

La dificultad para detectar vasos linfáticos se debe a la falta de marcadores específicos para dichos vasos. En los últimos años se han identificado algunas moléculas que podrían ser utilizadas como marcadores linfáticos. Entre ellos se encuentran factores de crecimiento linfoangiogénicos y receptores responsables de la generación y la conservación del sistema linfático (Tabla 6) (Saharinen P y col., 2004; Stacker SA y col., 2002b).

El primer marcador molecular clonado y un importante regulador en el desarrollo del sistema vascular linfático es el receptor 3 para VEGF (VEGFR-3). Dos miembros de la familia de VEGF, el VEGF-C y el VEGF-D, se unen y activan a VEGFR-3 sobre el endotelio linfático. El procesamiento proteolítico de estos factores es un importante regulador para la unión al receptor y para su actividad biológica.

Marcadores Linfoangiogénicos	*Factores de crecimiento linfoangiogénicos*
❖ **LYVE-1**	❖ **VEGF-C**
❖ **Prox-1**	❖ **VEGF-D**
❖ **Podoplanina**	
❖ **Desmoplakina**	
❖ **VEGFR-3**	
❖ **Neuropilina-2**	

Tabla 6: Marcadores que se utilizan para identificar a los vasos linfáticos y factores de crecimiento linfoangiogénicos.

A diferencia de los demás miembros de la familia, el VEGF-C y VEGF-D tienen extremos amino y carboxilo-terminal que son clivados proteolíticamente luego de ser secretados. Un procesamiento gradual aumenta la afinidad de unión al receptor de VEGF-C y VEGF-D y solamente la forma completamente procesada se puede unir al VEGFR-2 (Karkkainen M y Alitalo K, 2002).

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

Hipótesis

Los Mfs son células efectoras de la inmunidad innata y su actividad está regulada por diversos mediadores biológicos entre los que se encuentra la acetilcolina que ejerce acciones autócrinas o parácrinas. Estas células en forma conjunta con otras del estroma son el principal componente del infiltrado tumoral y pueden ejercer funciones tanto a favor como en contra del crecimiento tumoral. En este estado patológico, la angiogénesis y la linfoangiogénesis son procesos de formación de vasos, que cumplen un rol central tanto en el crecimiento como en la metástasis de neoplasias. El tumor mamario murino espontáneo y metastásico LMM3 está poco infiltrado por células inmunes y por lo tanto es factible que los macrófagos presentes en el peritoneo de los portadores de este tumor cumplan funciones reguladoras en los procesos de generación de vasos durante la tumorigénesis.

Objetivos Generales y Específicos

- Investigar el papel de los Mfs provenientes de portadores del tumor LMM3, como moduladores y/o efectores de la angiogénesis.
- Estudiar la participación de los productos de las enzimas NOS, arginasa y COX en el efecto angiogénico de los Mfs de portadores de tumor.
    - Caracterizar la expresión y función de NOS en los Mfs.
    - Caracterizar la expresión y función de arginasa en los Mfs.

- o Caracterizar la expresión y función de COX en los Mfs.

- ❖ Determinar el papel de los Mfs provenientes de portadores del tumor LMM3 como moduladores y/o efectores de la linfoangiogénesis.
- ❖ Evidenciar la participación del sistema colinérgico no neuronal para modular la angiogénesis y la linfoangiogénesis inducida por los Mfs de portadores del tumor LMM3.
  - o Determinar la función de los RM.
  - o Caracterizar la expresión de RM.
  - o Identificar las enzimas efectoras de la activación muscarínica.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

Se utilizaron células de la línea LMM3, derivada de una metástasis pulmonar del adenocarcinoma mamario murino M3 de aparición espontánea en la cepa BALB/c previamente caracterizadas en el Instituto de Oncología A. H. Roffo (Urtreger A y col., 1997). Se realizaron pasajes seriados por despegado de monocapas confluentes con una solución de tripsina 0,25 % y EDTA 0,02 % en PBS libre de calcio y magnesio respectivamente, reemplazándose todos los días el medio de cultivo (D-MEM) con 5% de suero fetal bovino (SFB). La viabilidad celular se evaluó por el ensayo de exclusión de azul Trypan y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor al 90 %. La ausencia de micoplasma se determinó por el método de Hoechst (Chen TR, 1977).

2. ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS IN VIVO

Se realizó un ensayo singeneico en el que se inocularon hembras BALB/c por vía intradérmica (i.d.) en ambos flancos con $2x10^5$ células LMM3 o un co-cultivo de células LMM3 con MfsT o MfsN en dos dosis ($2x10^3$ y $2x10^4$) en un volumen total de 0,1 ml de medio D-MEM sin SFB y se agregó azul Trypán para localizar el sitio de inoculación (Monte M y col., 1997). En los ensayos de angiogénesis inducida por Mfs se inyectaron de igual forma $3x10^5$ MfsN o MfsT.

Luego de 5 días, los animales se sacrificaron con éter y se separó por disección la piel de los tejidos adyacentes. La respuesta vascular se observó en la cara interna de la piel con la ayuda de un microscopio de disección WILD. El método utilizado para cuantificar la respuesta angiogénica se basa en la determinación de la densidad de vasos, expresada como número de vasos/mm^2 de piel. Para ello se fotografiaron los sitios de inoculación, se proyectaron sobre una cuadrícula y se contó el número total de vasos (Fig. 13). La densidad de vasos (δ) se determinó por la fórmula:

$$\delta = \frac{\Sigma \text{ número de vasos en cada cuadrado}}{\text{número total de cuadrados}}$$

Para estudiar la participación de las enzimas NOS, arginasa y COX en la angiogénesis, las células LMM3 o los Mfs fueron tratados previamente con N^G monometil L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M o éster metílico de N^{ω}-nitro-L-arginina (L-NAME) $2x10^{-3}$, inhibidores no selectivos de NOS; aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, inhibidor selectivo de NOS2; N^{ω} hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, inhibidor no selectivo de arginasas; valina $5x10^{-2}$ M, aminoácido que interfiere la vía de las arginasas; indometacina 10^{-6} M, inhibidor no selectivo de COX y N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil)-metanosulfonamida (NS-398) 10^{-5} M, inhibidor selectivo de COX-2, agregados durante 30 min. Luego las células se centrifugaron a 1.000 rpm y se reemplazó el medio por D-MEM fresco.

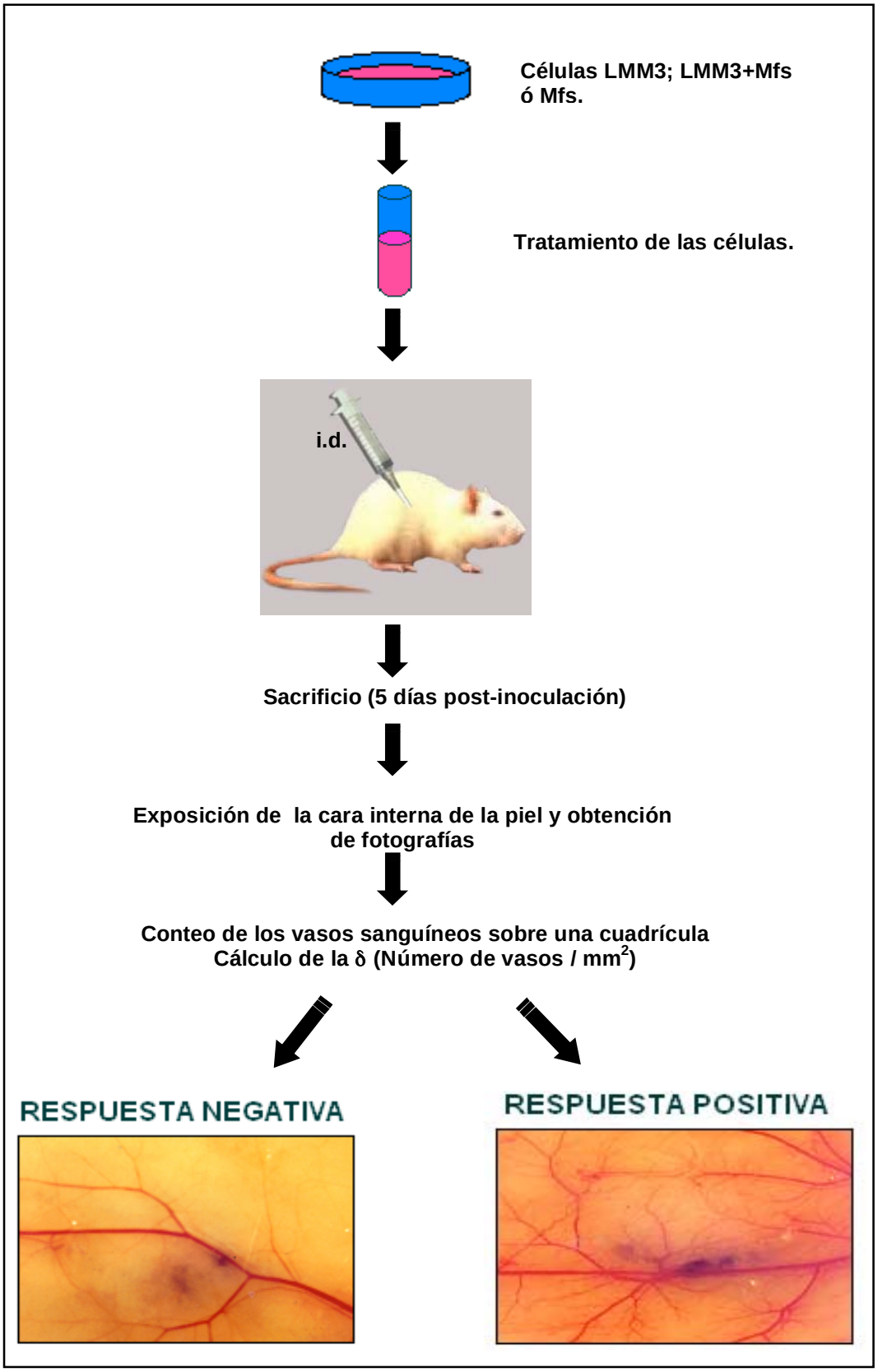

Figura 13: Esquema del ensayo de angiogénesis in vivo en un modelo singeneico.

3. ANIMALES PORTADORES DE TUMOR

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 3 meses de edad, provistas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Los animales fueron endocriados y mantenidos siguiendo los procedimientos indicados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 1986). Los ratones portadores de tumor se obtuvieron por inoculación subcutánea (s.c.) en el flanco de $4x10^5$ células LMM3 en 0,1 ml de D-MEM sin SFB. Para la obtención de células peritoneales, los animales se sacrificaron a los 5, 7 y 14 días post-inoculación. Cuando fue posible se controló por palpación el sitio inoculado.

4. PURIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS

Se inocularon 5 ml de medio D-MEM con 10% de SFB en forma intraperitoneal (i.p.). Por lavado peritoneal se recuperaron suspensiones celulares que se dejaron adherir al plástico en placas de Petri durante 2 h. a 37°C. Luego de realizar dos lavados con PBS, las células adheridas (Mfs) provenientes de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor de 5, 7 y 14 días (MfsT5, MfsT7 y MfsT14) se recuperaron por raspado y se resuspendieron en medio de cultivo (Fig. 14). La viabilidad de las células se determinó por el ensayo de exclusión con azul Trypán y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor al 95%.

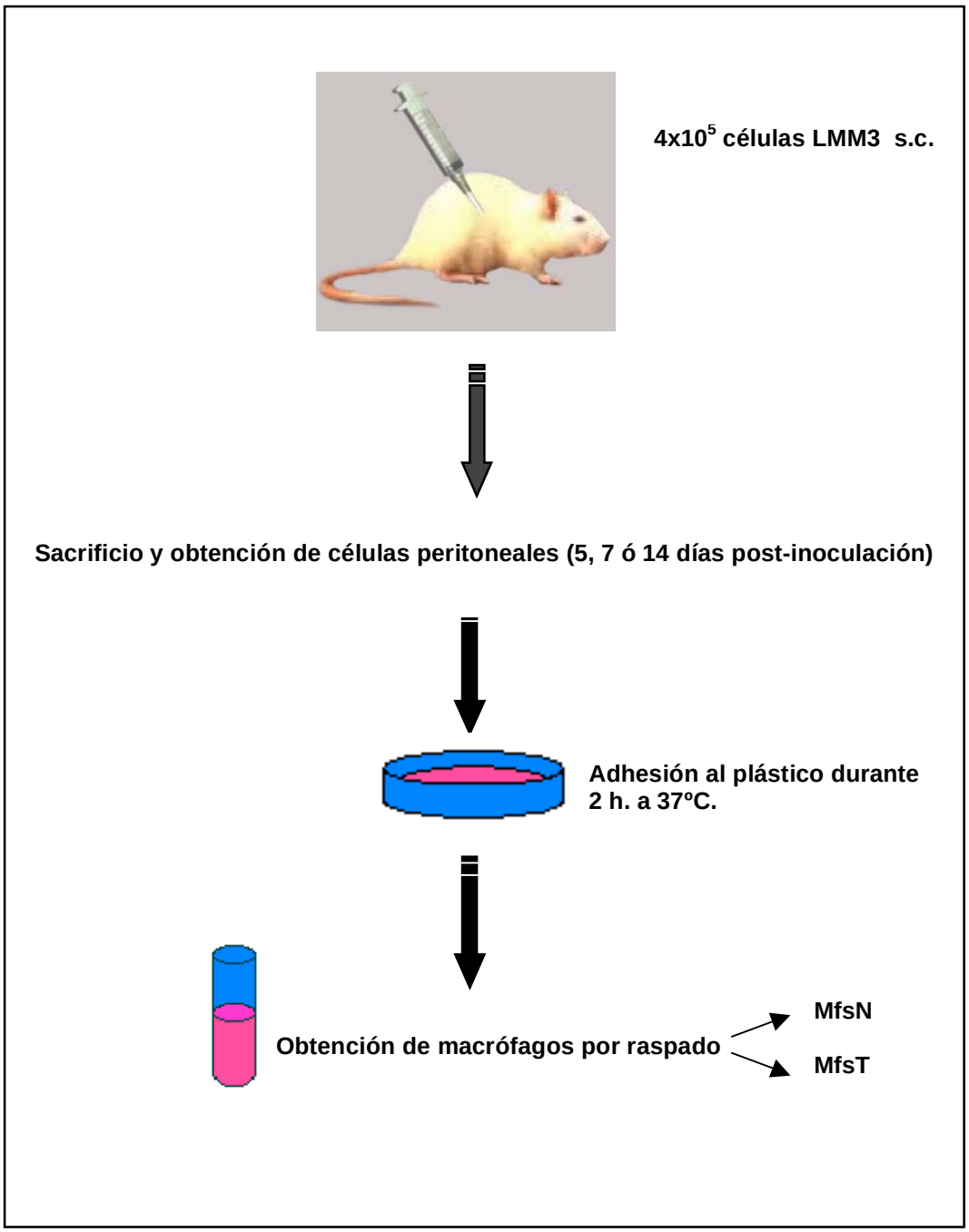

Figura 14: Obtención de animales portadores de tumor y de Mfs.

5. INMUNODETECCIÓN DE LOS MARCADORES ANGIOGÉNICOS FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR-A Y PECAM-1

5.1. Preparación de homogenatos de piel

Se obtuvieron muestras de piel del sitio de inoculación desprovistas de pelo, de animales de 5, 7 y 14 días de portación del tumor LMM3 (PT5, PT7 y PT14) y piel proveniente de animales sin tratamiento (PN).

De los grupos anteriores también se obtuvieron los Mfs provenientes de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor de 5, 7 y 14 días (MfsT5, MfsT7 y MfsT14) que fueron inoculados en hembras normales en ausencia o en presencia de células LMM3 en una relación LMM3:Mfs 100:1. Para obtener los homogenatos se sacrificaron los animales 5 días después de la inoculación y se disecó la piel que rodea al sitio inoculado. Las muestras se homogeneizaron en buffer: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH: 7,4, EDTA 1 mM, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, deoxicolato de sodio 1%, leupeptina 5 μg/ml, aprotinina 5 μg/ml a 4°C. Los homogenatos se guardaron a –80°C y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

5.2. Preparación de lisados celulares

La producción de VEGF-A se determinó también en los sobrenadantes que se obtuvieron luego de 24 h. de cultivo de las células LMM3 ($2x10^6$), Mfs ($3x10^6$) y en lisados celulares. Estos últimos se prepararon a partir de MfsN y MfsT lavados dos veces con PBS frío, centrifugados a 900 rpm y resuspendidos en 800 μl de buffer de lisis: NaCl 100 mM, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, Tritón X-100 1%, PMSF 1 mM, leupeptina 10 μg/ml, aprotinina 10 μg/ml. Después de 1 h. en hielo, se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. a 4°C. Las muestras se conservaron a –80 ºC y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

5.3. Ensayos de Western blot

Se sembraron 30 μg de proteínas por calle de los homogenatos de piel, lisados celulares y sobrenadantes de cultivo, obtenidos en 5.1. y 5.2. Luego se sometieron a una electroforesis en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% ó 10%. También se sembraron estándares de peso molecular conocido. Las muestras se sometieron a una electroforesis a 80 v en un gel concentrador y a 100 v en un gel separador (Gel concentrador: Tris-HCl 0,125 M, SDS 0,1%, acrilamida/bis acrilamida 13%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH:6,8. Gel separador de SDS-PAGE al 7,5 %: Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1%,

acrilamida/bis acrilamida 25%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH:8,8. Gel separador de SDS-PAGE al 10 %: Trís-HCl 0,375 M; SDS 0,1%; acrilamida/bis acrilamida 30%; persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH:8,8).

Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron por el método líquido a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h. aproximadamente a 100 v en buffer de transferencia: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH: 8,2.

Para verificar la eficiencia de la transferencia las membranas de nitrocelulosa se colorearon con rojo Ponceau. Después de varios lavados con Tris-HCl 20 mM y NaCl 500 mM (TBS) se incubaron las mismas con solución de bloqueo TBS con Tween 20 al 0,05% (TBS-T) que contiene 5% de leche descremada durante 1 h. a temperatura ambiente.

Posteriormente las membranas se incubaron durante 18 h. con los anticuerpos policlonales obtenidos en cabra contra VEGF-A o PECAM-1, ambos de origen murino, diluido 1:100 y 1:500 en TBS-T con 5% de leche descremada respectivamente. Luego de cuatro lavados con TBS-T se agregó el segundo anticuerpo policlonal contra IgG de cabra hecho en conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:4000 en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1 h. a 37°C con agitación. Después de lavar tres veces con TBS-T, una vez con TBS y una vez con buffer sustrato:

Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; $MgCl_2$ 5 mM, pH 9,5; se procedió a incubar con los sustratos fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil,toluidina (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) en buffer sustrato. En todos los casos, como control negativo se sembró una calle que no fue incubada con el primer anticuerpo. Los pesos moleculares de las bandas proteicas se identificaron por comparación de sus Rf con los estándares de peso molecular conocidos. La cuantificación se realizó por densitometría en un analizador de imágenes computarizado. La expresión de la proteína gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de carga constante en cada calle en todos los ensayos realizados. La concentración proteica de las bandas se expresó en unidades de densidad óptica por mm^2 (D.O./mm^2).

5.4. Inmunohistoquímica de PECAM-1

La expresión de PECAM-1 (CD31), marcador de neovasos, se evaluó también en cortes histológicos de 5 μm procedentes de muestras de piel normal y de animales portadores de tumor, fijados en solución de formaldehído al 4% en PBS. Posteriormente las muestras se deshidrataron por medio de pasajes sucesivos por concentraciones crecientes de alcohol, se aclararon en xilol y fueron embebidos en parafina. Luego los cortes fueron montados en un medio sintético, se desparafinaron 3 veces en xilol y se hidrataron mediante pasajes

sucesivos por concentraciones decrecientes de alcohol (100°-96°-70°) hasta sumergirlos en PBS.

La recuperación antigénica, se llevó a cabo sumergiendo los cortes en una solución de tripsina 0,01% durante 15 min. a temperatura ambiente seguido por activación al microondas, sumergidos en buffer citrato: 0,25 M ácido cítrico; 0,5 M fostato de sodio, pH 5; durante 3 ciclos de 1 min. y medio cada uno a 750 w.

El bloqueo de la peroxidasa endógena se llevó a cabo sumergiendo los cortes durante 10 min. en peróxido de hidrógeno de 30 vol. al 7 % en metanol. Los antígenos inespecíficos se bloquearon por inmersión de los cortes en leche descremada al 5% en PBS. Después de cada paso, los cortes se lavaron con PBS durante 5 min. Se procedió a la incubación en cámara húmeda, con el primer anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra PECAM-1 de origen murino diluido 1:100 en PBS, durante 1 h. a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo policlonal biotinilado, obtenido en conejo contra IgG de cabra, diluido 1:250 en PBS durante 1 h. a temperatura ambiente en cámara húmeda. El sistema de revelado consistió en streptavidina conjugada con peroxidasa y diaminobencidina como sustrato de la enzima. La reacción se detuvo con agua corriente y se realizó una contra tinción con hematoxilina de Meyer durante apenas segundos para dar una coloración azul violácea a los núcleos celulares.

6. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS

6.1. Inmunodetección de óxido nítrico sintasas

6.1.1. Preparación de lisados celulares

Las células LMM3 ($2x10^6$) o los Mfs ($2x10^7$) se lisaron en un 1 ml de buffer que contiene: Tris-HCl 50 mM pH:8, NaCl 100 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%, PMSF 10 mM, aprotinina 20 μg/ml, leupeptina 20 μg/ml, inhibidor de tripsina 100 μg/ml. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se midió por el método de Lowry (1971).

6.1.2. Ensayos de Western blot

Se sembraron 30 μg de proteína por calle de los lisados obtenidos en 6.1.1. y se sometieron a una electroforesis en geles de SDS-PAGE al 7,5 % con las mismas condiciones de corrida y transferencia que en el punto 5.3. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra NOS1 o NOS3 y un anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra NOS2 siendo los inmunógenos de origen humano diluidos 1:100 en TBS-T con 5% de leche descremada. Luego de varios lavados con TBS-T las membranas fueron incubadas a 37ºC durante 1h. con un segundo anticuerpo policlonal contra IgG de conejo o

cabra según corresponda, conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:4000 en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1h. a 37ºC. Las bandas se visualizaron con una mezcla de NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría en un analizador de imágenes computarizado (Davel L y col, 2002). Como control se utilizaron péptidos bloqueantes de las distintas isoformas de NOS que impidieron la aparición de las bandas.

6.2. Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasas

Se utilizaron placas de 48 pozos y se sembraron las células LMM3 (10^5 cél./pozo) o Mfs (10^6 cél./pozo) que se incubaron a 37ºC en 500 μl de D-MEM o D-MEM con 5% de SFB, respectivamente. Como control de la actividad enzimática las células fueron tratadas con L-NMMA o AG durante 30 min. y luego el medio fue reemplazado por medio fresco.

Después de 24 h. la actividad de NOS se determinó midiendo la concentración de nitrito (NO^-_2) en los sobrenadantes de cultivo por medio del ensayo de Griess. Para esto se tomaron 50 μl del sobrenadante de cultivo de las células y se agregó igual volumen del reactivo de Griess, que consiste en partes iguales de ácido sulfanílico al 1% en ácido acético al 30% y naftiletilendiamina al 0,1% en ácido acético al 60% (Green LC y col, 1982). La variación de color se detectó midiendo la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. La concentración de las muestras se determinó por extrapolación de los valores obtenidos de una curva standard

realizada a partir de una solución acuosa 2 M de $NaNO_2$. Los resultados se expresaron en concentración micromolar de nitrito por millón de células (μM /10^6 cél.).

Las células se trataron previamente con NOHA 10^{-4} M o valina $5x10^{-2}$ M, inhibidores de arginasas, con indometacina 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M, inhibidores de COX, para estudiar la interacción de los productos de arginasas y COX sobre la actividad de NOS.

7. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ARGINASAS

7.1. Ensayos de Western blot

Los lisados obtenidos en el punto 6.1.1. se sometieron a electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10%, en los que se sembraron 25 ug de proteína por calle, con las mismas condiciones de corrida y transferencia que en el punto 5.3. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido en ratón contra arginasa I y un anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra arginasa II ambos de origen murino, este último cedido gentilmente por el Dr. Masataka Mori de la Universidad de Kumamoto, Japón, diluidos 1:500 en TBS-T con 5% de leche descremada. Luego de varios lavados las membranas fueron incubadas a 37°C durante 1h. con el segundo anticuerpo policlonal contra IgG de ratón hecho en conejo o el anticuerpo policlonal contra IgG de conejo

hecho en cabra según corresponda, conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:20000 ó 1:4000, respectivamente, en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1h. a 37ºC. Como control positivo se utilizó lisado de hígado de ratón. Las bandas se visualizaron con una mezcla de NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría en un analizador de imágenes computarizado (Que LG y col., 2002).

7.2. Medición de la actividad de arginasas

La actividad de arginasas se determinó midiendo la producción de urea por una modificación del método previamente descripto (Modolell M y col.,1995). Para ello se sembraron en placas de 24 pozos: células LMM3 (10^5 cél./pozo) o Mfs (10^6 cél./pozo) y se incubaron a 37°C en 1 ml de medio D-MEM o D-MEM con 5% de SFB, respectivamente. Para verificar que el producto medido es producido por arginasas las células fueron tratadas con NOHA y valina. Después de 24 h. las células se lisaron en 0,5 ml de Triton X-100 0,1%. Luego de 30 min. a 4°C, se agregaron 0,5 ml de Tris-HCl 25 mM que contenían $MnCl_2$ 5 mM, pH 7,4. La enzima se activó calentando a 56°C durante 10 min. y el lisado activado se incubó luego con arginina 0,5 M, pH 9,7 a 37°C por 60 min. La reacción se detuvo con H_2SO_4 96%: H_3PO_4 85%: H_2O (1:3:7 v/v). Finalmente, se agregó α-isonitrosopropiofenona al 9% y se calentó a 100°C por 45 min. La variación de color se detectó midiendo la absorbancia a 540 nm. La concentración de urea se calculó por

extrapolación de los valores obtenidos de una curva estándar realizada a partir de una solución acuosa de urea 1 M. Los resultados se expresaron como micromoles de urea por hora y por millón de células (μmoles/h/10^6 cél.).

Las células se trataron previamente con L-NMMA 10^{-4} M o AG $2x10^{-3}$ M, inhibidores de NOS, con indometacina 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M, inhibidores de COX, para estudiar la interacción de los productos de NOS y COX sobre la actividad de arginasa.

8. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE CICLOOXIGENASAS

8.1. Inmunomarcación de ciclooxigenasas

8.1.1. Preparación de lisados celulares

Las células LMM3 o los Mfs purificados, se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron con 300 μl de buffer de lisis: Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, leupeptina 10 μg/ml, aprotinina 2 μg/ml, DTT 10 μg/ml, inhibidor de tripsina 100 μg/ml y benzamidina 1 mg/ml. Luego se centrifugaron 5 min. a 5.000 rpm. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se midió por el método de Lowry (1971).

8.1.2. Ensayos de Western blot

Se sembraron 25 ug de proteína por calle de las muestras obtenidas en el punto 8.1.1. y se sometieron a una electroforesis en geles de SDS-PAGE al 7,5% con las mismas condiciones de corrida y transferencia que en el punto 5.3. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra COX-1 o COX-2 de origen murino diluidos 1:300 en TBS-T con 5% de leche descremada. Luego de varios lavados con TBS-T las membranas fueron incubadas a 37°C durante 1h. con el segundo anticuerpo policlonal contra IgG de conejo hecho en cabra conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:5000 en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1h. a 37 ºC. Las bandas se visualizaron con una mezcla de NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría en un analizador de imágenes computarizado.

8.2. Medición de la actividad de ciclooxigenasas

8.2.1. Preparación de las muestras

Las células LMM3 (10^5 cél./pozo) o Mfs (10^6 cél./pozo) se incubaron a 37°C durante 24 h. en placas de 24 pozos con 0,8 ml de medio D-MEM o D-MEM con 5% de SFB, respectivamente. Los sobrenadantes se guardaron a –80°C. Como control de la actividad

enzimática las células fueron tratadas previamente con inhibidores de COX como indometacina y NS-398.

Las células se trataron previamente con L-NMMA 10^{-4} M o AG $2x10^{-3}$ M, inhibidores de NOS, con NOHA 10^{-4} M o valina $5x10^{-2}$ M, inhibidores de arginasas, para estudiar la interacción de los productos de NOS y arginasas sobre la actividad de COX.

8.2.2. Radioinmunoensayo

La actividad de COX se determinó midiendo la producción de PGE_2 por radioinmunoensayo (Granstrom E y Kindhal H, 1978). A 100 μl de cada muestra se agregaron 500 μl de antisuero contra PGE_2 hecho en conejo y 100 μl (5 pg) de $[^3H]$-PGE_2. Todas las diluciones se hicieron en buffer fosfato (NaH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, albúmina bovina 0,01%, azida sódica 0,1%; pH 7,4). Luego de incubar por 1 h. a 4°C se agregaron 200 μl de una suspensión de carbón-dextrán (carbón activado 0,1%; dextrán 0,01% en buffer fosfato) para separar la fracción unida de la libre. El sobrenadante de cada muestra obtenido después de la centrifugación a 3.000 rpm, se combinó con 1 ml de solución de centelleo biodegradable. La concentración de cada muestra se calculó por extrapolación de una curva de concentraciones conocidas de PGE_2 en buffer fosfato tratadas de igual forma que las muestras. Los resultados se expresaron en picogramos de PGE_2 por millón de células (pg/10^6 cél.).

9. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

9.1. Inmunomarcación de receptores muscarínicos

9.1.1. Preparación de las muestras

La expresión de RM se estudió en MfsN y en Mfs provenientes de portadores del tumor LMM3 en los estadíos mencionados. Se realizó la purificación de una fracción celular enriquecida en membrana por medio de una modificación del método previamente descripto (Español AJ y col., 2003). Los MfsN o MfsT purificados (10^6 cél.) se lisaron en 1 ml de buffer que contiene: 0,5 % de NP-40, Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 50 mM, ortovanadato 0,1 mM, PMSF 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, aprotinina 10 μg/ml, leupeptina 10 μg/ml, inhibidor de tripsina 10 μg/ml pH 7. El lisado se sonicó en frío por 30 seg. y se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. a 4°C y se guardó a –80°C. La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry (1971).

9.1.2. Ensayos de Western blot

Se sembraron 30 ug de proteína por calle de las muestras obtenidas en 9.1.1. y se sometieron a una electroforesis en geles de SDS-PAGE al 7,5% con las mismas condiciones de corrida y transferencia

que en el punto 5.3. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en cabra contra los receptores M_1, M_2 y M_3 y anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra M_4 y M_5 todos de origen humano diluidos 1:100 en TBS-T con 5% de leche descremada. Luego de varios lavados con TBS-T las membranas fueron incubadas a 37°C durante 1h. con el segundo anticuerpo policlonal contra IgG de cabra hecho en conejo o un anticuerpo policlonal contra IgG de conejo hecho en cabra, según corresponda, conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:4000 en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1h. a 37ºC. Las bandas se visualizaron con una mezcla de NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría en un analizador de imágenes computarizado.

9.2. Funcionalidad de los receptores muscarínicos

Para estudiar la funcionalidad de los RM las células LMM3 ó los Mfs fueron tratados con CARB, agonista muscarínico, en distintas concentraciones durante 1h. en ausencia o en presencia de atropina 10^{-6} M, antagonista muscarínico; pirenzepina 10^{-6} M, antagonista selectivo M_1; metoctramina 10^{-6} M, antagonista selectivo M_2 y 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina 10^{-6} M (4-DAMP), antagonista selectivo M_3.

Para estudiar si las enzimas NOS, arginasas o COX son efectoras de la activación de los RM, las células LMM3 ó los Mfs fueron tratados

previamente con L-NMMA 10^{-4} M, AG $2x10^{-3}$ M, NOHA 10^{-4} M, valina $5x10^{-2}$ M, indometacina 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M que fueron agregados 30 min. antes que el CARB. Luego de tratar con CARB se cambio el medio de las células por D-MEM fresco y luego de 24 h se midió la producción de NO, urea y PGE_2.

9.3. Detección de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A en macrófagos tratados con carbacol

9.3.1. Preparación de lisados celulares

La producción de VEGF-A fue medida en lisados de MfsT7 tratados con CARB 10^{-7} M por 1 h. en ausencia y en presencia de atropina 10^{-6} M, pirenzepina 10^{-6} M, metoctramina 10^{-6} M, 4-DAMP 10^{-6} M o de inhibidores enzimáticos NOHA 10^{-4} M, indometacina 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M. Luego de ser tratadas con CARB se cambió el medio de las células por D-MEM fresco y se cultivaron por 24 h a 37ºC. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS y lisadas con Tris-HCl 50 mM pH:8, NaCl 100 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%, PMSF 10 mM, aprotinina 20 μg/ml, leupeptina 20 μg/ml, inhibidor de tripsina 100 μg/ml. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se midió por el método de Lowry (1971).

9.3.2. Ensayos de Western blot

Se realizó de la misma manera que en el punto 5.3.

10. LINFOANGIOGÉNESIS

10.1. Inmunodetección de los marcadores linfoangiogénicos LYVE-1 y factor de crecimiento del endotelio vascular-C

Se sembraron 30 ug de proteína por calle de las muestras obtenidas en el punto 5.1. y se sometieron a una electroforesis en geles de SDS-PAGE al 7,5% ó 10% con las mismas condiciones de corrida y transferencia que en el punto 5.3. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra LYVE-1 de origen murino y un anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra VEGF-C de origen humano diluidos 1:100 en TBS-T con 5% de leche descremada. Luego de varios lavados con TBS-T las membranas fueron incubadas a 37°C durante 1h. con el segundo anticuerpo policlonal contra IgG de cabra hecho en conejo o un anticuerpo policlonal contra IgG de conejo hecho en cabra, según corresponda, conjugados con fosfatasa alcalina diluido 1:4000 en TBS-T con 5% de leche descremada durante 1h. a 37 ºC. Las bandas se visualizaron con una mezcla NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría en un analizador de imágenes computarizado.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron los ensayos de ANOVA o Kruskal Wallis para comparar el valor de las medias y las diferencias entre ellas se consideraron significativas cuando $p<0,05$.

12. REACTIVOS GENERALES

- Acetato de sodio (MercK)
- Ácido acético (Berna).
- Ácido clorhídrico (Merk).
- Ácido etilenglicoltetracético (Merck).
- Ácido fosfórico (Cicarelli).
- Ácido sulfanílico (MercK).
- Ácido sulfúrico (Cicarelli).
- Acrilamida (Promega).
- Albúmina sérica bovina (Sigma).
- Aminoguanidina (Sigma)
- Anhídrido acético (Carlo Erba).
- Anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra PECAM-1 de origen murino (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra VEGF-A de origen murino (Santa Cruz Biotechnology).

- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra AMPc, cedido por el Dr. A. F. Parlow del National Hormone & Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center. Torrance, California.
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra arginasa II de origen murino, cedido por los Dres. T Gotoh y M Mori, Facultad de Medicina, Universidad de Kumamoto, Japón.
- Anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra COX-1 o COX-2 de origen murino (Cayman Chemical Co).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra GAPDH de origen humano (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra NOS1 o NOS3 y anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra NOS2 todos de origen humano (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal obtenido en cabra contra IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).
- Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón contra arginasa I de origen murino (Transduction Laboratorios. BD Biosciences).
- Aprotinina (Sigma).
- Azida sódica (Merk).
- Azul tripán (Sigma).

- Bicarbonato de sodio (J.T. Baker).
- Bis/poliacrilamida (Bio Rad).
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato-p-toluidina (Sigma).
- 4-carboxifenil-N, N-difenilcarbamato (Sigma).
- Cloruro de carbamilcolina (Sigma).
- Cloruro de magnesio (Merck).
- Cloruro de manganeso (Merck)
- Cloruro de sodio (Merck).
- D-MEM (GIBCO).
- Deoxicolato de sodio (Sigma).
- Dextrano (Pharmacia Fine Chemicals).
- Ditiotreitol (Sigma).
- Dodecil sulfato de sodio (Sigma).
- Estándares de peso molecular (Bio Rad).
- Éster metílico de N^{ω}-nitro-L-arginina (Sigma).
- Etanol (Soria).
- Éter etílico (Biopack).
- Etilendiaminotetracético (Merck).
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma).
- Fosfato disodico (Sigma).
- Fosfato monosodico (Sigma).
- Glicina (Invitrogen).
- H-7 (Sigma)
- Indometacina (Sigma).

- Inhibidor de tripsina tipo Soybean (Sigma).
- α-isonitrosopropiofenona (Sigma).
- L-arginina (Fluka).
- Leupeptina (Sigma).
- Lisado de hígado de ratón (BD Transduction Laboratories).
- Metanol (Cicarelli).
- Monofosfato cíclico de adenosina (Sigma)
- Naftilendeamina (Sigma).
- N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil)-metanosulfonamida (ICN Biomedicals Inc.).
- N^{ω}hidroxi-L-arginina (Sigma).
- Nitrato de sodio (Merck).
- Nitro azul de tetrazolio (Sigma).
- N^{G}-monometil-L-arginina (Sigma).
- N, N, N`, N`-di-dimetilaminoetanol (Bio Rad).
- Ortovanadato de sodio (Sigma).
- Péptidos bloqueantes de NOS1, NOS2 y NOS3 (Santa Cruz Biotechnology).
- Persulfato de amonio (ICN Biomedicals Inc.).
- Solución de centelleo biodegradable de Hisafe (Wallac).
- Suero fetal bovino (GENSA).
- Trietilamina (Merck).
- Tripsina (GIBCO).
- Tris-HCl (Promega Corporation)

- Tritón X-100 (J.T. Baker).
- Tween 20 (Sigma).
- Urea (Fluka).
- Valina (Sigma).

Radioactivos:

- Timidina tritiada ([^{3}H]Timidina, act, esp. 5 Ci/mmol, Amersham-Pharmacia),
- Prostaglandina E_2 tritiada ([^{3}H]-PGE2, act. esp. 154 Ci/mmol, NEN, Life Science Products).
- $Na^{125}I$ (act. esp. de 600 Ci/mmol, Dupont-New England Nuclear)
- I^{125}-AMPc se obtuvo por marcación con Cloramina-T limitante.

RESULTADOS

1. ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

La neovascularización o angiogénesis es usualmente un pre-requisito para la progresión tumoral y muchos aspectos de este proceso no son aún completamente conocidos. Por lo tanto, se evaluó la capacidad angiogénica de células de la línea LMM3 derivada de un adenocarcinoma mamario murino metastásico, en un modelo singeneico en el que los portadores de tumor pertenecen a la cepa BALB/c. En la Figura 15 (panel izquierdo) se muestra que la inoculación de $2x10^5$ células LMM3 induce un aumento significativo en la densidad de vasos (LMM3: 3,9±0,4; n=6) con respecto al control (piel normal) (1,7±0,2; n=6). El efecto producido por las células LMM3 es significativamente mayor que el que producen las células LM3 que derivan de un tumor mamario murino relacionado genéticamente con el anterior pero no metastásico (LM3: 2,7±0,4; n=6).

En la Figura 15 (panel derecho) se muestran fotografias del sitio angiogénico de la piel inoculada con células LM3 y células LMM3 observándose que estas últimas producen una marcada formación de microvasos con “loops” con respecto a la piel normal.

Debido a que las células LMM3 son potentes inductoras de la angiogénesis tumoral y el potencial invasivo está dado por su capacidad para metastatizar, fueron utilizadas como modelo en todos los experimentos de esta tesis.

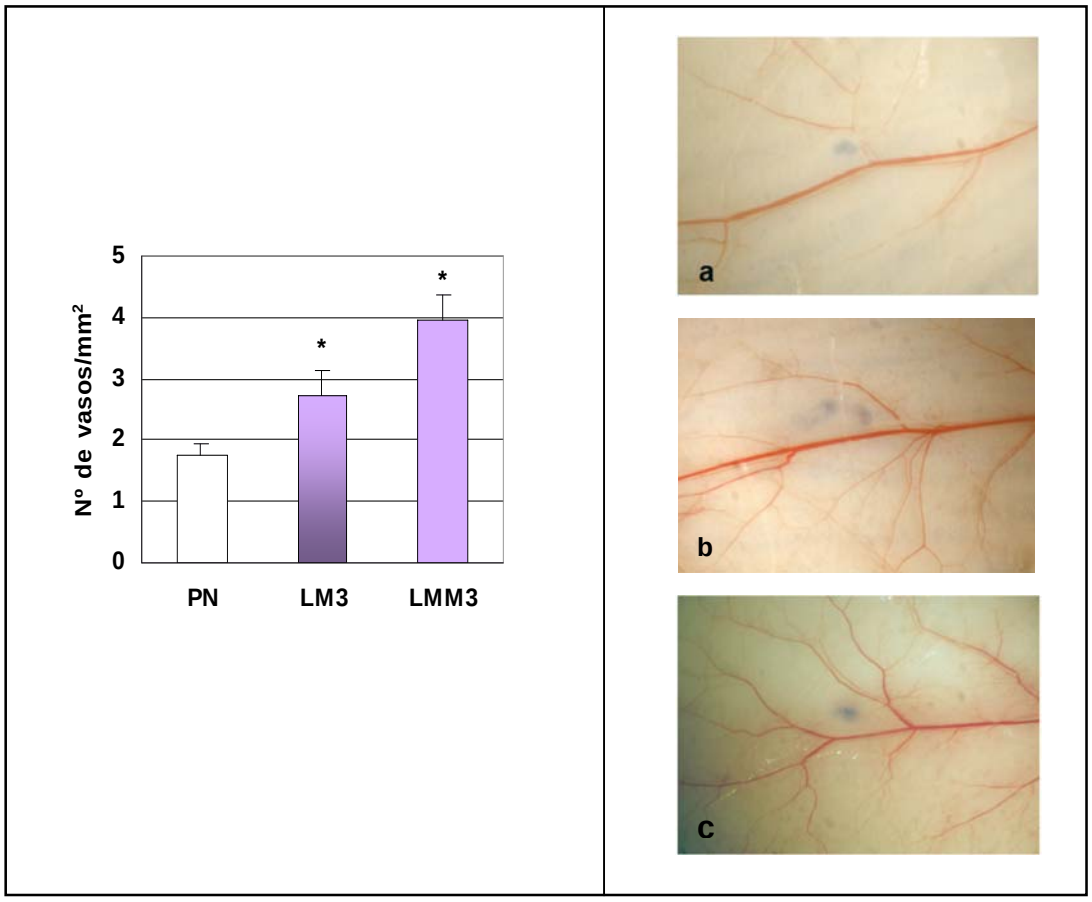

Figura 15: Angiogénesis inducida por células LM3 y LMM3. Los resultados se expresaron como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=6. *p<0,0001 vs. piel normal (PN) (Panel izquierdo). Fotografías del sitio angiogénico: a) PN; neovascularización inducida por b) células LM3, c) células LMM3 (aumento 64x) (Panel derecho).

Es sabido que el VEGF-A es una citoquina angiogénica de central importancia en la progresión tumoral. Por lo tanto estudiamos su expresión en células LMM3 tanto en lisados como en sobrenadantes de cultivo y observamos que dichas células expresan y liberan VEGF-A (Fig. 16 A).

También estudiamos la expresión de esta proteína en muestras de piel obtenidas de animales con 5, 7 y 14 días de portación del tumor LMM3.

Por Western blot (Wb) se observó un aumento en la inmunoreactividad de VEGF-A a 70 y 50 kDa a partir de los 7 días de portación del tumor con respecto al control de piel normal como lo indican los valores de D.O./mm^2 (PT7: 0,65±0,07 y 1,0±0,1; PN: 0,20±0,02 y 0,38±0,04; n=3) (Fig. 16 B).

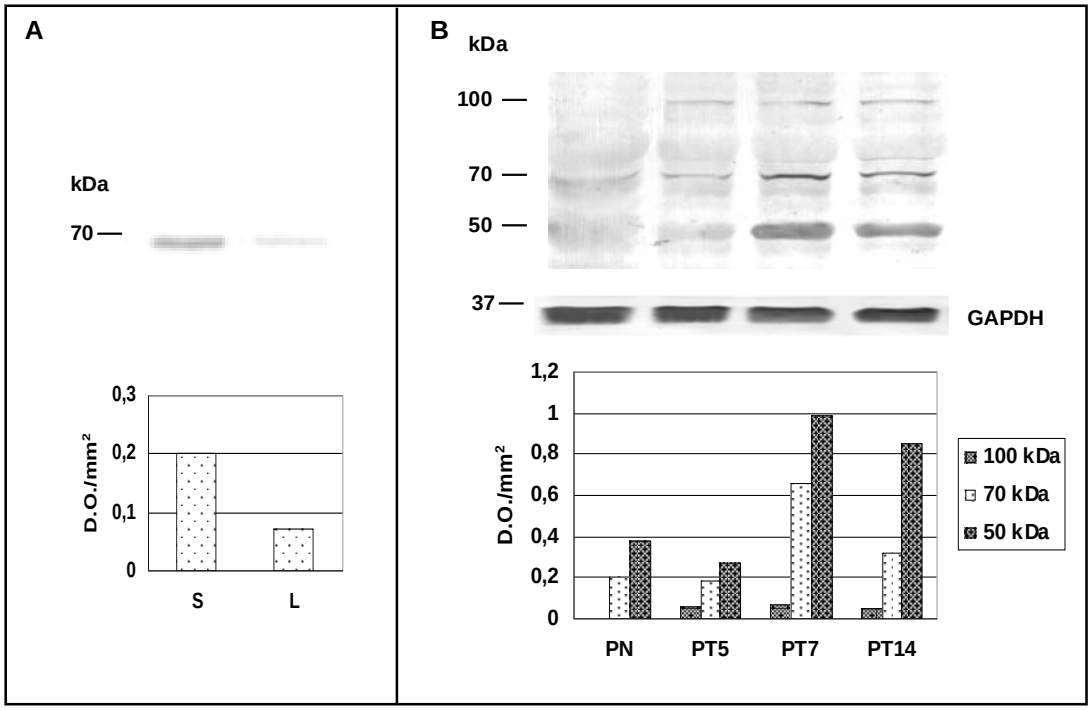

Figura 16: Western blot para detectar la expresión de VEGF-A. A) Sobrenadantes (S) y lisados (L) de células LMM3 en cultivo. B) Homogenatos de piel inoculada con el tumor LMM3 luego de 5, 7 y 14 días de portación (PT5, PT7 y PT14). El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

1.2. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la angiogénesis inducida por las células LMM3

El metabolismo de la arginina vía NOS, produce NO el cual se encuentra involucrado en distintas etapas de la tumorigénesis. Por esto se estudió la participación de la NOS en la actividad angiogénica inducida por las células LMM3. La Figura 17 muestra que el efecto producido por las células LMM3 es revertido por el tratamiento de las mismas con L-NMMA 10^{-4} M, inhibidor no selectivo de NOS (1,4±0,2; n=6) o AG $2x10^{-3}$ M, inhibidor selectivo de NOS2, (1,8±0,4; n=6).

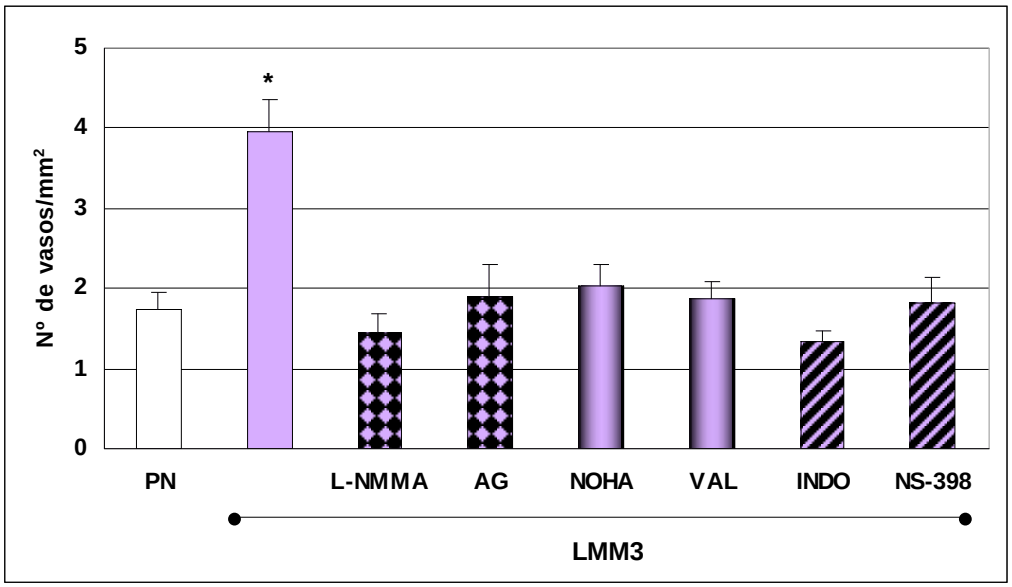

Figura 17: Angiogénesis inducida por células LMM3 en ausencia o en presencia de N^G-monometil-L-arginina 10^{-4} M (L-NMMA), aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, valina (VAL) $5x10^{-2}$ M, indometacina (INDO) 10^{-6} M, NS-398 10^{-5} M. Los resultados se expresaron como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=6. *p<0,0001 vs. piel normal (PN).

Además, la arginina también puede ser metabolizada por las arginasas, que producen urea y ornitina. Esta última es utilizada para la formación de poliaminas necesarias para la proliferación celular. Por lo tanto se estudió el rol de esta enzima en la neovascularización. Para esto tratamos las células con NOHA 10^{-4} M (2,0±0,2; n=6), inhibidor de las arginasas, o con valina $5x10^{-2}$ M (1,8±0,2; n=6), un aminoácido que interfiere en la actividad de dicha enzima y observamos que ambos redujeron significativamente la respuesta neovascular.

En nuestro laboratorio demostramos previamente que el tratamiento in vivo de animales BALB/c con indometacina, un inhibidor de la COX, redujo el crecimiento tumoral (Davel LE y col., 1985). Teniendo en cuenta que la PGE_2 puede modular el crecimiento tumoral por activación de sus receptores y activar vías de señalización que controlan la proliferación y la migración celular, investigamos la participación de la misma en la neovascularización inducida por las células LMM3. Para esto se trataron las células con indometacina 10^{-6} M, inhibidor no selectivo de COX, (1,3±0,1; n=6) y con NS-398 10^{-5} M, inhibidor selectivo de COX-2 (1,8±0,3; n=6) que redujeron significativamente la respuesta neovascular inducida por las células tumorales (Fig. 17).

Estos resultados indican que los productos de las enzimas NOS, arginasa y COX se encuentran implicados en la neovascularización que producen las células LMM3.

1.2.1. Expresión y actividad de óxido nítrico sintasas, arginasas y ciclooxigenasas en células LMM3

Teniendo en cuenta que las enzimas NOS, arginasa y COX están implicadas en la angiogénesis inducida por las células LMM3, se estudió la actividad enzimática y la expresión de dichas enzimas. Por Wb observamos que las células LMM3 expresan constitutivamente las isoformas NOS2 y NOS3. La producción de NO_2^- (uM/10^6 células) de las células LMM3 (16,0±0,4; n=6) es reducida por los inhibidores de NOS, L-NMMA 10^{-4} M (4,4±0,2; n=6) y AG $2x10^{-3}$ M (5,0±0,5; n=6) (Fig. 18 A).

Las células LMM3 también expresan constitutivamente la isoforma II de arginasa. La producción de urea (μmoles/h/10^6 células) de las células LMM3 (182,0±0,6; n=6) es bloqueada por los inhibidores de esta enzima, NOHA 10^{-4} M (70,4±1,4; n=6) y valina $5x10^{-2}$ M (143,6±0,8; n=6) (Fig. 18 B).

Por otro lado, las células LMM3 expresan las isoformas 1 y 2 de COX. La producción de PGE_2 (pg/10^6 células) (301,0±6,4; n=6) es reducida por los inhibidores, indometacina 10^{-6} M (45,1±3,2; n=6) y NS-398 10^{-5} M (144,6±16,1; n=6) (Fig. 18 C).

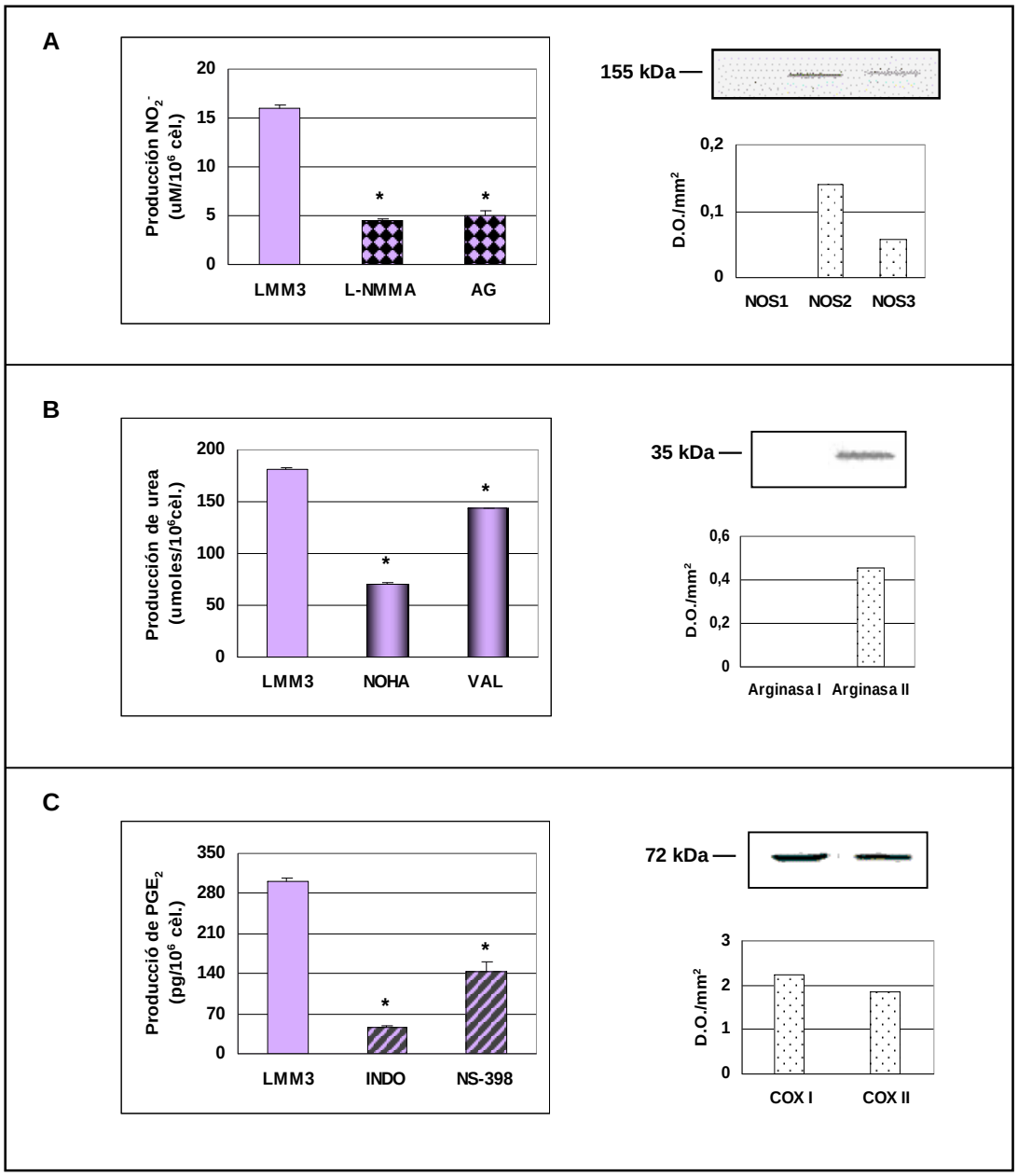

Figura 18: Actividad y expresión enzimática en células LMM3. A) Producción de NO_2^- en ausencia y en presencia de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M o aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M expresada como $\mu M/10^6$ células, B) Producción de urea en ausencia y en presencia de N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M o valina (VAL) $5x10^{-2}$ M expresada como $\mu moles/h/10^6$ células, C) Producción de PGE_2 en ausencia y en presencia de indometacina (INDO) 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M expresada como $pg/10^6$ células. Los valores son promedios ± E.S. de n=6. *p<0,0001 vs. LMM3 (Panel izquierdo). Expresión de las enzimas por Western blot y análisis de las bandas por densitometría en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado ($D.O./mm^2$) (Panel derecho). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

2. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

Previamente se demostró que las células LMM3 inducen una potente repuesta angiogénica en animales singeneicos. Sin embargo, el rol de las células inflamatorias obtenidas de portadores de tumor en la neovascularización es menos conocido. Teniendo en cuenta que los Mfs constituyen el principal componente del infiltrado leucocitario en los tumores, se estudió el papel de los Mfs peritoneales en la respuesta angiogénica inducida por células LMM3. Para esto se obtuvieron Mfs peritoneales de portadores de tumor de 5 días (MfsT5), 7 días (MfsT7), 14 días (MfsT14) y de animales normales (MfsN). Los Mfs se cultivaron con las células LMM3 en una proporción 100:1 (LMM3:Mfs, $2x10^5$:$2x10^3$) y luego se inocularon en ambos flancos de hembras BALB/c.

En la Figura 19 A se muestra que el agregado de los MfsT7 potenció la respuesta angiogénica de las células LMM3 (LMM3: 3,4±0,4; LMM3+MfsT7: 5,0±0,5; n=5). La co-inoculación de células LMM3 con MfsN, MfsT5 o MfsT14 no modificó la respuesta neovascular de las células tumorales (Fig. 19 A). Los MfsT inoculados sin células tumorales y en la misma concentración no modificaron la densidad de vasos de la piel normal (1,7±0,4; n=4).

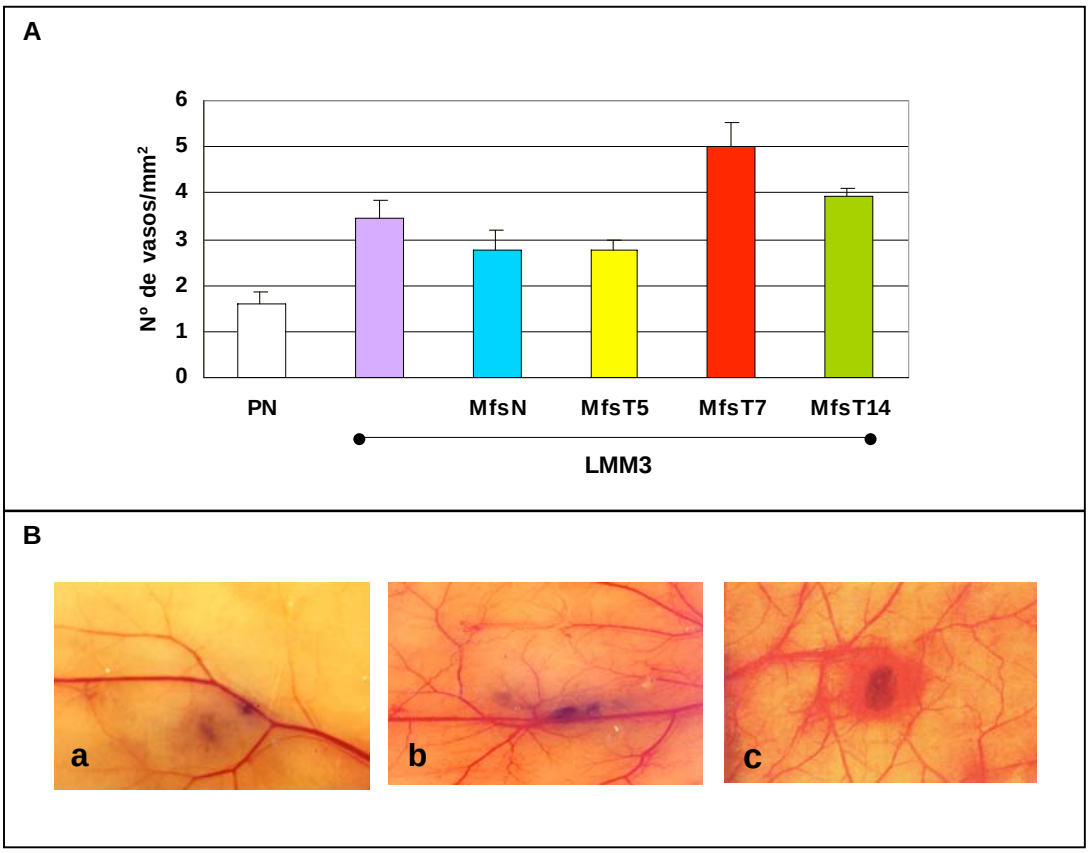

Figura 19: Ensayo de angiogénesis con células LMM3 cultivadas con macrófagos normales (MfsN) y tumorales (MfsT). A) Células LMM3 ($2x10^5$) en ausencia o en presencia de MfsN ($2x10^3$) o MfsT ($2x10^3$) se inocularon y la angiogénesis se midió como Nº de vasos/ mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=5. *p<0,001 vs. PN, # p<0,0001 vs. LMM3. B) Fotografías de a) piel normal (PN); neovascularización inducida por b) células LMM3 y c) por células LMM3 con MfsT7 (aumento 64x).

En la Figura 19 B se muestran imágenes del sitio de inoculación con células LMM3 y células LMM3 con MfsT7, en la relación antes mencionada, observándose que la combinación de células LMM3:MfsT7 potencia la formación de microvasos con “loops” que produce la célula tumoral.

Los ensayos de angiogénesis se completaron con el estudio de la expresión de PECAM-1 (CD31) una molécula que se expresa

particularmente en los vasos sanguíneos de reciente formación. Para esto se realizaron homogenatos de muestras de piel obtenidas de los ensayos de angiogénesis. Por Wb demostramos que las células LMM3 producen un aumento significativo en la expresión de la proteína PECAM-1 que está ausente en la piel normal (Fig. 20). La co-inoculación de células LMM3 con MfsT7 potencia la expresión de la proteína PECAM-1, mientras que con los MfsN, MfsT5 o MfsT14 no se modifica la densidad de la banda de dicha proteína en relación con la que corresponde a las células LMM3 solas, tal como indican los valores de D.O./mm^2 (LMM3+MfsT7: 0,48±0,08; LMM3: 0,12±0,02; n=3) (Fig. 20).

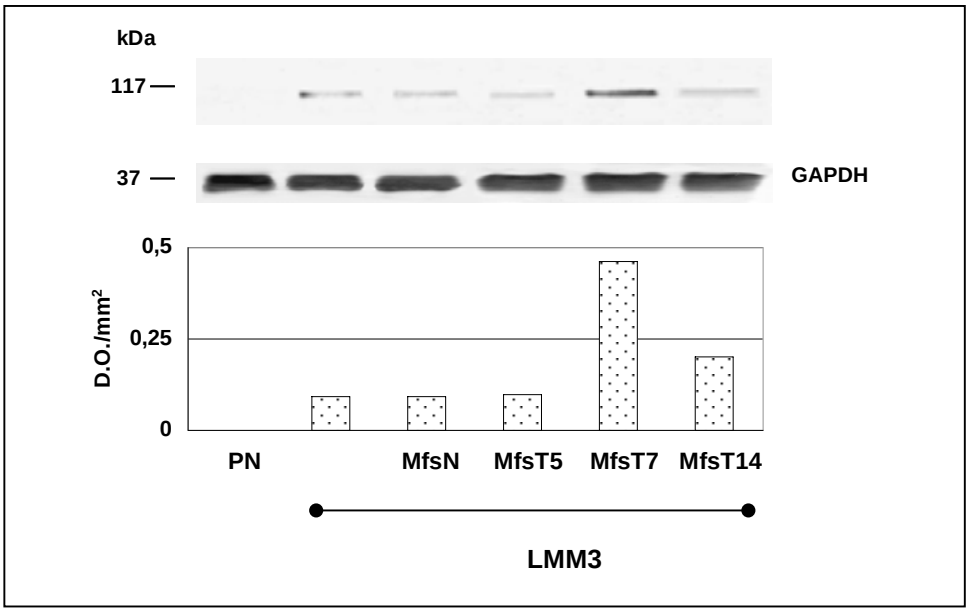

Figura 20: Expresión de PECAM-1 en homogenatos de piel inoculada con células LMM3 en ausencia o en presencia de macrófagos normales (MfsN) (2x10^3) o tumorales (MfsT) (2x10^3). La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

También se estudió la expresión de PECAM-1 por inmunohistoquímica, en cortes de piel del sitio angiogénico. En la Figura 21 se detecta la presencia de este marcador por la tinción marrón en el endotelio vascular. Se observa que la expresión de PECAM-1 es negativa en piel normal y positiva cuando se inoculan células LMM3. La inoculación de células LMM3 con MfsT7 potenció la formación de vasos y concomitantemente aumentó la inmunomarcación de la molécula PECAM-1.

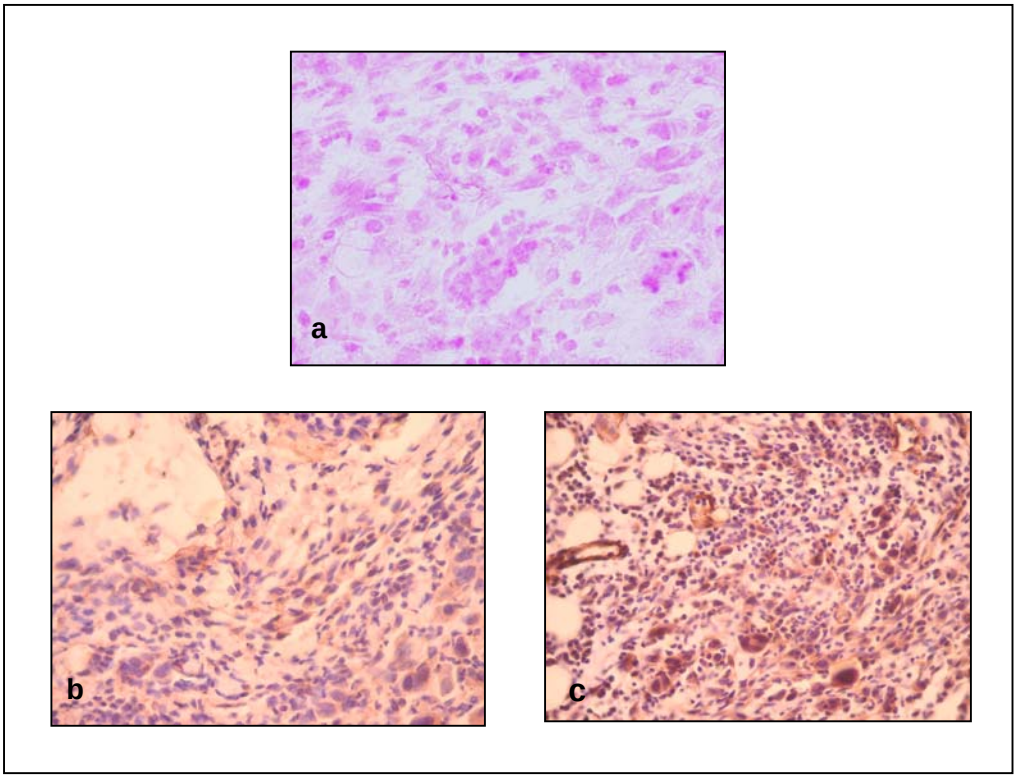

Figura 21: Inmunohistoquímica de PECAM-1 en cortes de a) piel normal b) piel inoculada con células LMM3 ($2x10^5$) c) células LMM3 con macrófagos de portadores del tumor LMM3 de 7 días (MfsT7) ($2x10^5$**:** $2x10^3$) (aumento 400X).

Para confirmar los resultados del ensayo in vivo, se estudió la expresión de VEGF-A por Wb como marcador de angiogénesis en la piel de animales inoculados con células LMM3 y Mfs. Se observó un aumento en la expresión de VEGF-A a 50 kDa, aproximadamente, cuando se inocularon las células LMM3 con MfsT7 con respecto al control como lo indican los valores de D.O./mm^2 (LMM3+MfsT7:1,30±0,15 y LMM3:0,81±0,10; n=3) (Fig. 22). Estos resultados coinciden con el aumento en la densidad de vasos y también con los resultados observados en la expresión de PECAM-1.

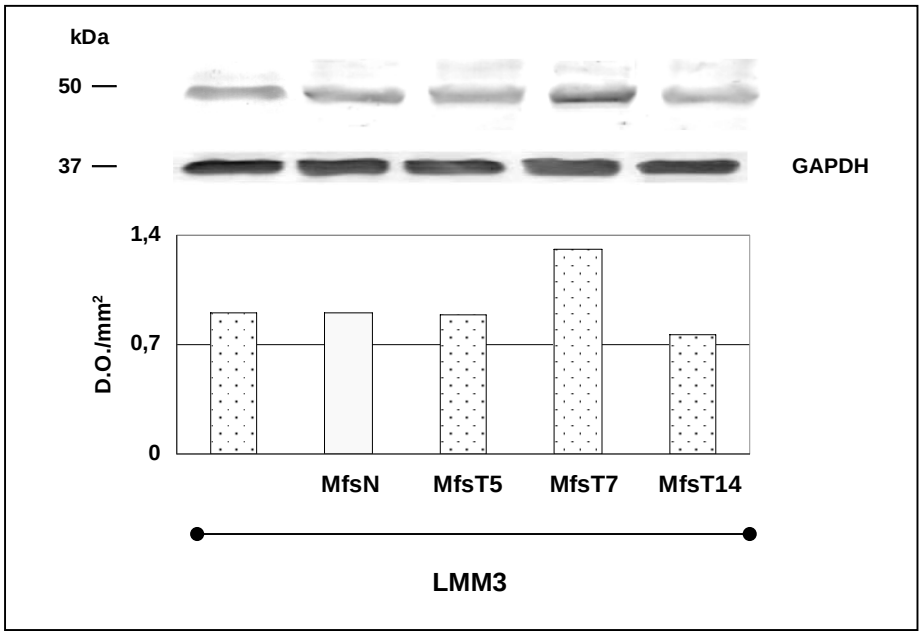

Figura 22: Western blot para detectar la expresión de VEGF-A en piel inoculada con células LMM3 (2x10^5) y macrófagos (2x10^3) provenientes de animales normales (MfsN) o portadores de tumor (MfsT). El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

2.1. Participación de óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la modulación de la angiogénesis tumoral producida por MfsT7

Sabiendo que las enzimas NOS, arginasa y COX están implicadas en la tumorigénesis, se investigó la participación de sus metabolitos en el efecto que ejercen los MfsT7 sobre la respuesta angiogénica de las células LMM3. Para esto se trataron los MfsT7 con los inhibidores de las enzimas mencionadas y luego se cultivaron con las células LMM3 en una proporción célula tumoral: Mfs 100:1. Luego las células se inocularon para realizar ensayos de angiogénesis in vivo. Observamos que los inhibidores de NOS, L-NAME 10^{-3} M (3,5±0,2; n=5) o AG $2x10^{-3}$ M (3,2±0,3; n=5) reducen significativamente el efecto estimulante que los MsfT7 producen sobre la angiogénesis inducida por las células LMM3.

Por otro lado, la inhibición de la enzima arginasa con NOHA 10^{-4} M (2,2±0,2; n=5) o valina $5x10^{-2}$ M (2,2±0,2; n=5) también reduce el efecto producido por los MfsT7.

El tratamiento previo de los MfsT7 con indometacina 10^{-6} M (2,4±0,3; n=5) o NS-398 10^{-5} M (2,3±0,2; n=5), inhibidores de COX, reduce significativamente el efecto estimulante de los MfsT7 (Fig. 23).

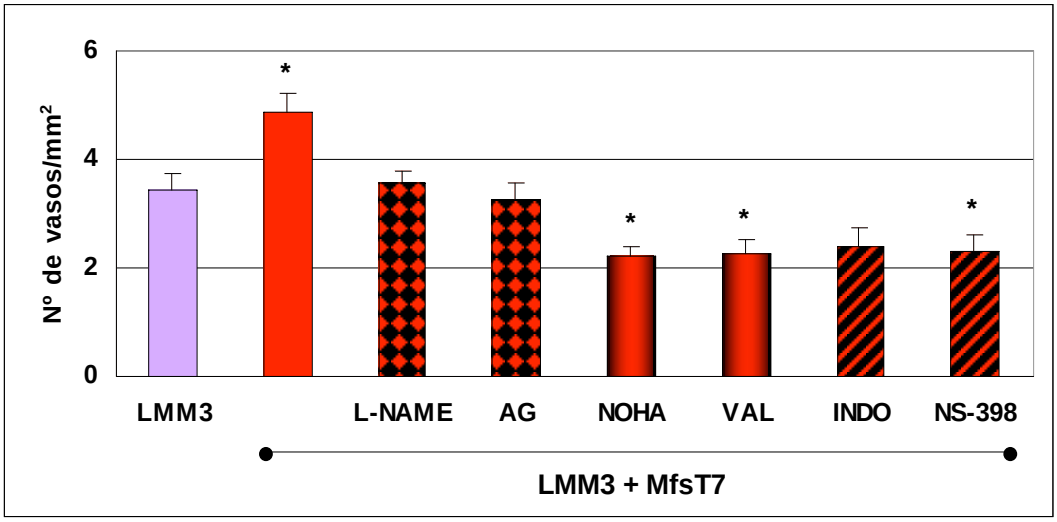

Figura 23: Ensayo de angiogénesis de células LMM3 en co-cultivo con macrófagos de portadores del tumor LMM3 de 7 días (MfsT7) en una proporción 100:1. Los MfsT7 se trataron con éster metílico de N^{ω}-nitro-L-arginina (L-NAME) $2x10^{-3}$ M, aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, valina (VAL) $5x10^{-2}$ M, indometacina (INDO) 10^{-6} M, NS-398 10^{-5} M. La angiogénesis fue expresada como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=5. *p<0,001 vs. LMM3.

Cabe destacar que el tratamiento de los MfsT7 con los inhibidores de arginasa y COX produjo una disminución significativamente mayor en la respuesta neovascular que el tratamiento con los inhibidores de NOS, lo que indicaría que estas enzimas tendrían una participación mas importantes en el efecto estudiado.

3. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR SON ANGIOGÉNICOS *PER SE*

Los Mfs provenientes de portadores del tumor mamario murino LMM3 potencian la respuesta angiogénica de las células tumorales, efecto que no producen los MfsN. Es probable que se hayan activado dentro del portador del tumor, tal vez adquiriendo la capacidad de inducir angiogénesis per se. Por lo tanto, se realizaron ensayos de angiogénesis in vivo donde se inocularon Mfs en concentraciones análogas a las de las células tumorales, $3x10^5$ células por sitio. Se observó que los MfsT7 (2,6±0,1; n=5) y los MfsT14 (3,6±0,4; n=5) producen una respuesta angiogénica positiva comparable a la que producen las células tumorales, mientras que los MfsT5 (1,2±0,2; n=5) y los MfsN (1,5±0,2; n=5) no modifican la densidad de vasos en comparación con la piel normal (Fig. 24).

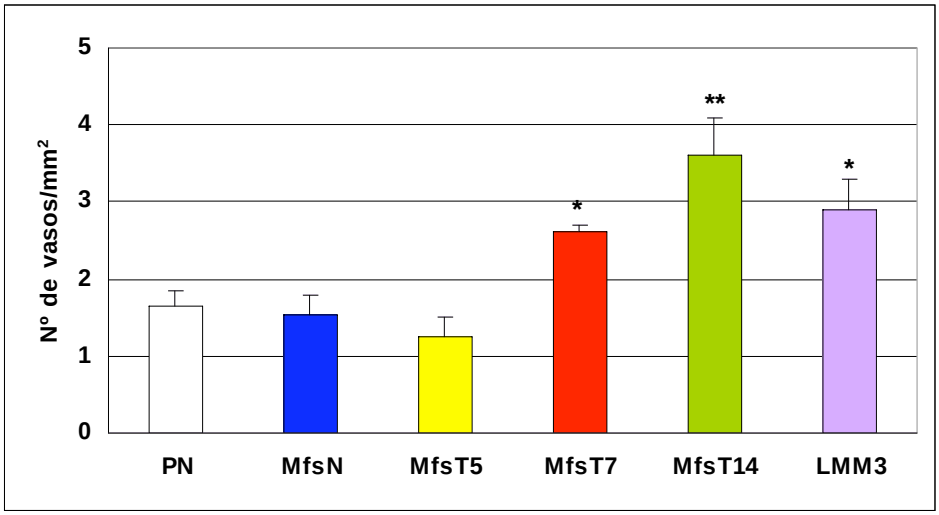

Figura 24: Angiogénesis inducida por macrófagos (Mfs) de portadores del tumor LMM3. Los Mfs ($3x10^6$) fueron inoculados intradérmicamente y la angiogénesis se midió como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=5 *p<0,001 y **p<0,0001 vs. piel normal (PN).

La respuesta angiogénica inducida por los MfsT7 y los MfsT14 se evaluó también con la expresión de PECAM-1 en homogenatos de piel del sitio angiogénico. Se observó que los MfsT7 y los MfsT14 inducen un aumento en la expresión de PECAM-1, mientras que los MfsT5 no la modifican en comparación con la piel normal que no expresa dicho marcador, como lo indican los valores de D.O./mm^2 (MfsT7: 0,2±0,1; MfsT14: 3,6±0,2; n=3) (Fig. 25). Estos resultados fueron coincidentes con el aumento del número de vasos observado en el ensayo de angiogénesis realizado con las mismas células.

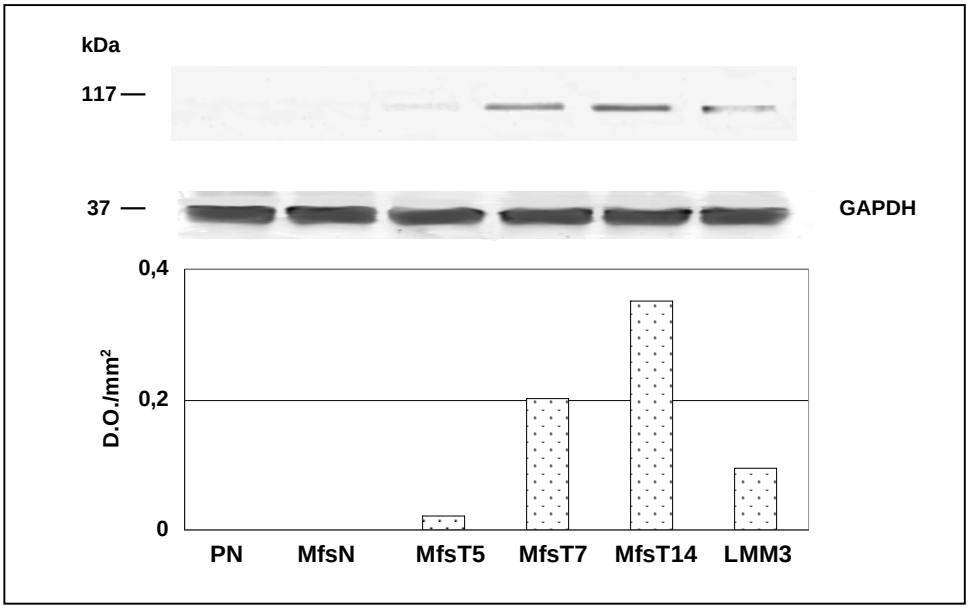

Figura 25: Expresión de PECAM-1 en homogenatos de piel inoculada con 3x10^5 macrófagos (Mfs) de animales normales (MfsN) o de portadores del tumor LMM3 (MfsT) en distintos estadíos. El peso molecular de la proteína esta indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. PN: piel normal.

Teniendo en cuenta que el VEGF-A es una molécula indispensable para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, se realizaron homogenatos de piel del sitio angiogénico y se estudió la expresión de dicha proteína por Wb. Se observó un aumento en la expresión de VEGF-A a 50 kDa en la piel del sitio inoculado con los MfsT7 con respecto al control como lo indican los valores de D.O./mm^2 (MfsT7:2,5±0,2 y PN:1,2±0,3; n=3) (Fig. 26). Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente al cuantificar el número de vasos y con los resultados observados en la expresión de PECAM-1.

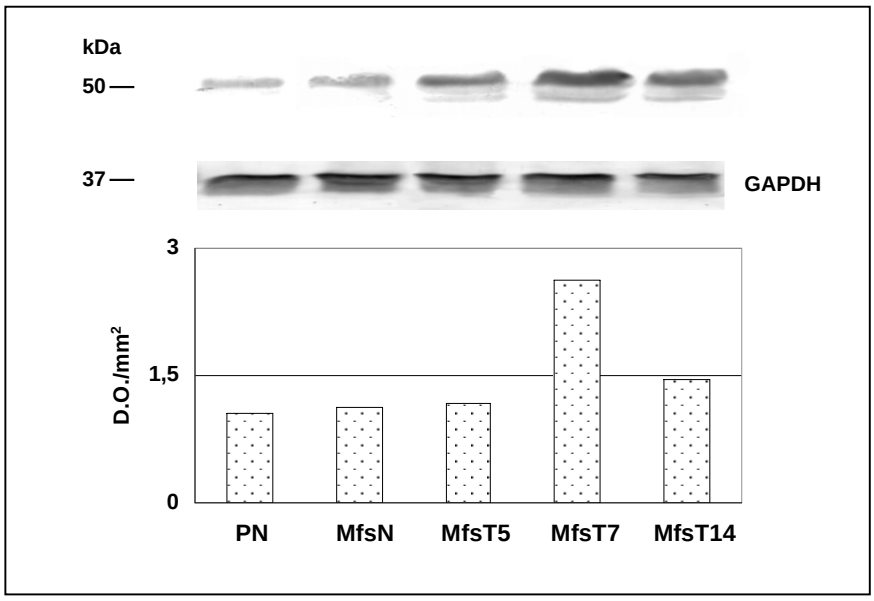

Figura 26: Western blot para detectar la expresión de VEGF-A en piel inoculada con macrófagos normales (MfsN) o de portadores de tumor (MfsT) (3x10^5). El peso molecular de la proteína está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. PN: piel normal.

3.1. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en la angiogénesis inducida por macrófagos

Como se demostró previamente, los MfsT7 y MfsT14 producen una respuesta angiogénica positiva comparable a la que producen las células tumorales. Por otro lado, también demostramos que las enzimas NOS, arginasa y COX están implicadas en la neovascularización inducida por las células LMM3. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se investigó la participación de dichas enzimas en el efecto angiogénico inducido por los MfsT. Para esto se trataron previamente los MfsT7 y los MfsT14 con los inhibidores enzimáticos y luego se inocularon en animales singeneicos.

La inhibición de la NOS, con L-NMMA 10^{-4} M (MfsT7:1,8±0,1; MfsT14: 2,3±0,2; n=5) o AG $2x10^{-3}$ M (MfsT7: 1,6±0,1; MfsT14: 2,7±0,2; n=5), redujo totalmente la respuesta angiogénica inducida por los MfsT7 y MfsT14.

Asimismo, al tratar los Mfs con NOHA 10^{-4} M (MfsT7: 1,5±0,2; MfsT14: 2,3±0,2; n=5), inhibidor de las arginasas, también disminuyó la respuesta neovascular en ambos grupos de células.

También se redujo significativamente la densidad de microvasos en la piel, inducida por los MfsT cuando se inhibió la actividad de COX con indometacina 10^{-6} M (MfsT7:1,4±0,2; MfsT14:2,8±0,1; n=5) o NS-398 10^{-5} M (MfsT7: 1,8 ±0,1; MfsT14: 2,4±0,3; n=5) (Fig. 27).

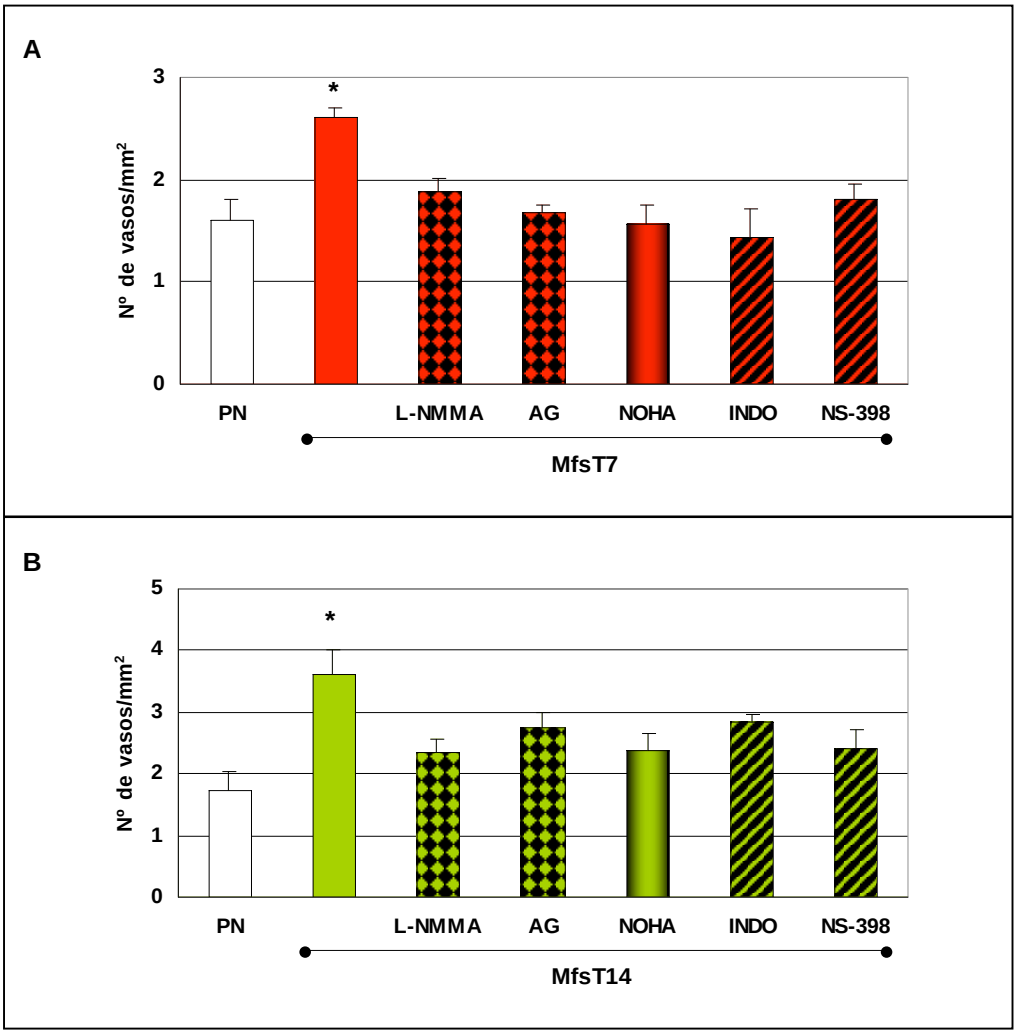

Figura 27: Ensayo de angiogénesis inducida por macrófagos provenientes de portadores de tumor (MfsT). A) MfsT7 ($3x10^5$) y B) MfsT14 ($3x10^5$) fueron tratados con N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M, aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, indometacina (INDO) 10^{-6} M, NS-398 10^{-5} M e inoculados intradérmicamente. La angiogénesis fue medida como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=5. *p<0,001 vs. PN (piel normal).

3.1.1. Expresión y actividad de óxido nítrico sintasas, arginasas y ciclooxigenasas en macrófagos

Teniendo en cuenta que los MfsT7 y MfsT14 son angiogénicos *per se* y que los productos de las enzimas NOS, arginasa y COX están involucrados en dicho efecto, se estudió la expresión y actividad de dichas enzimas en ambas poblaciones de Mfs. Por Wb detectamos que los Mfs expresan constitutivamente las isoformas NOS1 y NOS2 (Fig. 28 A). Los MfsT muestran una expresión menor de ambas isoformas de NOS que los MfsN (NOS1: 0,15±0,05; NOS2: 0,32±0,03, n=3) como lo indican los valores de D.O./mm^2. Asimismo la expresión de NOS1 y NOS2 disminuye en los MfsT con el tiempo de portación del tumor (MfsT7: NOS1: 0,71±0,11; NOS2:0,25±0,05; MfsT14: NOS1:0,02±0,01; NOS2:0,15±0,05; n=3).

Al medir la producción de NO_2^- se observó que ambas poblaciones de MfsT producen menores concentraciones del mismo que los MfsN (MfsN: 86,3±2,8; MfsT7: 59,9±2,2; MfsT14: 19,4±3,9; n=4); estos resultados concuerdan con una menor expresión de proteínas NOS en los MfsT (Fig. 28 B). La isoforma NOS3 no fue detectada en ninguna de las tres poblaciones de Mfs estudiadas.

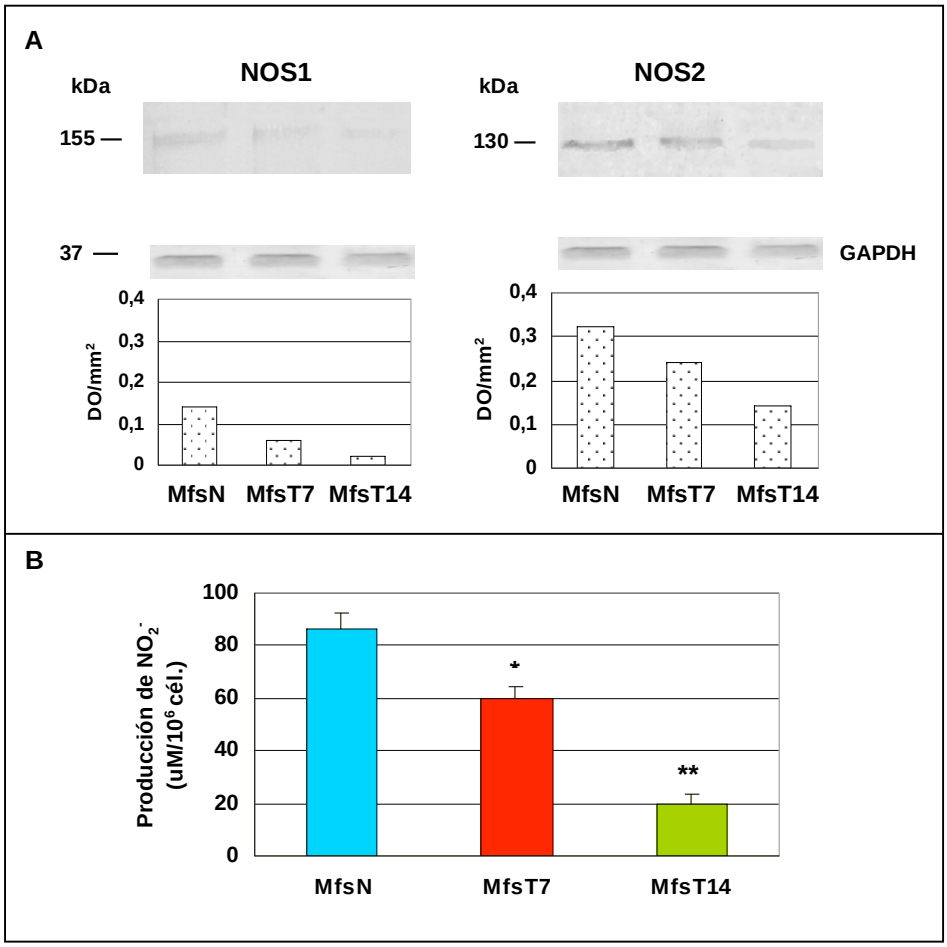

Figura 28: A) Detección de las isoformas de NOS en macrófagos provenientes de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor (MfsT7 y MfsT14) por Western blot. Los pesos moleculares indicados a la izquierda coinciden con los de las isoformas de la enzima. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. B) Actividad enzimática de NOS medida como producción de NO_2^- (uM/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4. *p<0,01 y ** p<0,0001 vs. MfsN.

Paralelamente, también fue examinada por Wb la expresión de las isoformas de arginasa. Todas la poblaciones de Mfs expresan constitutivamente las isoformas I y II de arginasa, siendo mayor la expresión de ambas isoformas en los MfsT que en los MfsN (Fig. 29 A). Dicha

expresión aumenta significativamente con los días de portación del tumor (MfsN: Arginasa I: 1,8±0,2; Arginasa II: 3,1±0,1; MfsT7: Arginasa I: 2,6±0,2; Arginasa II: 3,8±0,3; MfsT14: Arginasa I: 2,6±0,3; Arginasa II: 4,5±0,2; n=3) como lo indican los valores de D.O./mm^2.

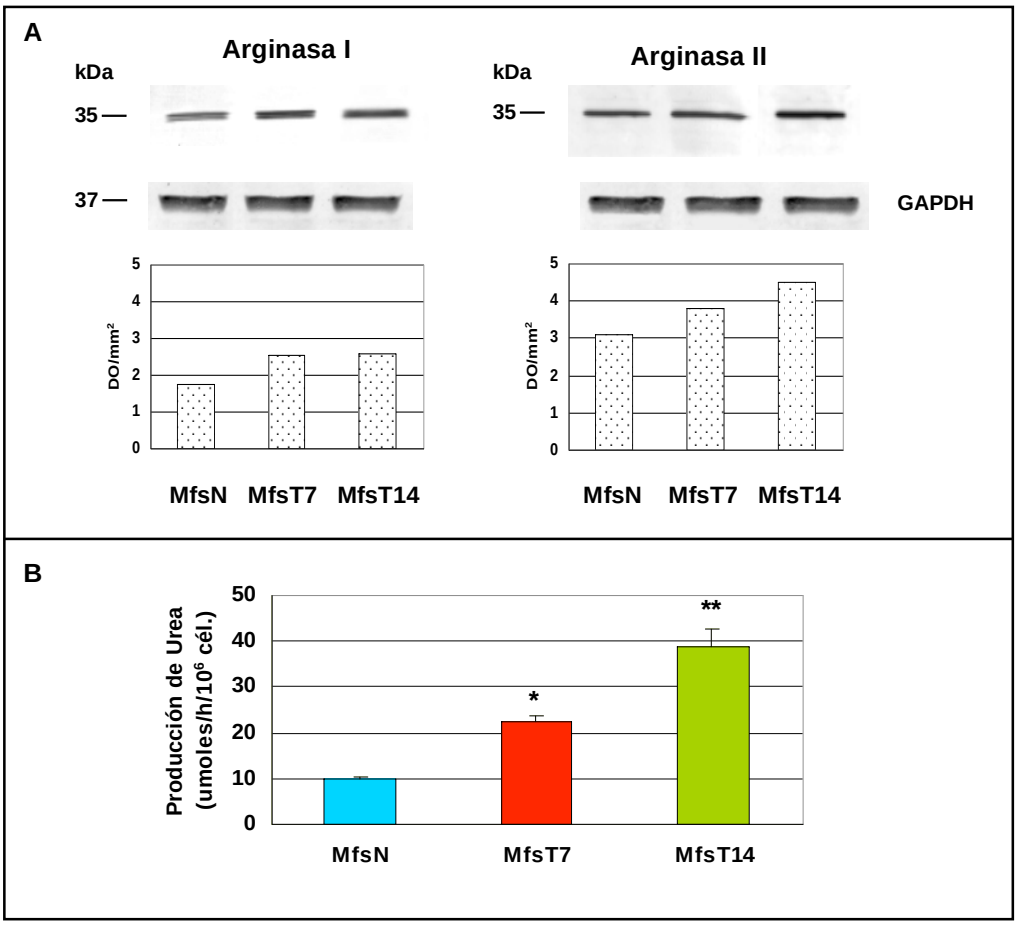

Figura 29: A) Detección de las isoformas de arginasa en macrófagos de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor (MfsT7 y MfsT14) por Western blot. Los pesos moleculares están indicados a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. B) Actividad de arginasa medida como producción de urea (μmoles/h/10^6 células). Los valores son promedios ± E.S. de n=4. *p<0,01 y **p<0,0001 vs. MfsN.

También se midió la actividad de dicha enzima determinando la producción de urea. Se observó que los MfsT sintetizan significativamente mayores niveles de urea que los MfsN y que la actividad de dicha enzima aumenta con los días de portación del tumor (MfsN: 10,2±0,3; MfsT7: 22,2±1,6; MfsT14: 38,8±3,8; n=4) (Fig. 29 B).

Además, caracterizamos la expresión de isoformas de la COX en las tres poblaciones de Mfs por Wb. En la Figura 30 A se observa que tanto los MfsN como los MfsT expresan las isoformas COX-1 y COX-2, siendo mayor la expresión de ambas en los MfsT (MfsT7:COX-1:1,80±0,15; COX-2:0,91±0,10; MfsT14: COX-1:1,85±0,18; COX-2:1,92±0,20; n=3) que en los MfsN (COX-1:1,25±0,15; COX-2: 0,10±0,10; n=3) como lo indican los valores de D.O./mm^2.

Para estudiar la actividad enzimática determinamos la producción de PGE_2 por radioinmunoensayo. La producción de este prostanoide es menor en MfsN que en los MfsT y en estos últimos aumenta con los días de portación del tumor (MfsN: 231,6±17,7; MfsT7: 372,2±40,5; MfsT14: 550±16,6; n=4) (Fig. 30 B).

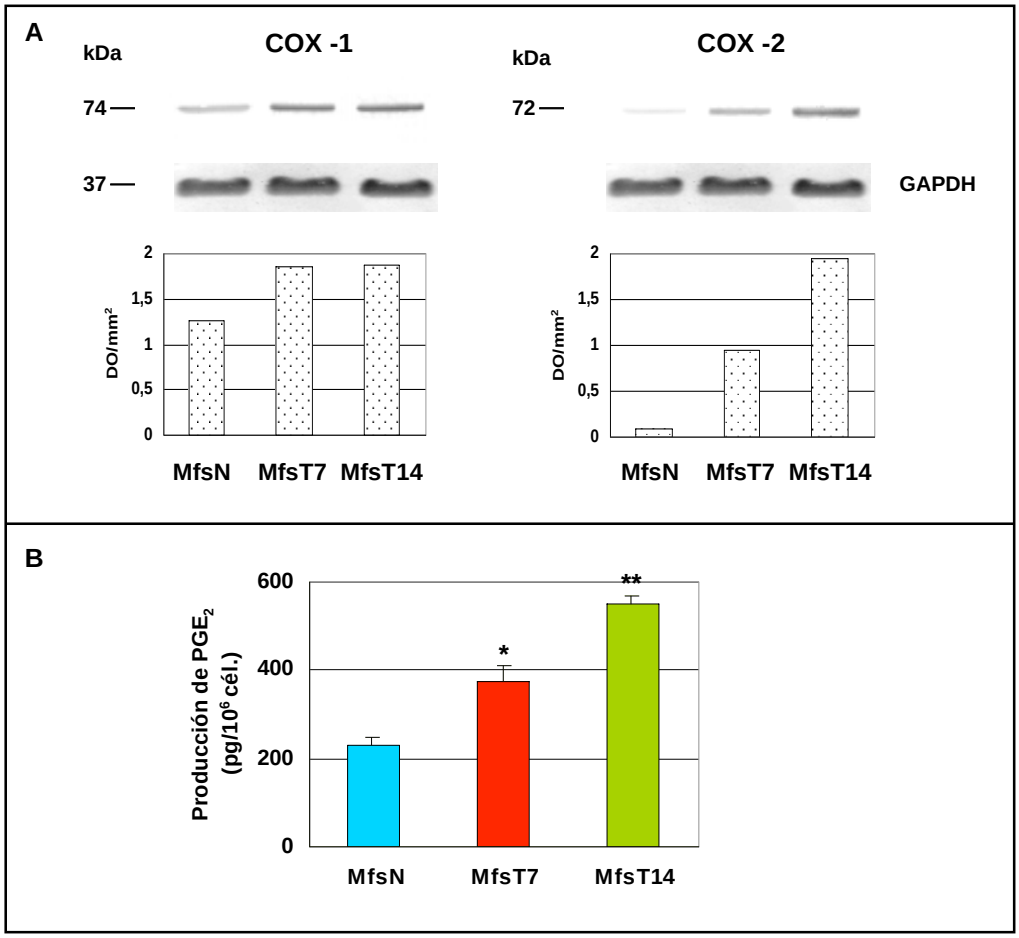

Figura 30: A) Detección de las isoformas de COX en macrófagos de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor (MfsT7 y MfsT14) por Western blot. Los pesos moleculares indicados a la izquierda coinciden con los de las isoformas de la enzima. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. B) Actividad de COX medida como producción de PGE_2 (pg/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4. *p<0,001 y **p<0,0001 vs. MfsN.

3.2. Interacciones entre las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en macrófagos

Como ya demostramos, las diferentes poblaciones de Mfs co-expresan las enzimas NOS y arginasa. Ambas utilizan el mismo sustrato, la arginina y por lo tanto podría haber interacciones entre ellas. Por otro lado, los Mfs también expresan la COX, cuya actividad puede ser regulada por el NO, producto de las NOS. Teniendo en cuenta esto, se estudiaron las interacciones entre las enzimas mencionadas, que se co-expresan en MfsN y MfsT midiendo sus productos en presencia de inhibidores específicos de cada una de ellas.

Como mencionamos anteriormente, los MfsT van perdiendo su capacidad de liberar NO_2^- al medio de cultivo a medida que aumentan los días de portación del tumor (MfsN: 86,3±6,4; MfsT7: 59,9±4,8; MfsT14: 19,4±4,0; n=5). Ambos inhibidores de NOS, L-NMMA 10^{-4} M (MfsN: 60,0±3,2; MfsT7: 40,0±2,3; n=5) o AG $2x10^{-3}$ M (MfsN: 73,7±2,6; MfsT7: 51,6±1,7; n=5), redujeron la producción de NO_2^- tanto en los MfsN como en los MfsT7.

En la Figura 31 se muestra que los inhibidores de arginasa, NOHA 10^{-4} M (MfsN: 118,8±3,7; MfsT7: 80,0±2,9; n=5) o valina $5x10^{-2}$ M (MfsN: 110,0±3,9; MfsT7: 92,7±3,4; n=5), potenciaron la síntesis de NO_2^- en MfsN y MfsT7.

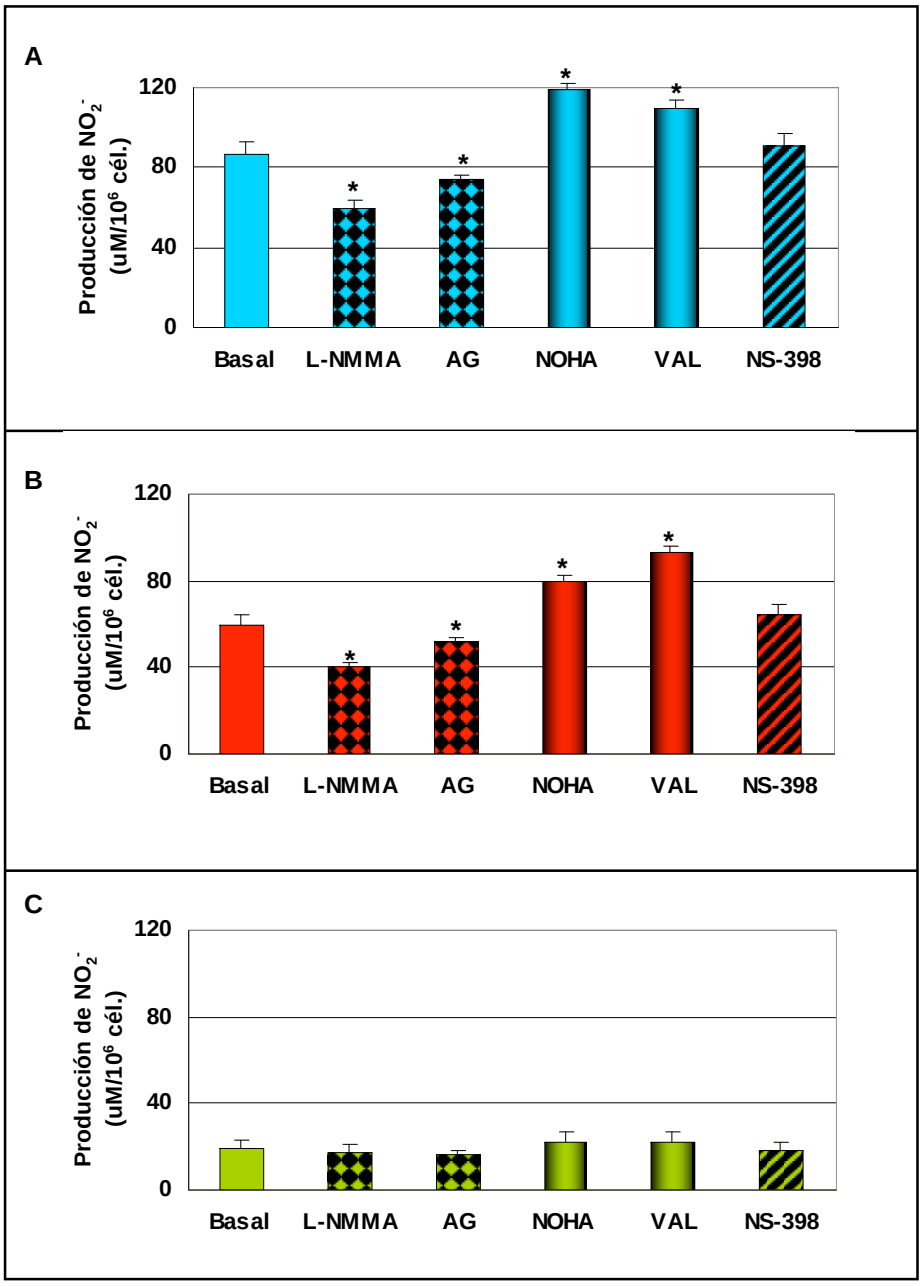

Figura 31: Actividad de NOS en macrófagos (Mfs). La actividad de NOS se midió como producción de NO_2^- (μM/10^6 cél.) en ausencia y en presencia de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M, aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, valina (VAL) $5x10^{-2}$ M, NS-398 10^{-5} M en Mfs provenientes de animales A) normales (MfsN) y de portadores de tumor, B) MfsT7 y C) MfsT14. Los valores son promedios ± E.S. de n=5 experimentos realizados por duplicado. *p<0,01 vs. Basal (células sin tratamiento).

En los MfsT14 no se produjo inhibición significativa de la producción de NO_2^- en presencia de estos inhibidores (L-NMMA: 17,4±3,6; AG: 16,4±1,5; NOHA: 22,5±4,6; valina: 21,9±4,5; n=5) probablemente debido a que expresan bajos niveles de NOS.

El NS-398 10^{-5} M, inhibidor de COX-2, no modificó los niveles de NO_2^- en ninguna de las 3 poblaciones (MfsN: 90,6±6,7; MfsT7: 64,1±5,1; MfsT14: 18,5±3,8; n=5) (Fig. 31). Esto indicaría que los productos de la COX no regulan la actividad de NOS en ninguna de las tres poblaciones de Mfs.

Urea y ornitina son los productos de la biotransformación de la arginina vía arginasa y una alta actividad de esta enzima está relacionada con la capacidad proliferativa de las células que la expresan. Los MfsT sintetizan significativamente mayores niveles de urea que los MfsN (MfsN: 10,1±0,3; MfsT7: 22,2±1,6; MfsT14: 38,8±3,8; n=4). El tratamiento con NOHA 10^{-4} M (MfsN: 8,6±0,3; MfsT7: 9,4±0,4; MfsT14: 23,6±2,3; n=4) o valina $5x10^{-2}$ M (MfsN: 3,9±0,1; MfsT7: 13,1±0,7; MfsT14: 3,9±0,3; n=4) redujo la producción de urea tanto en los MfsN como en los MfsT (Fig. 32).

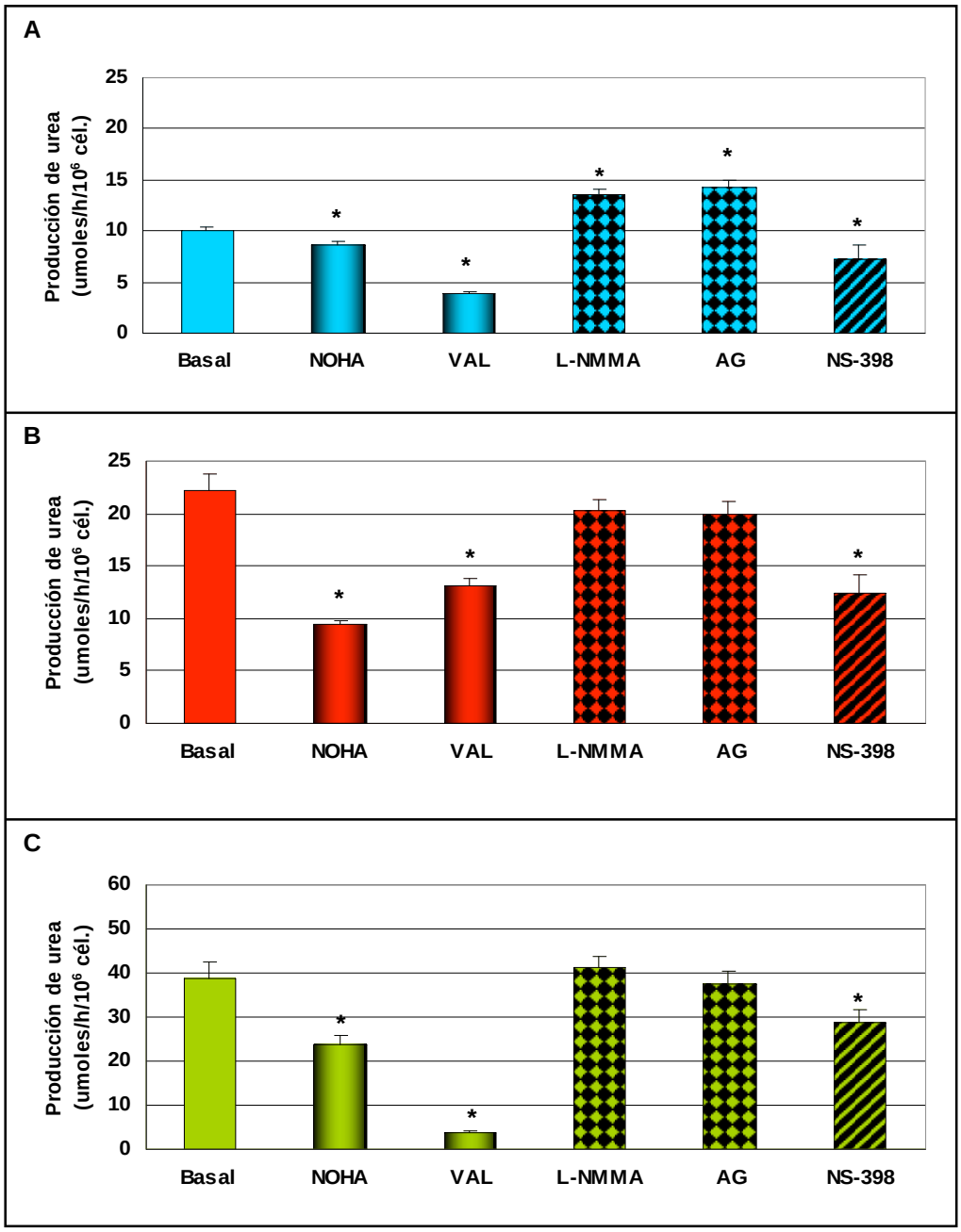

Figura 32: Actividad de arginasa en macrófagos (Mfs). La actividad de arginasa se midió como producción de urea (μmoles/h/10^6 cél.) en ausencia y en presencia de N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, valina (VAL) $5x10^{-2}$ M, N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M, aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, NS-398 10^{-5} M en Mfs provenientes de animales A) normales (MfsN) y de portadores de tumor, B) MfsT7 y C) MfsT14. Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado. *p<0,001 vs. Basal (células sin tratamiento).

Sin embargo, cuando se inhibió la actividad de NOS con LNMMA 10^{-4} M (MfsN: 13,5±0,5; n=4) o AG $2x10^{-3}$ M (MfsN: 14,2±0,7; n=4) se produjo un aumento de los niveles de urea sólo en los MfsN (Fig. 32). Esto confirma que existe una regulación recíproca entre las enzimas NOS y arginasa en los MfsN.

Cuando los Mfs fueron tratados con el inhibidor de COX, NS-398 10^{-5} M (MfsN: 7,1±1,4; MfsT7: 12,4±1,7; MfsT14: 28,7±2,8; n=4) disminuyó la producción de urea en todas las poblaciones de Mfs, indicando un efecto modulador positivo de los productos de COX-2 sobre la actividad de la arginasa (Fig. 32).

Con respecto a la actividad de COX demostramos que los MfsT liberan más PGE_2 al medio de cultivo que los MfsN (MfsN: 231,6±17,7; MfsT7: 372,2±40,5; MfsT14: 550,0±16,6; n=4). El tratamiento con indometacina 10^{-6} M (MfsN: 16,6±5,6; MfsT7: 5,6±1,9; MfsT14: 6,9±2,3; n=4) o NS-398 10^{-5} M (MfsN: 7,2±2,2; MfsT7: 11,1±9,1; MfsT14: 5,6±2,6; n=4) inhibió completamente la producción de PGE_2 tanto en los MfsN como en los MfsT.

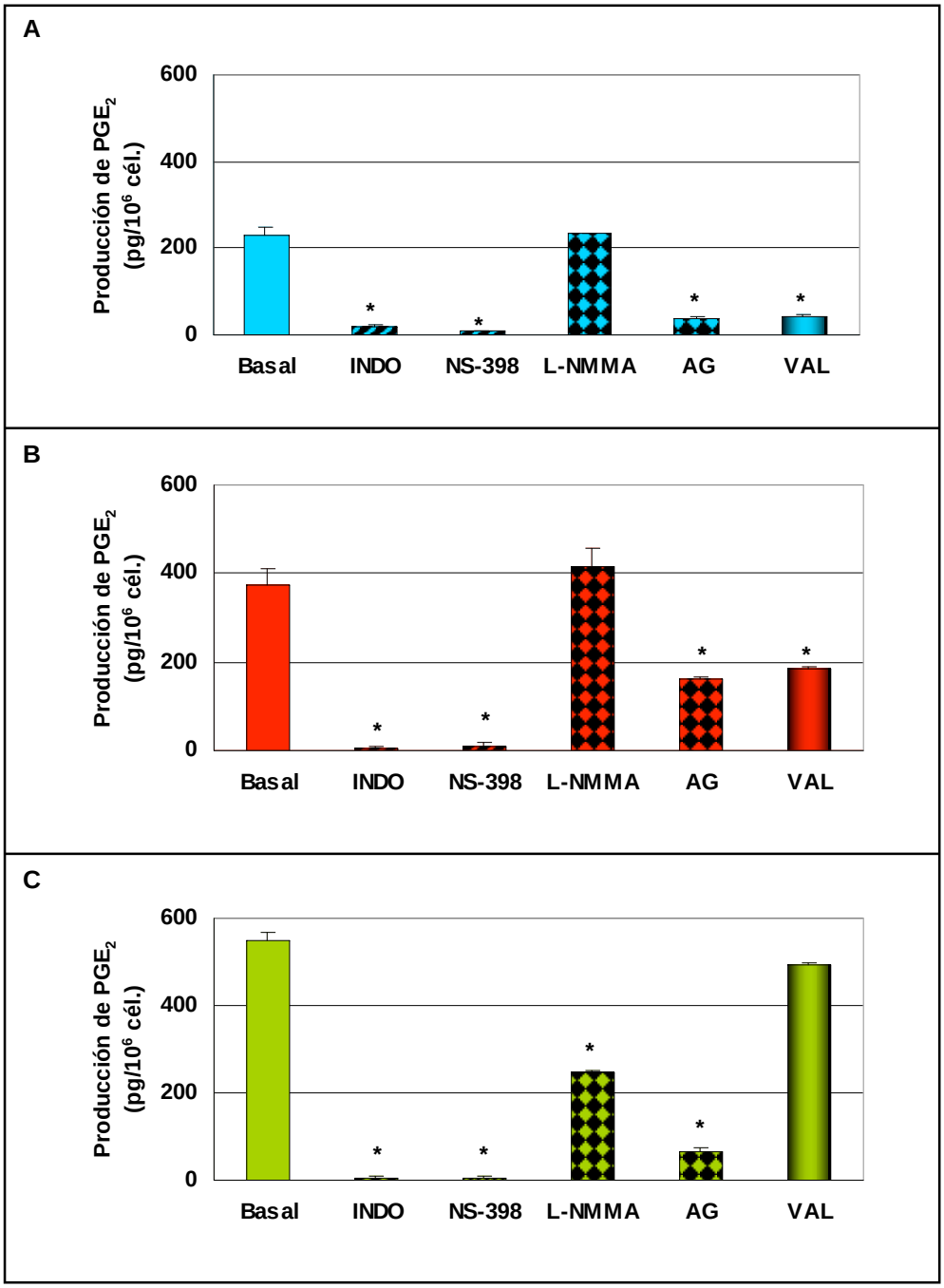

Figura 33: Actividad de COX en macrófagos (Mfs). La actividad de COX se midió como producción de PGE_2 (pg/10^6 cél.) en ausencia y en presencia de indometacina (INDO) 10^{-6} M, NS-398 10^{-5} M, N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M, aminoguanidina (AG) $2x10^{-3}$ M, valina (VAL) $5x10^{-2}$ M en Mfs provenientes de animales A) normales (MfsN) y de portadores de tumor, B) MfsT7 y C) MfsT14. Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado. *p<0,0001 vs. Basal (células sin tratamiento).

El tratamiento de los Mfs con el inhibidor de NOS2, AG $2x10^{-3}$ M (MfsN: 38,8±2,9; MfsT7: 161,1±5,5; MfsT14: 66,6±7,2; n=4) redujo la producción de PGE_2 en las 3 poblaciones de Mfs. Sin embargo, el tratamiento con L-NMMA 10^{-4} M sólo inhibió la liberación de PGE_2 en los MfsT14 (MfsN: 233,3±3,3; MfsT7: 416,6±38,8; MfsT14: 244,4±6,5; n=4). Esto demuestra que principalmente los productos de la NOS2 regulan positivamente la actividad de COX.

El tratamiento previo de los Mfs con valina $5x10^{-2}$ M produce una inhibición de la producción de PGE_2 en los MfsN y en los MfsT7, pero no en los MfsT14 (MfsN: 44,4±2,2; MfsT7: 183,3±5,3; MfsT14: 494,4±4,8; n=4) (Fig. 33). Sobre la base de estos resultados, la producción de PGE_2 derivada de COX esta regulada positivamente por los productos de la arginasa. Este efecto no se observa en los MfsT14.

4. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR

Previamente se describió que líneas diferentes de adenocarcinomas mamarios murinos expresan receptores muscarínicos. La activación de dichos receptores con un agonista muscarínico promueve la tumorigénesis incrementando la proliferación celular, la angiogénesis y el crecimiento tumoral in vivo (Español AJ y Sales ME, 2004).

Teniendo en cuenta que existen escasos antecedentes acerca de la expresión y función del SCnN en células inmunes, se realizaron ensayos de inmunomarcación de los subtipos de RM por Wb con anticuerpos específicos en las distintas poblaciones de Mfs. En la Figura 34 se muestra una menor expresión de los subtipos M_1 (MfsT7:0,55±0,05; MfT14: 0,35±0,04; n=3) y M_3 (MfsT7: 0,02±0,01; MfsT14: 0,02±0,01; n=3) en Mfs provenientes de portadores de tumor comparándolos con MfsN (M_1:0,88±0,09; M_3:0,05±0,03, n=3) como lo indican los valores de D.O./mm^2; por el contrario la banda proteica correspondiente al subtipo M_2 es más densa en los MfsT (MfT7:0,05±0,02; MfsT14:0,1±0,02; n=3) que en los MfsN (0,01±0,01, n=3).

Con respecto al subtipo M_4 se observó un aumento no significativo de su expresión en los MfsT con respecto a los MfsN, mientras que la expresión del subtipo M_5 es significativa solo en los MfsT14 (MfsN: 0,02±0,1; MfsT14:

0,06±0,01; n=3). Estos resultados indican una expresión diferencial de RM entre MfsN y MfsT; mas aún, también se observan diferencias cuantitativas durante los distintos estadíos de portación del tumor (MfsT7 vs. MfsT14).

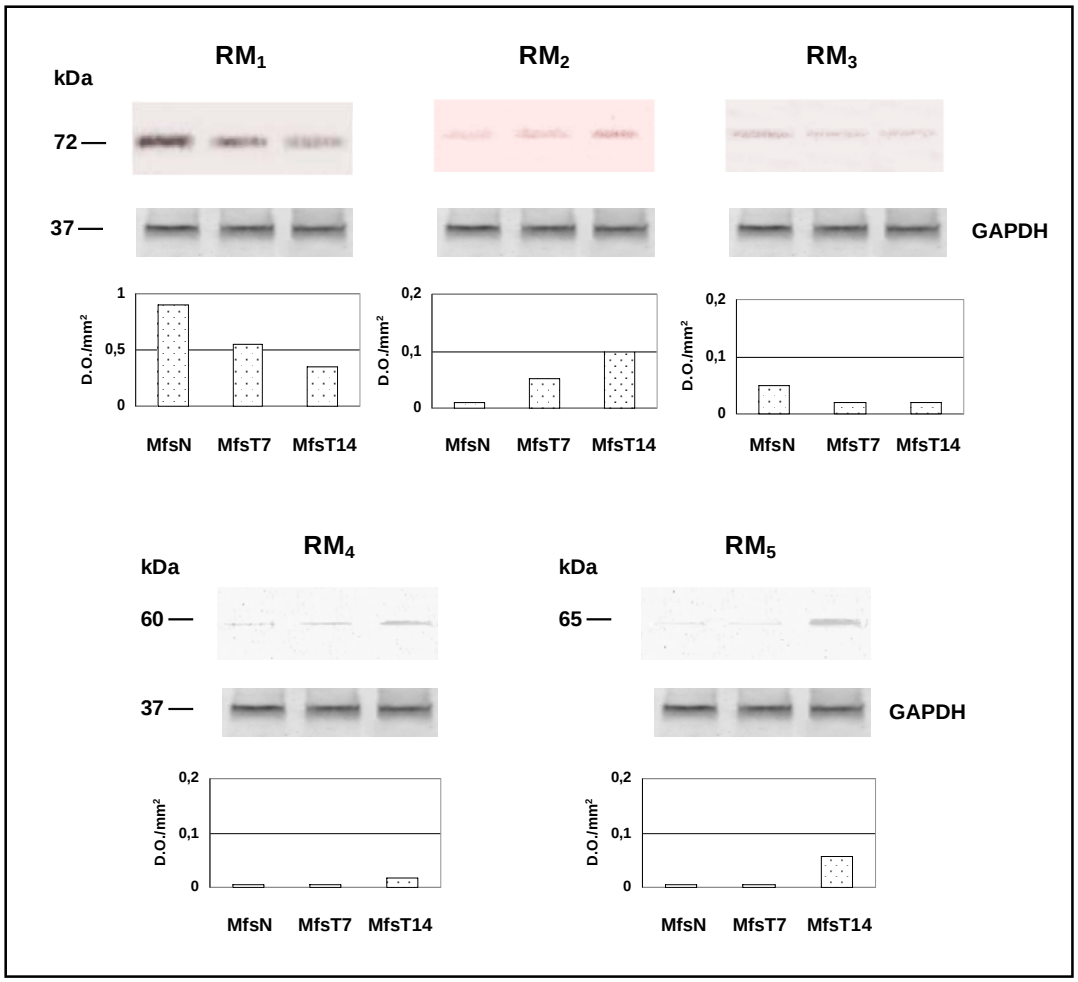

Figura 34: Detección de receptores muscarínicos (RM) en macrófagos de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor (MfsT) por Western blot. Los pesos moleculares indicados a la izquierda corresponden a los diferentes subtipos de RM. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante. Se muestra el análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) de un ensayo representativo de tres semejantes.

Debido a que los Mfs expresan RM, se decidió estudiar su funcionalidad por estimulación colinérgica de los Mfs con el agonista muscarínico CARB. Sólo el CARB 10^{-7}M incrementó significativamente la respuesta angiogénica de los MfsT7 (control: 2,8±0,1; CARB: 4,9±0,4; n=3) (Fig. 35 A).

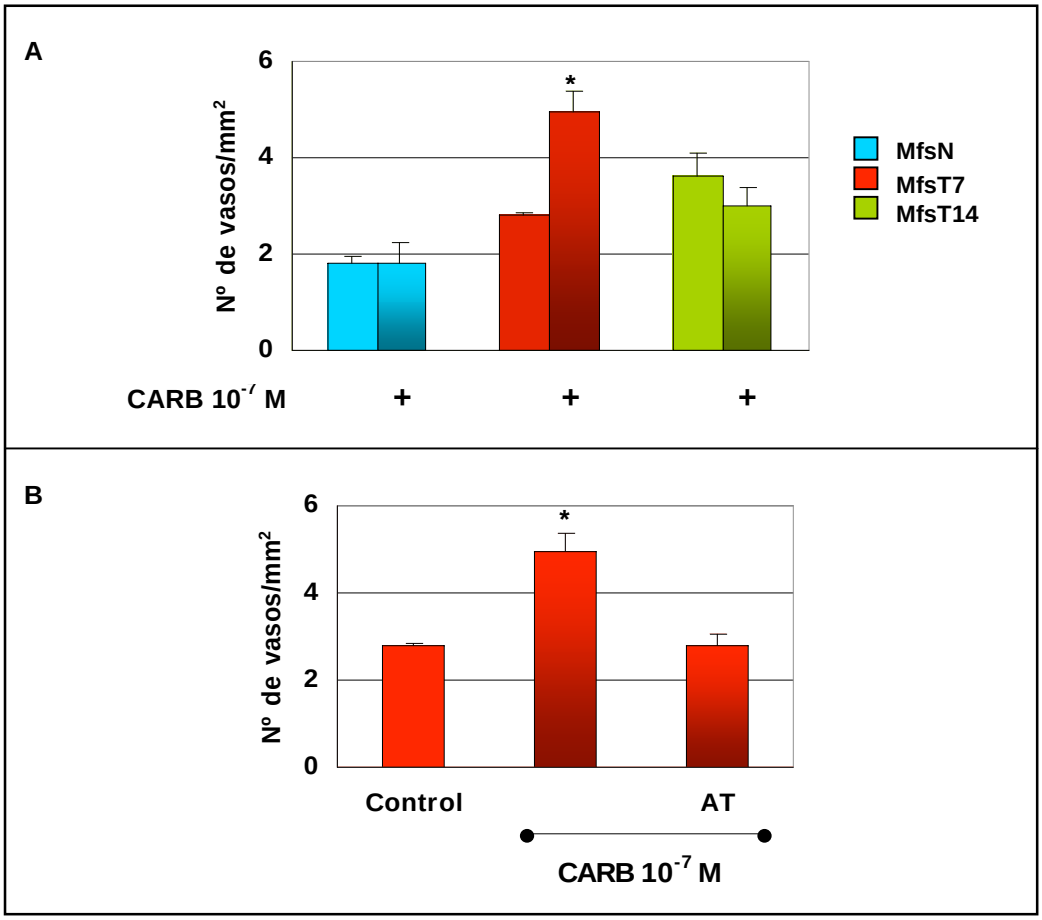

Figura 35: A) Macrófagos ($3x10^5$) de animales normales (MfsN) y de portadores de tumor (MfsT7 y MfsT14) tratados con carbacol (CARB). B) MfsT7 en ausencia o en presencia de atropina (AT) 10^{-6} M e inoculados intradermicamente. La angiogénesis se midió como Nº de vasos/ mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=3 experimentos realizados por duplicado. $^*p<0,001$ vs. Control (células sin tratamiento).

El tratamiento previo con AT 10^{-6} M, antagonista no selectivo de RM, inhibió el efecto estimulante del CARB en los MfsT7 (2,7±0,2; n=3) (Fig. 35 B). Los MfsN o los MfsT14 no respondieron al agonista en ninguna de las concentraciones utilizadas (Control MfsN: 1,7±0,1; CARB MfsN: 1,8±0,4; Control MfsT14: 3,6±0,4; CARB MfsT14: 3,0±0,3; n=3).

4.1. Participación de los subtipos de receptores muscarínicos en el efecto angiogénico del carbacol

El agonista colinérgico CARB, aumentó la neovascularización inducida por los MfsT7, lo que indicó la presencia de RM funcionales en estas células. Por lo tanto, se investigó que subtipos de RM estaban involucrados en dicho efecto.

En la figura 36 se muestra que el tratamiento de los MfsT7 con pirenzepina 10^{-6} M (2,4±0,6; n=3), antagonista M_1 selectivo o 4-DAMP 10^{-6} M (2,6±0,4; n=3), antagonista M_3 selectivo, inhibió completamente el efecto estimulante del CARB sobre la angiogénesis, mientras que la preincubación con metoctramina 10^{-6} M (3,3±0,1; n=3), un antagonista M_2 selectivo, bloqueó parcialmente la acción del CARB.

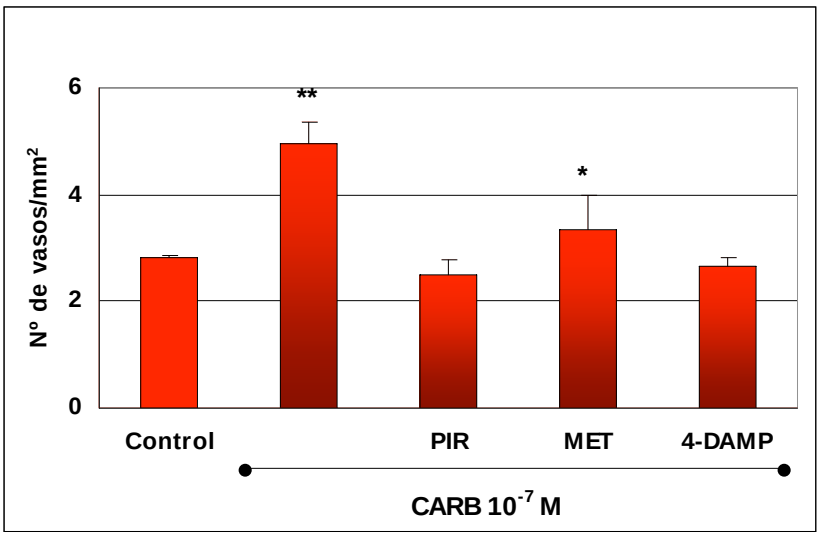

Figura 36: Macrófagos ($3x10^5$) de portadores de tumor de 7 días tratados con carbacol (CARB) 10^{-7}M en ausencia o en presencia de pirenzepina (PIR) 10^{-6} M, metoctramina (MET) 10^{-6} M y 4-DAMP 10^{-6} M e inoculados intradérmicamente. La angiogénesis fue medida como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=3 experimentos realizados por duplicados. * $p<0,05$; ** $p<0,001$ vs. Control (células sin tratamiento).

4.2. Participación de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa en el efecto angiogénico del carbacol

Es sabido que clásicamente los RM se acoplan a distintas enzimas efectoras; entre ellas se encuentran la NOS y la COX. Se estudió la participación de estas enzimas en el efecto que ejerce el CARB sobre la neovascularización que producen los MfsT7. En la Figura 37 se muestra que la preincubación de los MfsT7 con L-NMMA 10^{-4} M (3,4±0,1; n=3), inhibidor de NOS; produce una disminución parcial del efecto del CARB. El tratamiento con NOHA 10^{-4} M (2,4±0,6; n=3) inhibidor de arginasas o con indometacina 10^{-6} M (1,9±0,9; n=3) o NS-398 10^{-5} M (1,3±0,3; n=3),

inhibidores de COX, redujo significativamente la angiogénesis producida por el CARB.

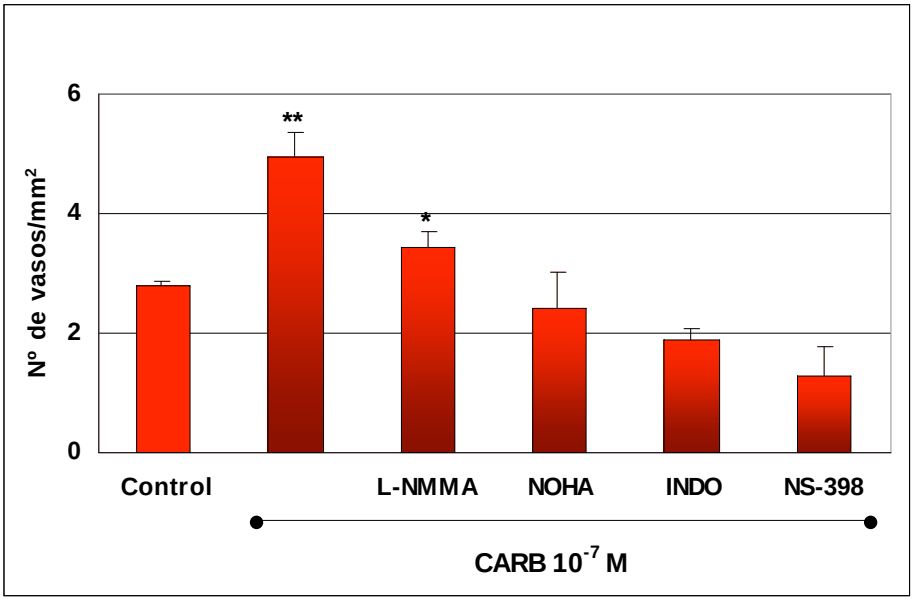

Figura 37: Macrófagos ($3x10^5$) provenientes de portadores de tumor de 7 días tratados con carbacol (CARB) 10^{-7}M en ausencia o en presencia de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) 10^{-4} M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, indometacina (INDO) 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M e inoculados intradérmicamente. La angiogénesis fue medida como Nº de vasos/mm^2 de piel. Los valores son promedios ± E.S. de n=3 experimentos realizados por duplicado. * $p<0,05$ y ** $p<0,001$ vs. Control (células sin tratamiento).

4.3. Modulación de la actividad de las enzimas óxido nítrico sintasa, arginasa y ciclooxigenasa por carbacol

Teniendo en cuenta que las enzimas NOS, arginasa y COX están implicadas en el efecto que el CARB ejerce sobre la neovascularización inducida por los MfsT7, se estudió la capacidad del agonista para modular la actividad de dichas enzimas. Observamos que el tratamiento con concentraciones crecientes de CARB no modificó la producción de NO_2^- en

los MfsT7 (Basal: 57,9±2,0; n=4) en ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 38).

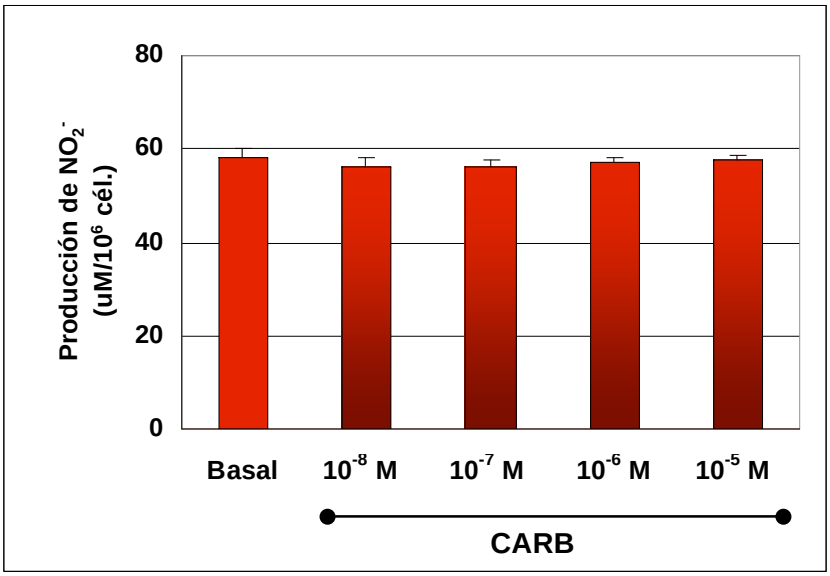

Figura 38: Macrófagos (10^6 cél./pozo) provenientes de portadores de tumor de 7 días tratados con concentraciones crecientes de carbacol (CARB). La actividad de NOS se midió como producción de NO_2^- (μM/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado.

El tratamiento de los MfsT7 con el agonista muscarínico, incrementó la producción de urea sólo a la concentración 10^{-7} M (Basal: 22,2±1,6; CARB 10^{-7} M: 76,6±1,6; n=4) (Fig. 39 A). Este aumento es bloqueado por atropina 10^{-6} M y NOHA 10^{-4} M, inhibidor no selectivo de arginasas (AT: 28,0±1,9; NOHA: 20±1; n=4) (Fig. 39 B).

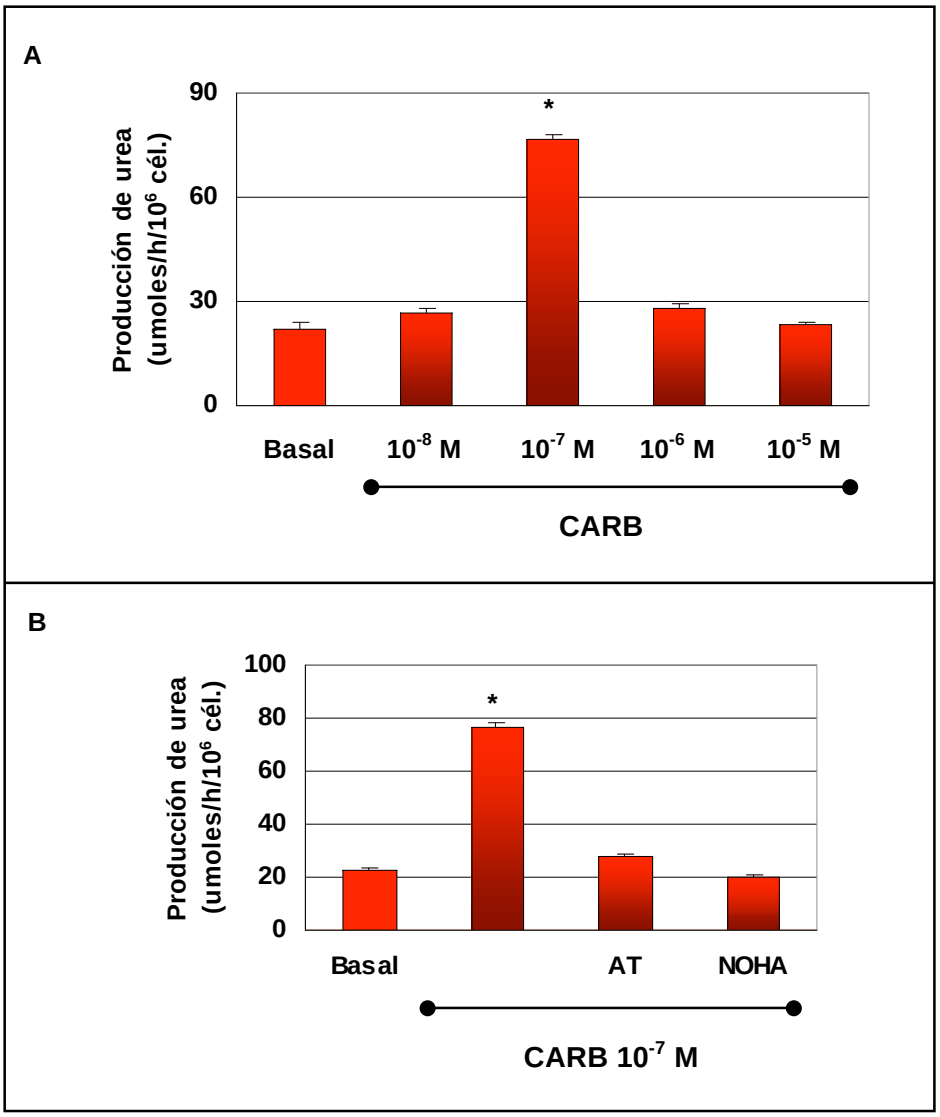

Figura 39: A) Macrófagos (10^6 cél./pozo) de portadores de tumor de 7 días tratados con concentraciones crecientes de carbacol (CARB). B) MfsT7 tratados con CARB 10^{-7} M en ausencia o en presencia de atropina (AT) 10^{-6}M o N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4}M. La actividad de arginasa se midió como producción de urea (μmoles/h/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado. *p<0,0001 vs. Basal (células sin tratamiento).

También se determinó la producción de PGE_2 en los MfsT7 tratados con concentraciones crecientes de CARB. Se observó que sólo la concentración 10^{-7} M estimuló la liberación de PGE_2 (Basal: 577,4±48,9; CARB 10^{-7} M: 1122,6±29,8; n=4) (Fig. 40 A).

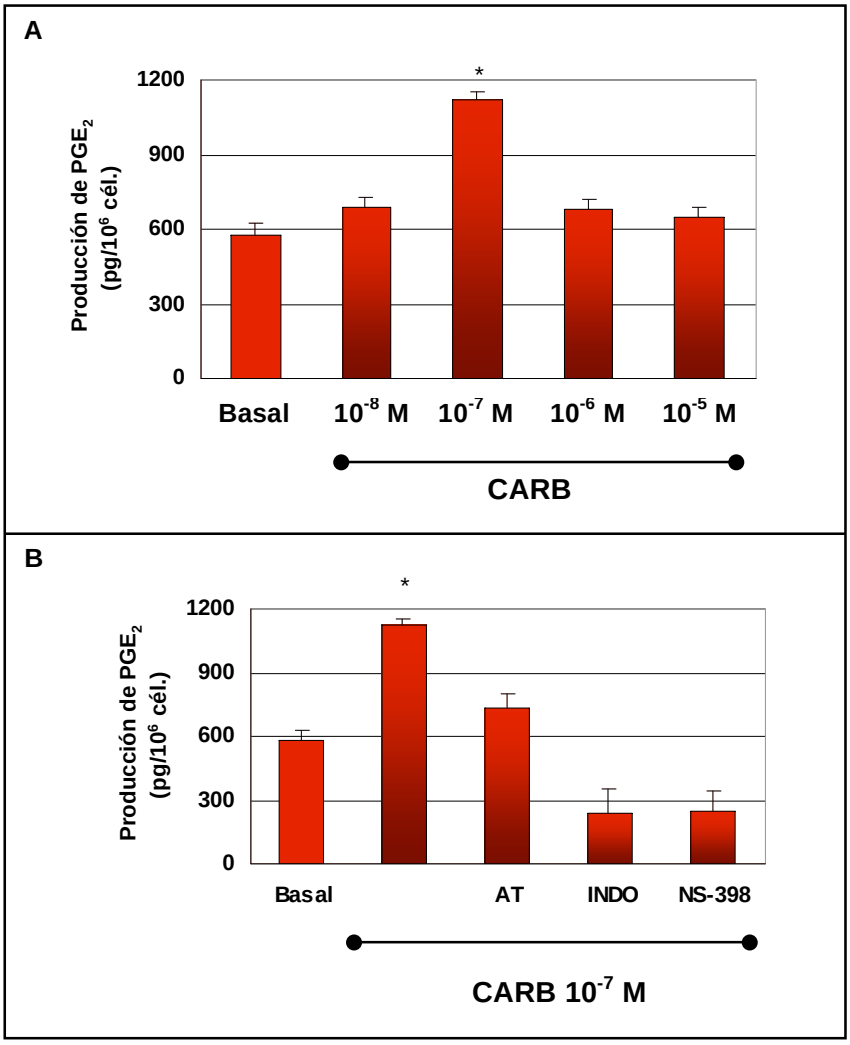

Figura 40: A) Macrófagos (10^6 cél./pozo) de portadores de tumor de 7 días tratados con concentraciones crecientes de carbacol (CARB). B) MfsT7 tratados con CARB 10^{-7} M en ausencia o en presencia de atropina (AT) 10^{-6} M, indometacina (INDO) 10^{-6} M o NS-398 10^{-5} M. La actividad de COX se midió como producción de PGE_2 (pg/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado. *p<0,001 vs. Basal (células sin tratamiento).

El efecto producido por el CARB fue bloqueado por el tratamiento previo de las células con atropina 10^{-6} M (736,3±67,7; n=4), con indometacina 10^{-6} M (238,8±110,2; n=4) o con NS-398 10^{-5} M (246,9±99,5; n=4) (Fig. 40 B).

4.4. Participación de los distintos subtipos de receptores muscarínicos en el efecto del carbacol

Teniendo en cuenta que el CARB modifica la actividad de la arginasa se estudió que subtipos de RM estaban implicados en este efecto. Se observó que tanto el tratamiento de los MfsT7 con pirenzepina 10^{-6} M (26,0±1,1; n=4) como con metoctramina 10^{-6} M (44,5±0,8; n=4) inhibieron el efecto que produce el CARB (76,6±1,6; n=4) (Fig. 41 A). El tratamiento con 4-DAMP 10^{-6} M no modificó el efecto estimulante del CARB (74±2; n=4). Estos resultados indican que la producción de urea por la arginasa esta acoplada a la activación de los subtipos M_1 y M_2.

También la actividad de COX es estimulada por el tratamiento con CARB en los MfsT7. Este efecto del agonista es bloqueado al preincubar los MfsT7 con 4-DAMP 10^{-6} M (507,6±34,8; n=4) pero no cuando son tratados con pirenzepina 10^{-6} M (1100,0±16,0; n=4) o con metoctramina 10^{-6} M (1150,2±28,4; n=4). (Fig. 41 B).

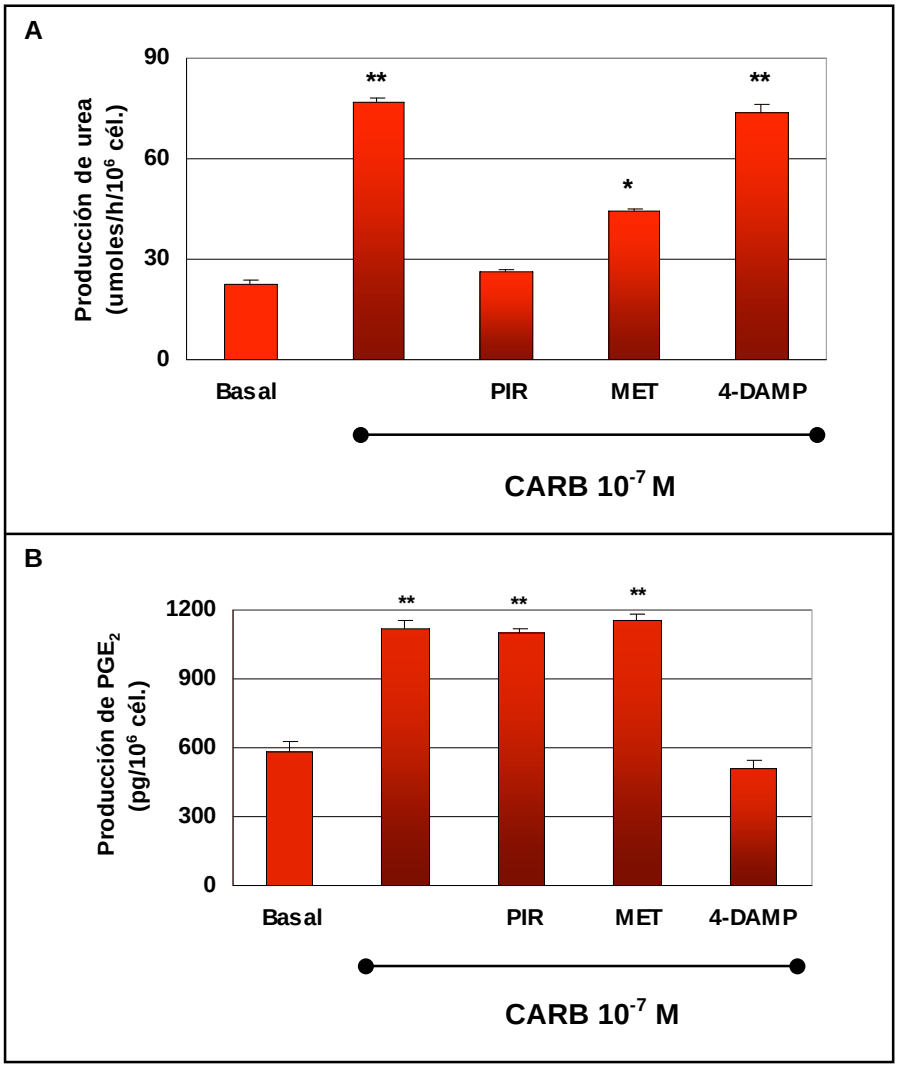

Figura 41: Macrófagos de portadores de tumor de 7 días tratados con carbacol (CARB) en ausencia o en presencia de pirenzepina (PIR) 10^{-6} M, metoctramina (MET) 10^{-6} M, 4-DAMP 10^{-6} M. A) La actividad de arginasa se midió como producción de urea (μmoles/h/10^6 cél.). B) La actividad de COX se midió como producción de PGE_2 (pg/10^6 cél.). Los valores son promedios ± E.S. de n=4 experimentos realizados por duplicado. *p<0,001 y **p<0,0001 vs. Basal (células sin tratamiento).

4.5. Efecto del carbacol sobre la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A

Los MfsT7 son capaces de expresar en su membrana VEGF-A (Fig. 42 A). Por lo tanto, se investigó el efecto del agonista muscarínico sobre la expresión de dicha proteína. El tratamiento previo de los MfsT7 con CARB 10^{-7} M indujo un aumento significativo en la expresión de la proteína VEGF-A con respecto al control sin tratamiento (CARB:0,12±0,02; control:0,05±0,01; n=3) como indican los valores de D.O./mm^2 (Fig. 42 B).

La preincubación de las células con metoctramina 10^{-6} M o pirenzepina 10^{-6} M bloqueó la acción del CARB sobre la expresión de VEGF-A, mientras que el tratamiento con 4-DAMP 10^{-6} M no produjo ninguna modificación. Cuando los Mfs fueron tratados con NOHA 10^{-4} M, NS-398 10^{-5} M o indometacina 10^{-6} M la expresión de VEGF-A disminuyó aproximadamente un 30% (Fig. 42 B).

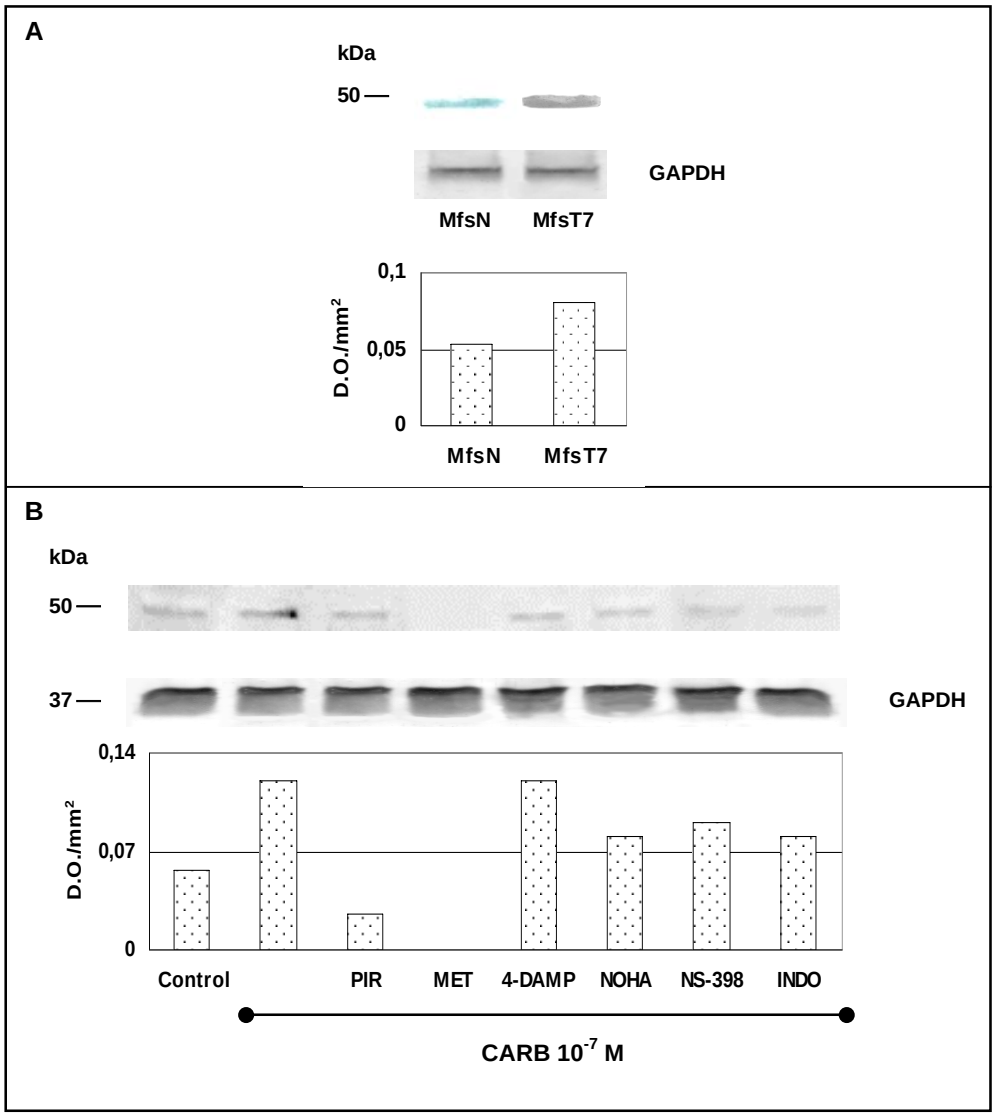

Figura 42: Detección de la expresión de VEGF-A por Western blot en A) macrófagos de animales normales (MfsN) y de portadores de 7 días (MfsT7). B) MfsT7 sin tratamiento (Control) o tratados con carbacol (CARB) 10^{-7} M en ausencia o en presencia de pirenzepina (PIR) 10^{-6} M, metoctramina (MET) 10^{-6} M, 4-DAMP 10^{-6} M, N^{ω}hidroxi-L-arginina (NOHA) 10^{-4} M, NS-398 10^{-5} M o indometacina (INDO) 10^{-6} M. El peso molecular de la proteína esta indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

5. LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

La linfoangiogénesis es un proceso cronológicamente posterior a la angiogénesis y parece ser un mecanismo importante aunque menos conocido para la diseminación tumoral. Por lo tanto, se estudió la expresión de proteínas que son marcadoras de linfoangiogénesis: VEGF-C y LYVE-1 en la piel de animales con 5, 7 y 14 días de portación del tumor LMM3. Observamos un aumento en la inmunoreactividad para VEGF-C a 50 y 30 kDa a partir de los 5 días de portación del tumor (Fig. 43 A). A los 7 días de portación del tumor se produce el incremento máximo en la banda de 30 kDa con respecto al control (PT7: 0,52±0,02; PN:0,03±0,01; n=3) y a los 14 días se observa un máximo para la banda de 80 kDa con respecto al control (PT14: 0,62±0,06; PN 0,30±0,05; n=3).

Además observamos un aumento significativo del 55% en la expresión de LYVE-1 partir de los 7 días de portación del tumor LMM3, con respecto al control de piel normal (Fig. 43 B).

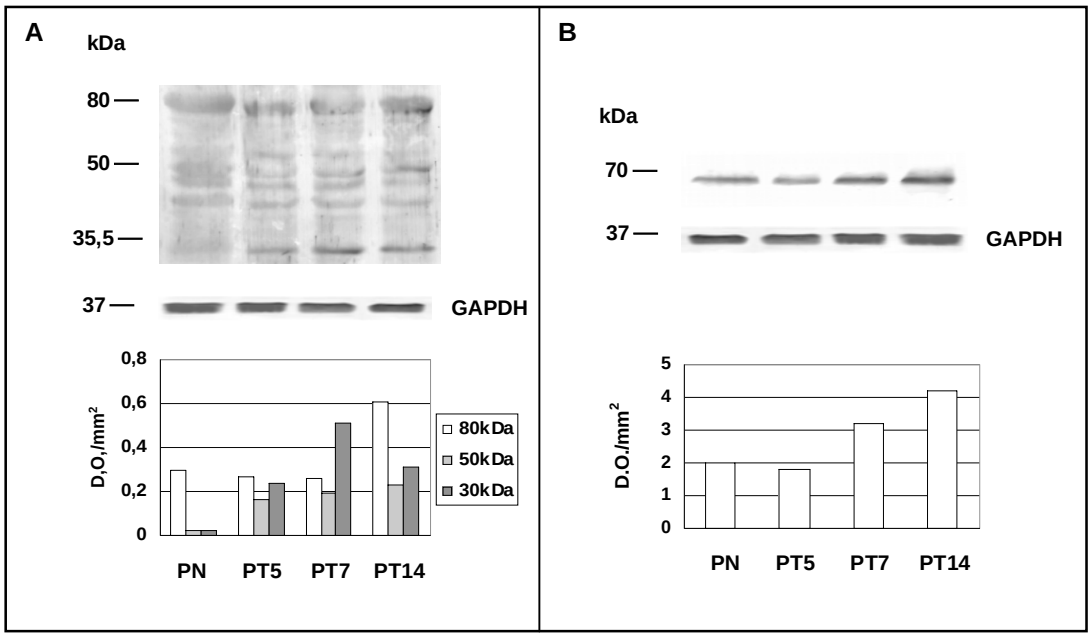

Figura 43: A) Western blot para detectar la expresión de VEGF-C y B) LYVE-1 en piel de portadores del tumor LMM3 de 5, 7 y 14 días (PT5, PT7 y PT14). El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes. PN: piel normal.

6. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN LA LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

Teniendo en cuenta que las células LMM3 son linfoangiogénicas se investigó si los MfsT son capaces de modular también este proceso. Por Wb se estudió la expresión de las proteínas VEGF-C y LYVE-1 en muestras de piel de animales inoculados con células LMM3:MfsT ($2x10^5$:$2x10^3$). Se observó un aumento significativo con respecto al control en la expresión de VEGF-C a 80 kDa cuando se inocularon las células tumorales con MfsT14, como indican los valores de D.O./mm^2 (LMM3+MfsT14:2,5±0,3; LMM3+MfsN:1,5±0,3; n=3) (Fig. 44 A).

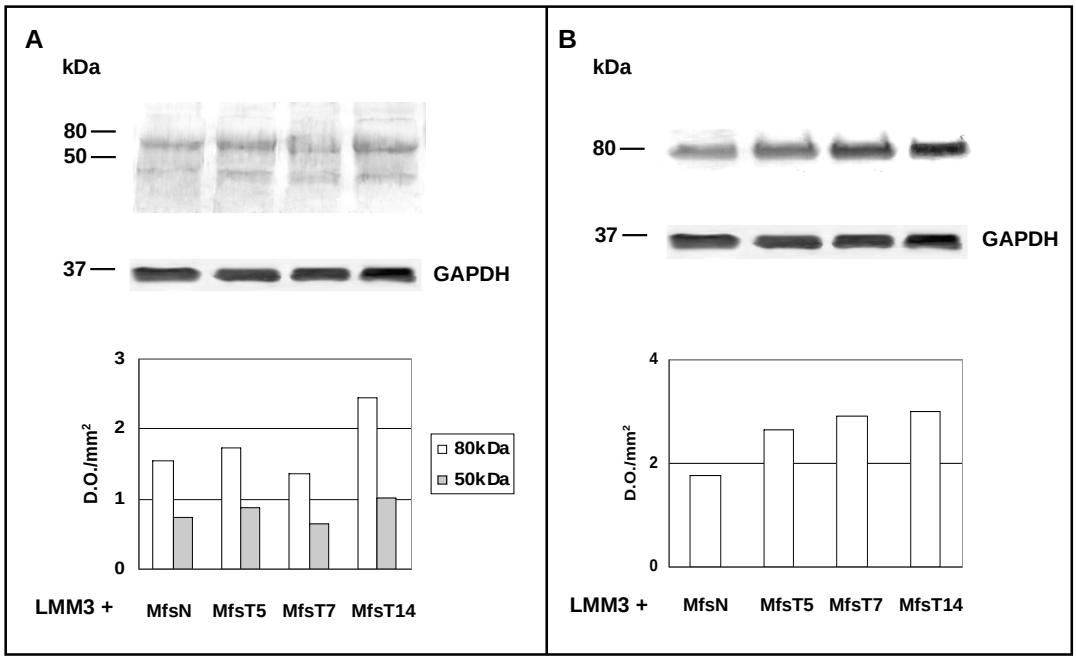

Figura 44: A) Western blot para detectar la expresión de VEGF-C y B) LYVE-1 en piel de animales inoculados con células LMM3 con MfsN, MfsT5, MfsT7 o MfsT14. El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

La expresión de la proteína LYVE-1 se incrementó significativamente (aproximadamente 60%) siempre que se inocularon células LMM3 con MfsT provenientes de cualquier estadío de portación del tumor (Fig. 44 B).

7. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DEL TUMOR LMM3 SON LINFOANGIOGÉNICOS *PER SE*

Los Mfs provenientes de portadores del tumor LMM3, modulan la linfoangiogénesis de las células tumorales, efecto que no producen los MfsN. Al inocular MfsT5 observamos un aumento significativo en la expresión de VEGF-C a 50 kDa con respecto al control (MfsT5: 0,95±0,15; MfsN: 0,45±0,10; n=3) como indican los valores de D.O./mm^2 (Fig. 45 A). En cuanto a la expresión de LYVE-1, se observa un aumento cuando se inoculan MfsT, cualquiera sea el estadío de portación del tumor (Fig. 45 B).

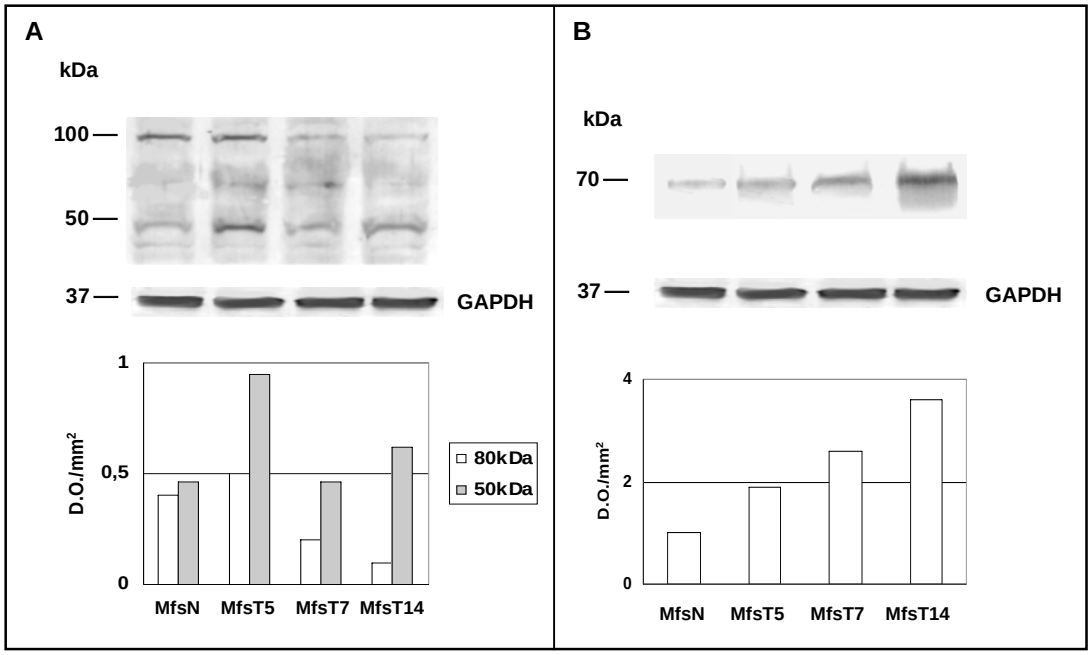

Figura 45: A) Western blot para detectar la expresión de VEGF-C y B) LYVE-1 en piel de animales inoculados con MfsN, MfsT5, MfsT7 o MfsT14. El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

Teniendo en cuenta que la estimulación muscarínica de los MfsT potencia la angiogénesis inducida por estas células, investigamos si la activación de los RM regula la linfoangiogénesis. El tratamiento previo de los Mfs con CARB 10^{-7} M indujo un aumento significativo del 100% con respecto al control, en la expresión de VEGF-C de la piel inoculada con MfsT7, efecto que se revirtió por el tratamiento previo de las células con atropina 10^{-6} M (Fig. 46 A). Mientras que la expresión de LYVE-1 no se modificó por el agregado de CARB en ninguna de las poblaciones estudiadas (Fig. 46 B).

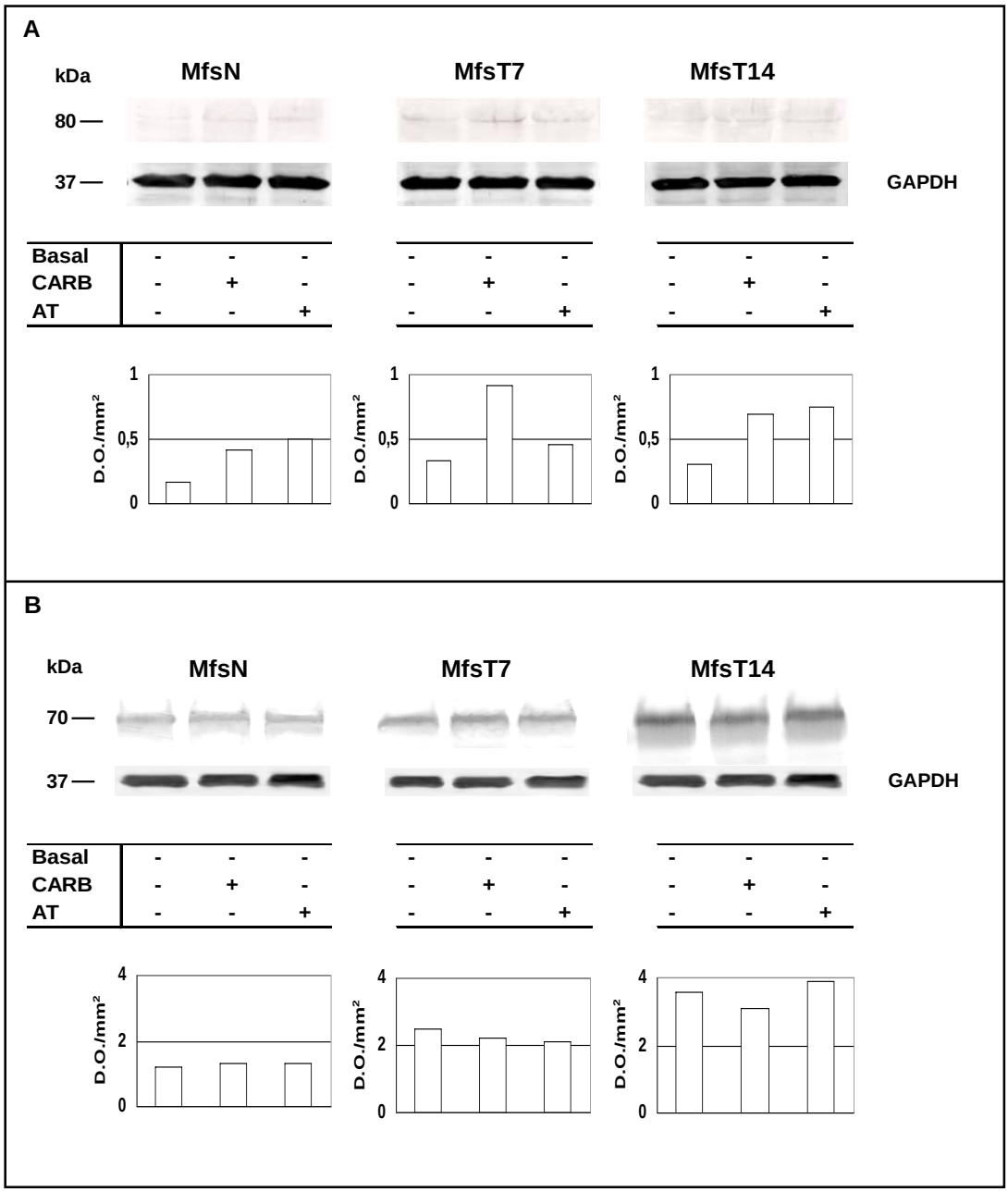

Figura 46: A) Western blot para detectar la expresión de VEGF-C y B) LYVE-1 en la piel de animales inoculados con MfsN, MfsT5, MfsT7 o MfsT14 tratados con carbacol (CARB) 10^{-7} M en ausencia o en presencia de atropina (AT) 10^{-6} M. El peso molecular de las proteínas está indicado a la izquierda. La expresión de GAPDH se usó como control de carga constante en cada calle. Análisis densitométrico de las bandas expresado en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm^2) (Panel inferior). Se muestra un ensayo representativo de tres semejantes.

DISCUSIÓN

1. ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

La angiogénesis se ha convertido en un área de gran importancia en la investigación científica debido a que está involucrada en varios procesos fisiológicos y patológicos. La neovascularización es uno de los pasos determinantes para regular el crecimiento neoplásico y puede producirse en distintos estadíos de la progresión tumoral. Los vasos tumorales son estructuralmente distintos de los vasos normales; su aspecto es irregular dilatado y tortuoso y algunos presentan extremos ciegos. Este incremento en la densidad de vasos, que se produce durante el "estallido" angiogénico tendría la finalidad de aportar al tumor oxígeno y nutrientes para facilitar su progresión, proveer factores de crecimiento en forma parácrina y permitir el escape de células que generarían metástasis (Bergers G y Benjamin LE, 2003). También se ha documentado que el inicio del proceso angiogénico es un marcador que indica la transición de un tumor incipiente o "dormido" a uno maligno en progresión. Estos antecedentes no sólo se observaron en tumores sólidos sino también en enfermedades linfoproliferativas como leucemias y linfomas (Griffoen AW y Molema G, 2000).

Nuestros resultados demostraron que células LMM3, derivadas de un adenocarcinoma mamario murino metastásico espontáneo, producen una fuerte respuesta angiogénica in vivo; esta respuesta es más potente que la que inducen células de la línea no metastásica LM3 de la cual deriva el

tumor estudiado. En relación con esto, Bergers G y Benjamín LE (2003) postularon que la activación de metástasis “dormidas” es una etapa en la progresión tumoral, que requiere también de la neovascularización y por lo tanto es factible que la capacidad de inducir una respuesta angiogénica potente que presentan las células LMM3 está en estrecha relación con el potencial invasivo y metastásico de este tumor.

Además observamos un incremento en la expresión de VEGF-A en la piel que rodea al sitio de inoculación con células LMM3, conjuntamente con el aumento de la densidad vascular. En forma análoga, se observó que el incremento en la producción de este factor, está asociado con la densidad microvascular en un tumor prostático de rata en forma previa al establecimiento de metástasis (Haggstrom S y col., 2000) También se demostró, que las características de la red vascular que se forma en los tumores, hemorrágica y muy permeable, se deben precisamente al aumento en la producción de VEGF. La presencia de este factor parece estar vinculada a la metástasis del tumor primario, volviéndose un marcador sistémico en esta enfermedad. Duque JL y col. (1999) demostraron que pacientes con carcinoma prostático metastásico tienen en el suero mayores concentraciones de VEGF que aquellos con enfermedad localizada o voluntarios sanos.

Cabe aclarar que si bien la respuesta angiogénica producida por el tumor LMM3 se evidencia luego de 5 días de inoculación del mismo en

forma intradérmica, si la inoculación se hace en forma subcutánea se retarda la visualización de la respuesta en la cara interna de la piel, hasta 7 días después de la inoculación por razones metodológicas (Davel L y col., 2004).

Por otra parte evidenciamos, que el efecto angiogénico producido por las células LMM3 depende del NO, producto de la metabolización de arginina por la NOS, en particular por las isoformas 2 y 3 de dicha enzima. Previamente se asoció el establecimiento de tumores malignos con el incremento de la expresión de NOS2 y la subsiguiente producción de altos niveles de NO en los tejidos transformados. Este aumento en la expresión de la isoforma inducible se vinculó con el establecimiento de tumores altamente invasivos (Wink DA y col., 1998).

A finales de los ´90, se demostraron otros efectos que produce el NO a bajas concentraciones durante la tumorigénesis. Lala PK y Orucevic A (1998) evidenciaron que la producción escasa de NO, proveniente de isoformas calcio dependientes, promueve la migración de células tumorales y la proliferación de células endoteliales en el microambiente tumoral. Estas últimas son necesarias para la formación de vasos en el tumor en crecimiento y por lo tanto, en nuestro modelo, la producción de NO derivado de NOS3 tendría un importante papel en el proceso angiogénico generado por las células LMM3.

El metabolismo de la arginina ha adquirido gran importancia en la biología celular. Dicho aminoácido, además de ser sustrato de las distintas isoformas de NOS, también es metabolizado por la arginasa, que produce urea y ornitina. Ambas enzimas pueden expresarse simultáneamente en varios tipos celulares y se ha documentado que la formación de ornitina via arginasa es necesaria para la síntesis de poliaminas imprescindibles para la duplicación del ADN que se produce durante la proliferación celular (Bruch-Gerharz D y col., 2003; Li H y col., 2002). La participación de poliaminas producidas por arginasas en el proceso angiogénico ha sido demostrada también durante la neovascularización placentaria en la gestación, en la cicatrización de heridas y en modelos patológicos como el cáncer parece ser muy necesaria para la duplicación de células endoteliales sanguíneas (Wu G y col, 2005; Heffernan D y col., 2006; Jasnis MA y col., 1994).

Hemos demostrado que la isoforma II de arginasa se expresa constitutivamente en las células LMM3 y sus productos participan del proceso angiogénico inducido por estas células; queda por determinar en forma directa si las poliaminas producidas por las células tumorales son también utilizadas para la proliferación de células endoteliales que participan en la formación de vasos tumorales.

Otros grupos han documentado que la COX-2 se sobre-expresa en varios tipos de tumores como los de mama, piel y estómago, evidenciando que la PGE_2 derivada de COX-2 contribuye a la progresión tumoral, ya que

induce la formación de nuevos vasos sanguíneos que permiten el crecimiento del tumor y por otra parte ejerce efectos mitogénicos incrementando la proliferación celular (Subbaramaiah K y col., 1996; Higashi Y y col., 2000; Uefuji K y col., 2000). Concordantemente, observamos que las células LMM3 expresan COX-2 y que la PGE_2 derivada de esta isoforma participa en el efecto angiogénico producido por las células tumorales. Sin embargo, cabe resaltar que el hecho que la indometacina sea más potente que el NS-398 para reducir tanto la producción de PGE_2 como la respuesta neovascular, indicaría que la PGE_2 derivada de COX-1, que también se expresa en el tumor estudiado, contribuye de manera sustancial al proceso de neovascularización tumoral. Precisamente en nuestro laboratorio se documentó por primera vez, que la administración de indometacina en el agua de bebida a animales portadores, reducía el crecimiento ortotópico de un tumor de mama murino (Davel L y col., 1985).

2. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR MODULAN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3

Las señales que desencadenan la cascada angiogénica pueden provenir tanto de las células tumorales como de las células inmunes (linfocitos y Mfs) que circundan o infiltran el tumor y que son atraídas por citoquinas y quemoquinas producidas por las células tumorales. Estas señales son: la liberación de factores de crecimiento, proteasas o productos de lisis de la MEC que actúan como factores angiogénicos (Hanahan D y Folkman J, 1996).

La primera descripción del papel de leucocitos en tumores humanos fue propuesta por Virchow en 1864, sugiriendo que la presencia de productos de células organizadas en “focos” denotaba un proceso inflamatorio crónico capaz de iniciar la carcinogénesis.

En la actualidad, se sabe que los Mfs constituyen el principal componente del infiltrado leucocitario en los tumores y sus funciones como moduladores del crecimiento tumoral comenzaron a investigarse a principios de los ´90 (Mantovani A y col., 1992; Van Ravenswaay Claasen y col., 1992). El origen de los Mfs infiltrantes del tumor se ha discutido extensamente. Las evidencias apoyan tanto el reclutamiento de los mismos del grupo circulante, como la proliferación de la población local por estímulo de antígenos del tumor (McBride WH, 1986, de la Torre y col., 2007).

Teniendo en cuenta que las células LMM3 derivan de un adenocarcinoma mamario murino, escasamente infiltrado, se estudió el comportamiento de los Mfs peritoneales provenientes de hospedadores murinos del tumor LMM3 con 5, 7 y 14 días de portación, de manera tal de conocer el comportamiento de los mismos en estadíos precoces y avanzados de la tumorigénesis. Demostramos que sólo los MfsT7 son capaces de modular positivamente la respuesta angiogénica inducida por las células LMM3, en comparación con los Mfs provenientes de animales normales utilizados como control. Es importante considerar que el tumor LMM3 es palpable precisamente 7 días después de su inoculación y este estadio parece comparable a un tumor, que por su tamaño (1-2 mm^3) debería realizar el “estallido” angiogénico para continuar desarrollándose, tal como se ha observado en distintas especies (Carmeliet P y Jain RK, 2000). Probablemente los MfsT7 se encuentren en un estado de activación que les permite liberar y aportar factores pro-angiogénicos que favorecen la tumorigénesis.

En nuestros resultados se observa que el agregado de MfsT7 potencia simultáneamente la formación de microvasos y la expresión de CD31 y VEGF-A, indicando que estos Mfs peritoneales “activados” por la presencia del tumor, colaboran regulando positivamente el crecimiento del mismo. Bolat F y col. (2006) demostraron un efecto análogo producido por los MAT en pacientes con carcinoma ductal infiltrativo de mama. La

presencia de los MAT se correlaciona con la densidad de microvasos, el tamaño tumoral y la detección de metástasis en ganglios linfáticos.

Cabe destacar que sólo cuando se co-inoculan MfsT7 con células LMM3 en una relación 1:100 se observa esta potenciación significativa de la neovascularización tumoral. Precisamente Akedo y col. (1989) han descripto que los Mfs en un portador de tumor, ejercen efectos pro-tumorales cuando la relación Mfs:célula tumoral no supera el valor 1:10 favoreciendo la progresión y metástasis, debido a la producción de metabolitos oxidativos. Mientras que si la proporción de Mfs aumenta, se evidencian sus efectos citotóxicos contra las células tumorales tanto in vivo como in vitro.

Los Mfs metabolizan la L-arginina a NO y citrulina por acción de las isoformas de NOS aunque también pueden producir urea y ornitina por la activación de arginasas. Existen evidencias contradictorias acerca del papel crucial de los metabolitos de la arginina, pues se ha documentado que pueden promover o inhibir diversas etapas de la tumorigénesis. Algunos autores demuestran que los productos reactivos del nitrógeno formados a partir de la L-arginina tienen un rol importante en la destrucción de células tumorales por los Mfs activados (Keller R y col., 1990). En nuestro modelo el efecto estimulante de los MfsT7 sobre la angiogénesis producida por las células LMM3, fue reducido por aminoguanidina, un inhibidor selectivo de iNOS y por L-NAME, un inhibidor no selectivo de NOS, indicando que tanto

el NO derivado de NOS2 como de NOS1, ambas isoformas expresadas en estas células, participarían del efecto observado.

La síntesis de poliaminas a partir de ornitina producida por la arginasa II es esencial para la proliferación de células de mamíferos (Jenkinson CP y col., 1996; Singh R y col., 2000; Blachier F y col., 1995). Teniendo en cuenta que el metabolismo de la arginina puede ser derivado hacia la síntesis de precursores de poliaminas por las arginasas en células tumorales humanas, estudiamos la participación de los productos de dicha enzima expresada en los MfsT7 durante la respuesta neovascular inducida por las células LMM3. La participación de los productos de arginasa parece ser mayor que la de los productos de NOS pues la inhibición de la primera reduce la respuesta angiogénica en mayor medida que la inhibición de la segunda. Precisamente en los MfsT7 la actividad y la expresión de iNOS y nNOS se regulan negativamente, produciendo menores concentraciones de NO. Además la regulación positiva de la actividad de arginasas, que provee mayores concentraciones de precursores de poliaminas, disminuye la capacidad citotóxica de los mismos contra el tumor y aumenta su potencial como “colaboradores” del crecimiento tumoral.

En 1984 Polverini PJ y Leibovich SI, demostraron que los Mfs asociados al tumor aislados de un fibrosarcoma de rata inducido con 3-metilcolantreno fueron potentes estimuladores de la neovascularización *in vivo* e indujeron la proliferación de células endoteliales bovinas. Nuestros

resultados indican que los MfsT7, aislados del peritoneo de portadores de un adenocarcinoma mamario espontáneo, como el LMM3, presentan un comportamiento análogo.

Mantovani A y col. (2002) han descripto que los Mfs pueden polarizarse hacia un fenotipo M1 o M2 (tipo I o tipo II) según hayan sido activados por exposición a INF-γ o IL-4, respectivamente. Los Mfs M1 son potentes efectores que destruyen microorganismos y células tumorales, produciendo grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias. En cambio los M2, modulan la inflamación, favorecen el crecimiento tumoral, promueven la remodelación de la MEC y la reparación de heridas. Específicamente se ha mencionado que los MAT, corresponden a un fenotipo M2 con alta expresión y actividad de arginasa y baja expresión y actividad de iNOS. De igual forma los MfsT7 obtenidos del peritoneo de portadores de tumor, perecen representar un conjunto de este tipo de células polarizadas hacia el mismo fenotipo M2.

Numerosas evidencias sugieren que las PGs juegan un papel central en la patogénesis del cáncer. Es sabido que las mismas pueden afectar la proliferación, la mitosis, la adhesión, la apoptosis y la inmunovigilancia, en el transcurso de esta enfermedad. Especialmente se detectaron altas concentraciones de PGE_2 en cáncer de mama, colon, pulmón, páncreas y cabeza y cuello en humanos, en comparación con el tejido normal que circunda el tumor (Mazhar D y col., 2005**;** Wang D y

DuBois RN, 2006). Si bien existe consenso acerca de que un aumento en la expresión y función de COX-2 en diversos tumores está relacionada con la malignidad, demostramos que al menos en los Mfs de portadores de tumor se sobre-expresan tanto COX-2 como COX-1 al compararlos con MfsN y las PGs derivadas de ambas isoformas participan en la estimulación que inducen los MfsT7 sobre la angiogénesis del tumor LMM3 (Davel L y col., 2004).

También observamos que los MfsT7 además de potenciar la densidad de microvasos tumorales neoformados que expresan CD31, son capaces de incrementar la expresión de VEGF-A en el sitio angiogénico. Ha sido documentado que el aumento en la expresión de COX-2 está estrechamente relacionado con un aumento en la densidad de microvasos y con la secreción de VEGF en tumores. Más aún, en células tumorales de origen renal el aumento de COX-2 se vincula con la disminución en la expresión intra-citoplasmática de VEGF, lo que indicaría un aumento en la liberación de dicho factor (Hemmerlein B y col., 2004). En este trabajo se demuestra un mecanismo análogo potenciado por los MfsT7 de portadores del tumor LMM3.

3. LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DE TUMOR SON ANGIOGÉNICOS *PER SE*

Puesto que los MfsT7 fueron capaces de aumentar la respuesta angiogénica del tumor LMM3, se investigó la capacidad de los MfsT para inducir angiogénesis en ausencia de células tumorales. Se observó que los MfsT7 y los MfsT14 son tan potentes para inducir una respuesta angiogénica positiva, como las células LMM3 cuando se inoculan en concentraciones semejantes. Dicho efecto no es producido por los MfsT5 probablemente porque en ese estadio no se han polarizado todavía hacia un fenotipo que favorezca el crecimiento del tumor. En este sentido, existen evidencias indirectas de que los Mfs responden a diversos estímulos como factores de crecimiento, baja concentración de oxígeno o antígenos tumorales solubles adquiriendo la capacidad de inducir angiogénesis *per se* (McBride WH, 1986; Ohno S y col., 2003).

A pesar que los MfsT14 producen una mayor respuesta neovascular, lo que concuerda con un incremento en la expresión de CD31, dichas células presentan menores niveles de VEGF-A. Probablemente, el efecto estimulante de la angiogénesis se deba a la presencia de otros factores, tal vez de la familia del VEGF que la potencien. Por ejemplo, se ha descripto que la aplicación ectópica de VEGF-C recombinante ejerce un efecto angiogénico potente en la cornea murina in vivo. (Cao Y y col., 1998).

La expresión y función de isoformas NOS en Mfs provenientes de distintas especies han sido extensamente discutidas (Hortelano S y col., 1993; Tenu JP y col., 1999). Muchos autores han relacionado la expresión de NOS2 en Mfs con la capacidad de los mismos de ejercer funciones efectoras citotóxicas en presencia de estímulos como LPS y/o citoquinas.

Por otro parte, aunque la isoforma I de arginasa es característica del citosol hepático, mientras que la II tiene localización ubicua, Gotoh T y col. (1996), demostraron que ambas isoformas de arginasa se expresan simultáneamente en Mfs murinos de la línea RAW-267.7. La respuesta angiogénica inducida por los MfsT7 y los MfsT14 depende de los productos derivados del metabolismo de la arginina por estas enzimas.

Se ha descripto que las enzimas NOS y arginasas, que utilizan la arginina como sustrato, se co-expresan en Mfs murinos, lo que resulta en una compleja interacción en la cual la concentración de sustrato puede evidenciar un “cross talk” entre ambas enzimas (Wu G y Morris SM, 1998). La expresión de las isoformas de NOS es mayor en los MfsN que en los MfsT y observamos que la inhibición de la actividad de arginasa en estos Mfs produce un aumento en la concentración de NO liberado y viceversa el bloqueo de NOS incrementa la producción de urea. Al disminuir la expresión de iNOS y nNOS en los MfsT, la arginina es metabolizada mayoritariamente por las arginasas, como se describe para los Mfs de fenotipo M2 (Mantovani A y col., 2002). Nuestros resultados demuestran que en los MfsT7, que

promueven la angiogénesis, la expresión de la isoforma I de arginasa experimenta un aumento mayor que la expresión de la isoforma II al compararlas con la expresión de ambas enzimas en los MfsN. Chang CI y col. (2001) demostraron que Mfs murinos de la línea J774A.1 transfectados con el gen de la arginasa I tienen incrementada la liberación de poliaminas que promoverían el crecimiento tumoral y disminuida la producción de NO reduciendo la actividad citotóxica antitumoral.

El microambiente tumoral es rico en citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento y quemoquinas, pero generalmente pobre en citoquinas asociadas con una respuesta inmune antitumoral. Actualmente es aceptado que los MAT producen mediadores solubles que contribuyen a la progresión tumoral. Hemos demostrado que los MfsT producen mayores niveles basales de PGE_2 que los MfsN. Cuando analizamos la expresión de COX-1 y COX-2 observamos un aumento significativo en la expresión de ambas isoformas en los MfsT7. Además, la inhibición de COX disminuye la liberación de urea en todas las poblaciones de Mfs, mientras que el efecto de los productos de arginasa sobre la actividad de COX se pierde a medida que aumentan los días de portación del tumor. Varios autores han evidenciado que las PGs estimulan la actividad de arginasa (Corraliza IM y col., 1995; Rodríguez PC y col., 2005). Rodríguez PC y col. (2005) proponen que la PGE_2 derivada de COX-2 expresada en el tumor de pulmón murino 3LL induce la expresión de arginasa I en células supresoras mieloides que lo infiltran, lo que lleva a una depleción de arginina en el

microambiente tumoral generando fallas en la proliferación y función efectora de las células T.

Nuestros resultados evidencian por primera vez una regulación positiva de los productos de la arginasa sobre la síntesis de PGE_2 derivada de COX en los MfsT7, lo que indicaría una interacción entre ambas enzimas. Es posible que la liberación de PGE_2 por los MfsT sea una de las variables que determinan su función como células con fenotipo M2, que además de favorecer la angiogénesis tumoral vía productos de arginasa, carecen de capacidad como presentadoras de antígenos tumorales y permiten el escape de las células tumorales de la “vigilancia” que ejerce el sistema inmune.

La regulación positiva que el NO derivado de NOS2 ejerce sobre la COX, generalmente sobre la isoforma inducible, fue estudiada en profundidad por Salvemini D y col. (1993). Sin embargo el o los modelos para evidenciar esta interacción se centraron siempre en células, tejidos u organismos sometidos a condiciones inflamatorias de diverso origen. Es importante tener en cuenta que el perfil de los MfsT7 coincide con un fenotipo opuesto al pro-inflamatorio que es el M2 propuesto por Mantovani A y col. (2002) para los MAT, pues estas células disminuyen la expresión y actividad de iNOS. Esta disminución parece favorecer el aumento en la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE_2 que otros autores también han documentado como moduladores positivos de la síntesis y liberación de

VEGF-A en un modelo de tumor mamario murino inducido por virus (Wang D y DuBois RN, 2004).

4. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR MACRÓFAGOS

Existen evidencias que las funciones y el número de los linfocitos, granulocitos, Mfs y células NK están bajo la regulación del sistema nervioso autónomo. Las células inmunes expresan receptores para catecolaminas como los beta adrenérgicos y para opiodes endógenos como las endorfinas y encefalinas (Rinner I y Schauenstein K, 1993; Straub RH y col., 1998).

Hemos demostrado que las células LMM3, utilizadas en el modelo experimental de esta tesis, expresan RM en mayor proporción que las células genéticamente relacionadas con éstas pero no metastásicas, denominadas LM3. La activación de estos receptores con el agonista CARB promovió la proliferación celular in vitro y la angiogénesis in vivo (Español A y Sales ME, 2004).

En los últimos años se ha detectado la expresión de receptores colinérgicos en células que no tienen origen nervioso (Eglen RM, 2006). Por ejemplo, los receptores del subtipo M_1 y probablemente también los M_3, han sido detectados en el epitelio aéreo humano así como en la paredes alveolares del sistema respiratorio (Roffel F y col., 2001; Wessler I y Kirkpatrick CH, 2001). Los subtipos M_1, M_2 y M_3 fueron encontrados en fibloblastos humanos y su activación gatilla una respuesta proliferativa que

permitiría a estas células participar en los procesos de remodelado durante la inflamación en el pulmón (Matthiesen S y col., 2006). Los ARNm de los subtipos M_1–M_4, con predominancia del M_2, fueron encontrados en el epitelio urinario humano (Tyagi S y col., 2006). Los subtipos M_2, M_4 y M_5 están expresados en el epitelio de la córnea humana y en el endotelio vascular (Grueb M y col., 2006).

En los vasos sanguíneos humanos, se observa que la expresión de distintos subtipos de RM en células endoteliales difiere según la localización anatómica del vaso en cuestión. Así el subtipo M_1 se expresa en el endotelio vascular pulmonar, los subtipos M_2 y M_5 en el endotelio microvascular cerebral y el M_3 en células musculares lisas y endoletiales (Elhusseiny A y col., 1999; Walch L y col., 2001).

Sobre la base de estos antecedentes se ha definido recientemente la existencia del denominado SCnN y se considera que el mismo está formado por receptores nicotínicos y muscarínicos para Ac, las enzimas que sintetizan y degradan este neurotransmisor y la propia Ac.

Además el SCnN parece no sólo expresarse en células normales sino también en células transformadas de diversas estirpes, que son capaces de sintetizar y secretar Ac y también expresar receptores colinérgicos tal como ha sido demostrado por diversos grupos incluido el nuestro (Song P y col., 2003; Cunningham JM y col., 1985, Schuller HM y Orloff M, 1998; Williams

CL y Lennon VA, 1990; Español AJ y col., 2002) En este sentido hemos evidenciado exhaustivamente la sobre-expresión de RM en tres líneas celulares distintas derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos y documentamos que su activación promueve la tumorigénesis al potenciar la proliferación in vitro y el crecimiento tumoral in vivo (Rimmaudo LE y col., 2005; Español AJ y col., 2007)

Hemos observado que tanto los MfsN como los MfsT expresan distintos subtipos de RM funcionales. En forma concordante, Kawashima K y col. (2007) reportaron que células inmunes como linfocitos T y B, células dendríticas y Mfs, expresan ARNm que codifican para los 5 subtipos de RM. La activación de los mismos regula funciones como la presentación antigénica entre los linfocitos T y las células dendríticas o Mfs, modulando la inmunidad celular. Nuestros resultados muestran que la activación de los RM por el agonista colinérgico CARB estimula la respuesta angiogénica sólo en los MfsT7. El hecho de que los MfsT7 respondan al agonista potenciando la angiogénesis tumoral, mientras que los MfsT14 no lo hacen, podría estar relacionado con un cambio en la expresión de las subpoblaciones de RM o una falla en el acoplamiento a las enzimas efectoras. Cabe aclarar que en nuestro modelo, el tumor del portador de 14 días (0,2-0,3 gramos) por su tamaño, se encuentra en un estadío muy avanzado, en el que probablemente no requiera de la colaboración de los Mfs para promover la angiogénesis y como consecuencia la progresión tumoral.

El efecto pro-angiogénico producido por el CARB sobre los MfsT7 se debe a la activación de más de un subtipo de RM. De igual manera, nosotros demostramos que el efecto angiogénico de las células LMM3 se incrementa por el agregado del agonista que activa los receptores M_1, M_2 y M_3 expresados en dichas células (Rimmaudo LE y col., 2005). En un modelo fisiológico se ha documentado que la activación simultánea de los subtipos M_1 y M_3 por CARB, induce la dispersión del pigmento granular en el epitelio de la retina piscívora, como un mecanismo de adaptación a la luz brillante (González A y col., 2004).

Por otra parte, evidenciamos que las enzimas arginasa y COX son efectoras de los RM. La estimulación de arginasa parece estar mediada por la activación de los subtipos M_1 y M_2. En nuestro laboratorio describimos que en glándulas salivales estimuladas con lipopolisacárido bacteriano de E. coli, el CARB estimula la secreción de amilasa al activar los receptores M_2 y M_3, cuya enzima efectora es la COX (Español A y col., 2003).

Aún cuando la inhibición de NOS reduce parcialmente el efecto estimulante del CARB sobre la neovascularización inducida por los MfsT7, el agonista no fue capaz de estimular la actividad de la enzima incrementando la producción de NO. Esto indicaría que la participación del NO en la angiogénesis inducida por los MfsT7 es independiente de la activación muscarínica directa sobre la NOS.

También demostramos que los MfsT7 pueden potenciar la angiogénesis por medio de la estimulación colinérgica de los receptores M_3 que induce la liberación de PGE_2. Esta citoquina pro-inflamatoria y vasodilatadora es responsable, al menos parcialmente, de la inmunosupresión que se produce durante la tumorigénesis y que favorece el escape tumoral (Kim R y col., 2006).

Shodi A y col. (2000) indicaron que la activación de receptores acoplados a proteína G codificados por el herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi, puede incrementar la expresión de VEGF y promover una respuesta angiogénica que caracteriza a las lesiones de dicha enfermedad. Nosotros observamos que la estimulación de los MfsT7 con CARB aumentó la expresión de VEGF-A por activación de los receptores M_1 y M_2, que promueven el metabolismo de arginina por la arginasa. Es probable que las poliaminas formadas por la arginasa sean utilizadas por los Mfs para proliferar y como consecuencia de esto aumente el número de células capaces de liberar VEGF-A (de la Torre y col., 2007).

Nosotros observamos que los MfsT7 tienen aumentada la expresión de COX y VEGF-A. Algunos autores han reportado que la expresión de COX-1 y COX-2 y su producto la PGE_2 son promotoras de la angiogénesis porque estimulan la síntesis de varios factores, incluyendo el VEGF-A (Davel L y col., 2004; Joo YE y col., 2003). COX-2 y VEGF no sólo se expresan en células tumorales sino también en células del entorno tumoral como las

endoteliales, los fibroblastos y los Mfs, siendo potenciales blancos terapéuticos contra el tumor (Hemmerlein B y col., 2004).

5. LINFOANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LMM3. PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DEL TUMOR

El descubrimiento de moléculas que promueven el crecimiento de los vasos linfáticos y permiten identificar dichos vasos, es un tema que aún no se ha esclarecido completamente. Esto se debe en gran medida, a la falta de certeza a cerca del origen de las células precursoras del endotelio linfático por carecer de marcadores específicos. Es por esto que el consenso internacional indica que deben estudiarse al menos dos moléculas que favorezcan o indiquen la génesis de vasos linfáticos.

El VEGF-C es producido por diferentes tipos de células (Mfs, células estromales, células tumorales) y tejidos (piel, pulmón) y está involucrado en el desarrollo de la linfoangiogénesis durante la embriogénesis y la vida adulta y puede ser importante en estados patológicos, como la invasión linfática y la metástasis (Stacker SA y col., 2002a). Ochi N y col. (2007) demostraron que células tumorales pancreáticas secretan VEGF-C que estimula la migración de células endoteliales linfáticas y la formación de capilares linfáticos que favorecen la metástasis. Sin embargo a pesar de la relevancia clínica de este problema poco se sabe a cerca de los mecanismos que conducen a la metástasis tanto por vía sanguínea como linfática.

Otro marcador de vasos linfáticos descripto recientemente es el receptor de ácido hialurónico de tipo 1, denominado LYVE-1 que está involucrado en el transporte de hialuronanos por las células endoteliales linfáticas y parece ser más específico que el VEGF-C o –D (Alitalo K y Carmeliet P, 2002)

Hemos demostrado que las células tumorales LMM3 aumentan la expresión de VEGF-C y LYVE-1 en forma gradual con el transcurso de los días de portación del tumor en el sitio de inoculación. Pero mientras que el primero muestra un aumento en las proteínas inmunoreactivas más livianas desde los 5 días, las de mayor peso molecular (80 kDa) se incrementan a los 14 días. En cambio, para el segundo, el aumento en su expresión se observa a los 7 días, es decir posteriormente al “estallido” angiogénico que en nuestro modelo se produce al día 5 de la tumorigénesis. También es importante destacar que el proceso lingoangiogénico, antecede a la detección de metástasis pulmonares en los portadores del tumor LMM3, que se produce aproximadamente al día 14 y por lo tanto tendría valor pronóstico en este tipo de tumores.

Demostramos que la inoculación de Mfs de portadores de tumor potencia la linfoangiogénesis tumoral. Sin embargo los cambios en la expresión de las proteínas marcadoras estudiadas no son simultáneos. Mientras se observa un incremento en la expresión de VEGF-C (80 kDa) sólo cuando se agregaron MfsT14, se produce un incremento temprano en la

expresión de LYVE-1 ocasionado por la combinación del tumor con MfsT5, en la piel de dichos animales. Schoppmann y col. (2002) evidenciaron, utilizando técnicas de hibridización in situ e inmunohistoquímica con microscopía confocal, que los MAT provenientes de pacientes con carcinoma cervical, expresan altos niveles de VEGF-C y su densidad se correlaciona con la proliferación de vasos linfáticos. Además, existen evidencias de que el VEGF-C es un quimioatractante de Mfs in vitro e in vivo, revelando un rol como inmunomodulador para esta citoquina (Skobe M y col., 2001). Es probable que el estudio de este factor por inmunomarcación de la piel, como se realizó en nuestro modelo, carezca de la sensibilidad necesaria para detectar variaciones con Mfs purificados de estadíos más precoces de portación.

Se ha demostrado que el crecimiento de los vasos linfáticos se produce a partir de la división de las células endoteliales linfáticas y/o por la incorporación de células progenitoras endoteliales linfáticas del torrente circulatorio (He Y y col., 2004; Salven P y col., 2003). Maruyama K y col. (2005) agregaron una evidencia que modificó el concepto tradicional de la linfoangiogénesis, pues demostraron por primera vez que lo Mfs se transdiferencian a células endoteliales linfáticas. Inicialmente los Mfs forman agregados que dan origen a vesículas, que se integran en vasos linfáticos en brotación. Además, bajo condiciones de cultivo in vitro apropiadas, los Mfs peritoneales murinos CD11+ forman estructuras similares a un tubo y

expresan algunos marcadores linfáticos específicos, lo que les asignaría tanto un papel colaborador como protagónico en el proceso linfoangiogénico.

Precisamente al estudiar el efecto de los MfsT en ausencia del tumor LMM3, puede observarse que el efecto linfoangiogénico se detecta tempranamente en MfsT5, ya que los mismos aumentan la expresión tanto de VEGF-C como de LYVE-1. Queda por demostrar en forma directa si este aumento en la expresión de las proteínas marcadoras, coincide con la presencia de una red vascular linfática funcional en nuestro modelo.

Por otro lado, también se ha descripto que el VEGF-C puede regular el crecimiento de vasos sanguíneos in vivo en condiciones fisiológicas o patológicas. Algunos autores indican que el mismo puede también estimular la angiogénesis en la cornea murina y en tejidos isquémicos (Cao Y y col., 1998; Witzenbichler B y col., 1998). Los efectos biológicos de VEGF-C sobre la angiogénesis y la linfoangiogénesis dependen en parte de la expresión de subtipos distintos de receptores para este factor; la activación del subtipo 2 promueve la angiogénesis, mientras que la del VEGFR-3 estimula la linfoangiogénesis.

Pero también se menciona que el procesamiento proteolítico in vivo de su precursor por enzimas que derivarían de los MAT modificaría la función del VEGF-C (Stacker SA y col., 2002a). La forma no procesada de VEGF-C se une a VEGFR-3 e induce linfoangiogénesis, mientras que la

forma completamente procesada de VEGF-C se une tanto el VEGFR-2 como al VEGFR-3 estimulando de esta manera la angiogénesis y la linfoangiogénesis, respectivamente (Joukov V y col., 1997).

No existen antecedentes a cerca de la regulación del proceso linfoangiogénico por el SCnN. Nosotros evidenciamos el efecto estimulante que la activación de RM ejerce, sobre la expresión de VEGF-C sólo en MfsT7. Es probable que este efecto del agonista esté más relacionado con un incremento en la capacidad angiogénica de los MfsT7 que con la linfoangiogénesis ya que no observamos aumento en la expresión de LYVE-1 inducida por el CARB en ninguna de las poblaciones estudiadas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dada la importancia que tiene la neovascularización durante la progresión tumoral, Judah Folkman (1975) presentó la hipótesis de que sustancias con actividad anti-angiogénica podrían utilizarse como terapia contra tumores sólidos. Actualmente muchos grupos de trabajo la consideran una terapia válida tanto en oncología como en otras enfermedades relacionadas con procesos angiogénicos (Folkman J, 2007; Kesisis G y col., 2007; Dass CR y col., 2007). El uso de métodos terapéuticos cuyo blanco sea la vasculatura tumoral, específicamente anticuerpos contra VEGF o sus receptores, ha concentrado la atención de muchos grupos de investigación básica y clínica y permitiría superar algunos de los problemas de la terapia convencional contra las células tumorales (Ferrara N y Kerbel RS, 2005).

Otro de los blancos farmacológicos en tumores es la COX-2. Estudios epidemiológicos, básicos y clínicos demuestran que la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroides (AINEs) reducen el riesgo de cáncer colorrectal. Teniendo en cuenta que la expresión de COX-2 y la producción de PGs está aumentada en distintos tipos de tumores, se está analizando intensamente la capacidad de los AINEs tanto para el tratamiento como para la prevención de distintos tipos de enfermedades malignas humanas (Wang D y DuBois RN, 2004).

Un interrogante crucial y aún sin respuesta es la perspectiva de inhibir la linfoangiogénesis para impedir la metástasis de tumores en pacientes con cáncer. La diseminación de tumores a órganos distantes del tumor primario, es un proceso que debe continuar investigándose para poder aplicar este conocimiento al tratamiento de pacientes con neoplasias.

Por último el estudio de la expresión de los distintos componentes del SCnN está siendo abordado exhaustivamente en los últimos años y ha permitido explicar un mecanismo autócrino. de retroalimentación positiva en tumores de pulmón y de mama que expresan RM (Song P., y col. 2006; Español AJ y col., 2007). La activación de estos receptores tanto en el tumor como en células inmunes del portador, promueven el crecimiento de estas neoplasias. La complejidad del mecanismo requiere un grado mayor de evidencia para poder intervenir en el mismo en forma terapéutica.

CONCLUSIONES

- **Los MfsT7 potencian la angiogénesis inducida por las células LMM3 (Fig. 47).**

- **Los MfsT7 son angiogénicos per se.**

- **Los productos de las enzimas arginasa, COX y la producción de VEGF-A están implicados en la respuesta angiogénica que inducen los MfsT.**

- **Los MfsT tienen una menor expresión de la enzima NOS, lo que concuerda con una menor actividad de dicha enzima con respecto a los MfsN. Por otro lado, los MfsT tienen una mayor expresión de las enzimas arginasa y COX, lo que concuerda con una mayor actividad de dichas enzimas con respecto a los MfsN.**

- **La estimulación muscarínica potencia la respuesta angiogénica de los MfsT7. Este efecto está dado principalmente por la activación de los receptores del subtipo M_1 y M_3. Dichos receptores se expresan constitutivamente en los MfsT.**

- **Las enzimas arginasa y COX están implicadas en el efecto angiogénico inducido por el CARB en los MfsT. Esta actividad de arginasa y COX se estimula potentemente por la acción del**

agonista y parecen estar acopladas a los receptores M_1 y M_3, respectivamente.

- **Los MfsT estimulan la linfoangiogénesis de la células tumorales y además, son linfoangiogénicos *per se*. Tanto las células LMM3 como los MfsT aumentaron la expresión de los marcadores linfoangiogénicos. La expresión de LYVE-1 y VEGF-C aumentan en el sitio de inoculación del tumor a partir de los 7 días de portación. La presencia de MfsT5 aumenta la expresión de LYVE-1 en la piel de portadores de tumor LMM3. Sólo la expresión de VEGF-C es estimulada por CARB en MfsT7.**

- **Los MfsN no potencian ni inducen respuesta angiogénica (Fig. 48).**

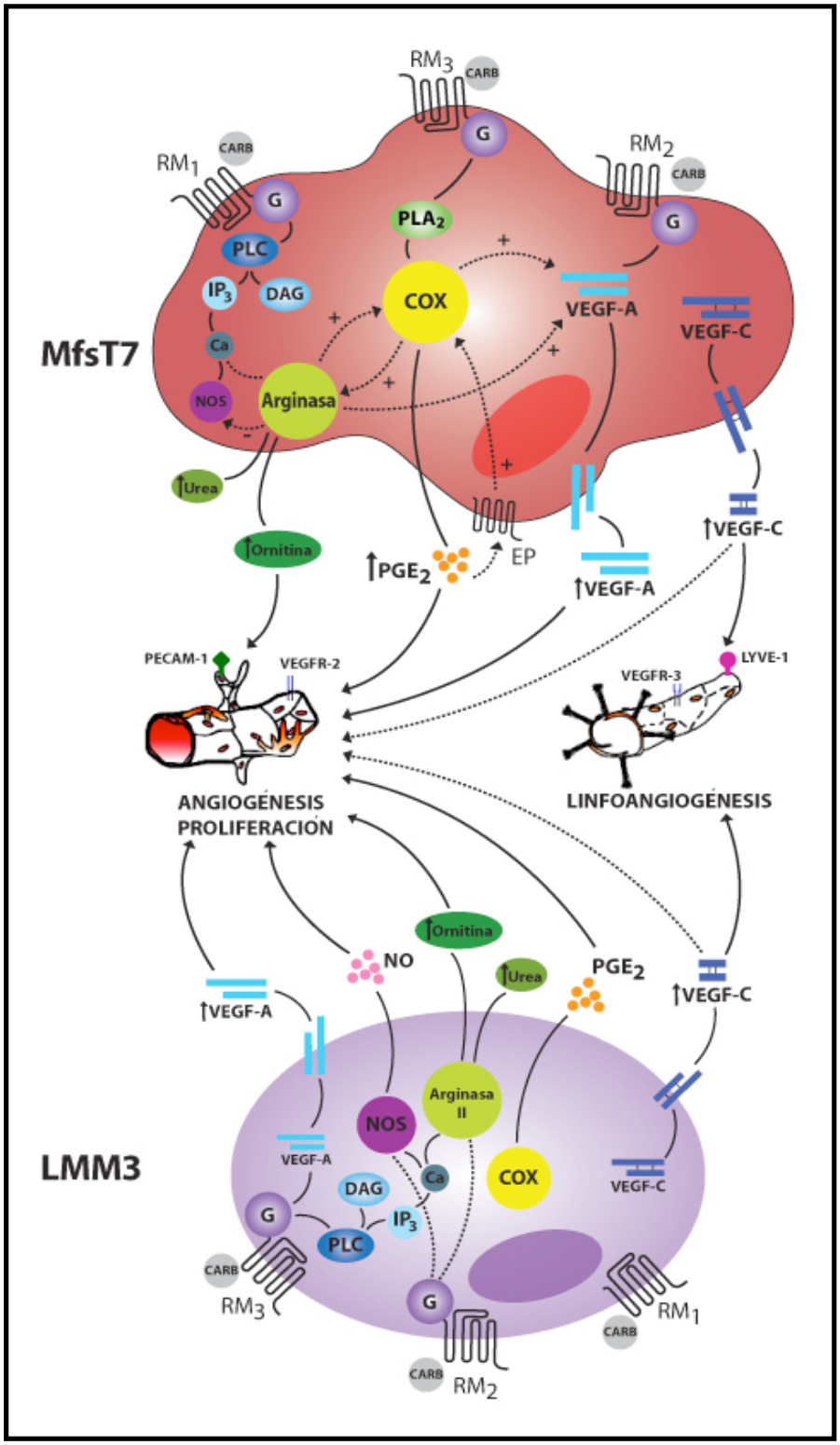

Figura 47: Macrófagos provenientes de animales portadores del tumor LMM3 de 7 días (MfsT7). Receptor muscarínico (RM), proteína G (G), carbacol (CARB), ciclooxigenasa (COX), prostaglandina E_2 (PGE_2), receptor de prostaglandinas (EP), óxido nítrico sintasa (NOS), óxido nítrico (NO), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A_2 (PLA_2), diacilglecerol (DAG), inositol trifosfato (IP_3), calcio (Ca), factor del endotelio vascular (VEGF).

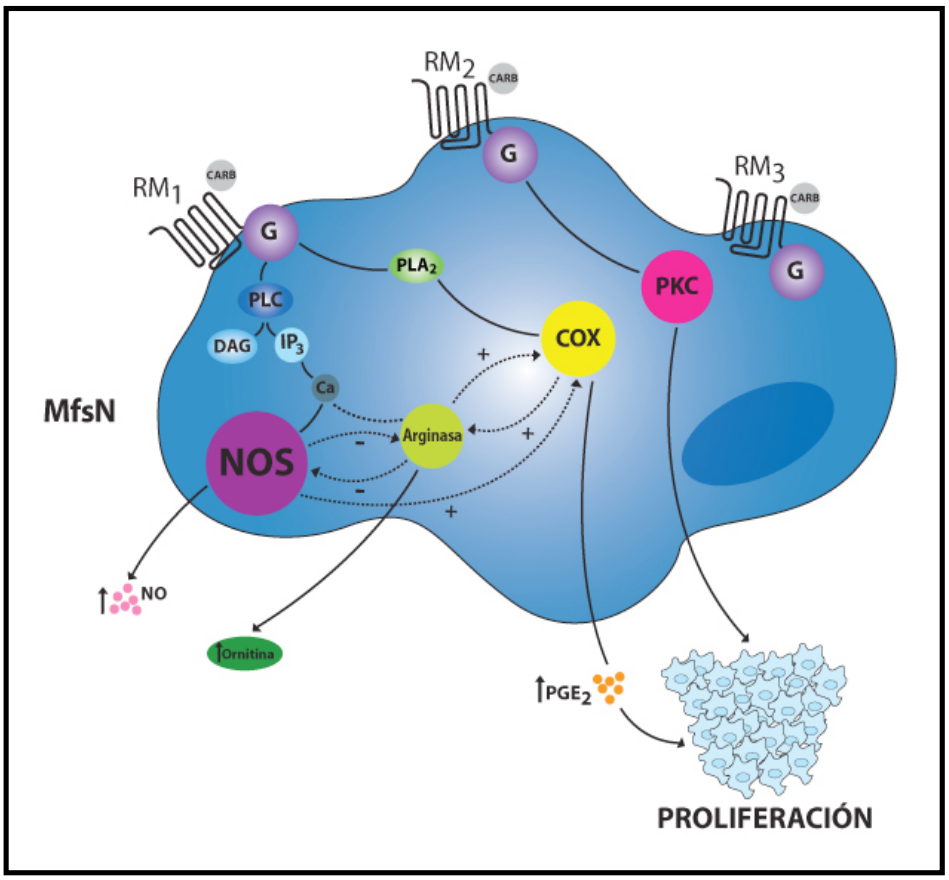

Figura 48: Macrófago proveniente de animal normal (MfsN). Receptor muscarínico (RM), proteína G (G), carbacol (CARB), fosfolipasa A_2 (PLA_2), ciclooxigenasa (COX), prostaglandina E_2 (PGE_2), óxido nítrico sintasa (NOS), óxido nítrico (NO), proteina kinasa C (PKC), fosfolipasa C (PLC), diacilglecerol (DAG), inositol trifosfato (IP_3), calcio (Ca).

BIBLIOGRAFÍA

- **Alitalo K, Carmeliet P.** (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. Cancer cell 1, 219-227.
- **Akedo H, Shinkai K, Mukai M, Komatsu K.** (1989) Potentiation and inhibition of tumor cell invasion by host cells and mediators. Invasion Metastasis 9,134-148.
- **Appenzeller O, Oribe E.** (1997) The autonomic nervous system: an introduction to basic and clinical concepts. 5th ed. Elsevier, New York.
- **Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen DH, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM.** (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 18, 3964–3972.
- **Ash DE.** (2004) Structure and function of arginases. J Nutr 134, 2760-2764.
- **Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A.** (2005) Molecular mechanisms of tumor vascularization. Crit Rev in Oncol Hematol 54, 53-61.
- **Baldwin JM.** (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. Curr Opin Cell Biol 6, 180-190.
- **Bergers G, Benjamin LE.** (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 3, 401-410.
- **Blachier F, Selamnia M, Robert V, M`Rabet-Touil H, Duée PH.** (1995) Metabolism of L-arginine through polyamine and nitric oxide synthase pathways in proliferative or differentiated human colon carcinoma cells. Biochim Biophys Acta 1268, 255-262.

- **Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Yaqmurdur MC, Bal N, Demirhan B.** (2006) Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters. J Exp Clin Cancer Res 25, 365-372.
- **Bonner TI.** (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. Trends Neurosci 12, 148-151.
- **Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.
- **Breyer RM, Bagdessarian CK, Myers SA and Breyer MD.** (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 661-690.
- **Bruch-Gerharz D, Schnorr o, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V.** (2003) Arginase 1 overexpression in psoriasis: Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. Am J Pathol 162, 203-221.
- **Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J.** (2003) Use of M_1-M_5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. Neurochem Res 28, 437-442.
- **Camps M, Carozzi P, Schnabel A, Parker PJ, and Gierschik P.** (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta

gamma-subunits. Nature 360, 684-686.

- **Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K.** (1998) Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci 95,14389-14394.
- **Carmeliet P.** (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6, 389-395.
- **Carmeliet P, Jain RK.** (2000) Angiogenesis in cancer and other disease. Nature 407, 249-257.
- **Carmeliet P**. (2003) Angiogenesis in health and disease. Nat Med 9, 653-660.
- **Caulfield MP, Birdsall NJM.** (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. Pharmacol Rev 50, 279-290.
- **Chang CI, Liao JC, Kuo L.** (2001) Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. Cancer Res 61, 1100-1106.
- **Chen TR.** (1977) In situ detection of micoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp Cell Res 104, 255-262.
- **Chulada PC, Thompsom MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O and Langenbach R.** (2000) Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. Cancer Res 60, 4705-4708.

- **Colasanti M, Suzuki H.** (2000) The dual personality of NO. TIPS 21, 249-252.
- **Condeelis J, Pollard JW**. (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasión, and metastasis. Cell 124, 263-266.
- **Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M.** (1995) Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. Biochem Biophys Res Commun 206, 667-673.
- **Cunningham JM, Lennon VA, Lambert EH, Scheithauer B.** (1985) Acetylcholine receptors in small cell carcinomas. J Neurochem 45 (1), 159–167.
- **Dass CR, Tran TM, Choong PF.** (2007) Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. J Dent Res 86, 927-36.
- **Davel L, D'Agostino A, Español AJ, Jasnis MA, Lauría de Cidre L, Sacerdote de Lustig E and Sales ME.** (2002) Nitric oxide synthase-cyclooxygenase interactions are involved in tumor cell angiogenesis and migration. J Biol Regul Homeost Agents 16, 181-189.
- **Davel L, Miguez MM, de Lustig ES.** (1985) Evidence that indomethacin inhibits lymphocyte-induced angiogenesis. Transplantation 39, 564-565.
- **Davel L, Rimmaudo L, Español AJ, de la Torre E, Jasnis MA, Ribeiro ML, Gotoh T, Sacerdote de Lustig E, Sales ME.** (2004) Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three

adenocarcinoma cell lines. Angiogenesis 7, 45-51.

- **de la Torre E, Genaro AM, Ribeiro ML, Pignataro OP, Sales ME.** (2007) Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. Biochim Biophys Acta. Molecular Basis of Diseases. En Prensa.
- **Djonov V, Baum O, Burri PH.** (2003) Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. Cell Tissue Res 314,107–117.
- **Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR.** (1999) Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. Urology 54, 523-527.
- **Eglen RM.** (2006) Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. Auton Autacoid Pharmacol 26, 219-233.
- **Eglen RM, Nahorski SR.** (2000) The muscarinic M5 receptor: a silent or emerging subtype?. Br J Pharmacol 130, 13-21.
- **Elhusseiny A, Cohen Z, Oliver A, Stanimirovic DB, Hamel E.** (1999) Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. J Cereb Blood Flow Metab 19, 794–802.
- **Español AJ.** (2005) Modulación del comportamiento biológico de líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos por el sistema nervioso autónomo parasimpático. Tesis Doctoral, pp: 106.
- **Español AJ, de la Torre E, Sales ME.** (2003) Parasympathetic modulation

of local acute inflammation in murine submandibular glands. Inflammation 27, 97-105.

- **Español AJ, Sales ME.** (2004) Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines. Int J Mol Med 13, 311-317.
- **Español AJ, de la Torre E, Fiszman GL, Sales ME.** (2007) Role of non neuronal cholinergic system in breast cancer progresión. Life Sci 80, 2281-2285.
- **Felder CC.** (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. FASEB J 9, 619-625.
- **Ferrara N, Kerbel RS.** (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. Nature 438, 967-974.
- **Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ.** (2000) Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. Am J Pathol 156, 361-381.
- **Folkman J.** (1975) Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. Ann Intern Med 82, 96-100.
- **Folkman J.** (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. J Natl Cancer Inst 82, 4-6.
- **Folkman J.** (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov 6, 273-286.
- **Gargett CE, Rogers PAW.** (2001) Human endometrial angiogenesis. Reproduction 121, 181–186.

- **Gonzalez A, Crittenden EL, Garcia DM.** (2004) Activation of muscarinic receptors elicits pigmentgranule dispersión in retinal pigment epithelium isolated from bluegill. BMC Neurosci 5, 23, 1-12.
- **Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M.** (1996) Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. FEBS Lett 395, 119-122.
- **Grando SA.** (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. J Invest Dermatol Symp Proc 2, 41-48.
- **Granstrom E, Kindhal H.** (1978) Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes research. In: Frolich JC (ed) Advances in Prostaglandins. Pp, 119-210. Raven Press, New York.
- **Green LC, Wagner DA, Glowoski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannembaum SR.** (1982) Analysis of nitrate, nitrite and (^{15}N) in biological fluids. Anal Biochem 126, 131-138.
- **Griffioen AW, Molema G**. (2000) Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol Rev 52 (2), 237-267.
- **Grueb M, Reinthal E, Rohrbach JM, Barztz-Schmidt KU.** (2006) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corneal epithelium and endothelium. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 244, 1191–1195.
- **Gullido PM.** (1995) Prostaglandins and gangliosides of tumor

microenvironment: their role in angiogenesis. Acta Oncol 34, 439-441.

- **Haggstrom S, Bergh A, Damber JE.** (2000) Vascular endothelial growth factor content in metastasizing and nonmetastasizing Dunning prostatic adenocarcinoma. Prostate 45, 42-50.
- **Hanahan D, Folkman J.** (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-364.
- **Hardy RR, Hayakawa K.** (2001) B cell development pathways. Annu Rev Immunol 19, 595-621.
- **He Y**, **Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K.** (2004) Preexisting lymphatic endothellum but not endotelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. Cancer Res 64, 3737-3740.
- **Heffernan D, Dudley B, McNeil P, Howdieshell T.** (2006) Local Arginine Supplementation Results in Sustained Wound Nitric Oxide Production and Reductions in Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Granulation Tissue Formation. J Surg Res 133, 46-54.
- **Hemmerlein B, Galuschka L, Putzer N, Zischkau S, Heuser M.** (2004) Comparative analysis of COX-2, vascular endothelial growth factor and microvessel density in human renal cell carcinomas. Histopathology 45, 603-611.
- **Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T.** (2000) Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cell: Evidence for

growth supresión by inhibiting COX-2 expression. Int J Cancer 86, 667-671.

- **Hortelano S, Genaro AM, Boscá L.** (1993) Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. FEBS Lett 320,135-139.
- **Jain RK, Carmeliet P.** (2001) Vessels of death or life. Sci Am 285, 38-45.
- **Jasnis MA, Klein S, Monte M, Davel L, Sacerdote de Lustig E, Algranati ID.** (1994) Polyamines prevent DFMO-mediated inhibition of angiogenesis. Cancer Lett 79, 39-43.
- **Jeltsch M, Tammela T, Alitalo K, Wilting J.** (2003) Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. Cell Tissue Res 314, 69-84.
- **Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD.** (1996) Comparative properties of arginases. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 114,107-132.
- **Jiménez E, Montiel M.** (2005) Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells. J Cell Physiol 204, 678-686.
- **Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ.** (2003) Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. J Clin Gastroenterol 37, 28-33.
- **Josko J, Mazurek M.** (2004) Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. Med Sci Monit 10, 89-98.

- **Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K.** (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. EMBO J 16, 3898–3911.
- **Karkkainen MJ, Alitalo K.** (2002) Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and node metastasis. Semin Cell Dev Biol 13, 9-18.
- **Katz A, Wu D, Simon MI.** (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G-protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. Nature 360, 686-689.
- **Kawashima K, Fujii T.** (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. Pharmacol Ther 86, 29-48.
- **Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H.** (2007) Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. Life Sci 80, 2314-2319.
- **Keller R, Geiges M, Keist R.** (1999) L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. Cancer Res 50, 1421-1425.
- **Kesisis G, Broxterman H, Giaccone G.** (2007) Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity. Curr Pharm Des 13, 2795-2809.
- **Kim R, Emi M, Tanabe K.** (2006) Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. Immunology 119, 254-264.
- **Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Cao Y, Alitalo K.** (2002) Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast

growth factor-2 induced lymphangiogenesis in mouse cornea. Proc Natl Acad Sci USA 99, 8868-8873.

- **Lala PK, Orucevic A.** (1998) Role of nitric oxide in tumor progresión: lessons from experimental tumors. Cancer Metastasis Rev 17, 1-6.
- **Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA.** (2006) Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. J Leuk Biol 80, 1-9.
- **Li H, Meininger CJ, Kelly KA, Hawker JR, Morris SM, Wu G.** (2002) Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol 282, R64-R69.
- **Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG.** (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64, 327-336.
- **Lowry O, Rosebrough N, Randall R, Farr A.** (1971) Protein measurement with Folin phenol reagents. J Biol Chem 193, 265-268.
- **Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P and Persico MG.** (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. Proc Natl Acad Sci USA 88, 9267-9271.
- **Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe´er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ.** (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am J Pathol 155, 739-752.
- **Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S and Ruco L.** (1992) The

origin and function of tumor-associated macrophages. Immunol Today 13, 265-270.

- **Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A.** (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol 23, 549-555.
- **Marinissen M, Gutkind S.** (2001). G-protein-coupled receptor and signalling networks: emerging paradigmas. Trends Pharmacol Sci 22, 368-376.
- **Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D'Amore PA, Stein-Streilein J, Losordo DW, Streilein JW.** (2005) Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. J Clin Invest 115, 2363-2372.
- **Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, takahashi S and Taketo MM.** (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. Proc Natl Acad Sci USA 97, 9579-9584.
- **Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Rackè K.** (2006) Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. Am J Respir Cell Mol Biol 35, 621–627.
- **Mazhar D, Gillmore R, Waxman J.** (2005) COX and cancer. QJM 10, 711-8.
- **McBride WH.** (1986) Phenotype and functions of intratumoral macrophages. Biochim Biophys Acta 865, 27-41.

- **Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G and Eichmann K.** (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. Eur J Immunol 25, 1101-1104.
- **Moncada S, Higgs A.** (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 329, 2002-2012.
- **Monte M, Davel L, Sacerdote de Lustig E.** (1997) Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. Eur J Cancer 33, 676-682.
- **Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE.** (2004) Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. Blood 104, 2224-2234.
- **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.** (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 13, 9-22.
- **Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T Kojiro M**. (2006) Angiogenesis in cancer. Vasc Health Risk Manag 2, 213-219.
- **Ochi N, Matsuo Y, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Sato M, Funahashi H, Okada Y, Manabe T.** (2007) Vascular endothelial growth factor-C secreted by pancreatic cancer cell line promotes lymphatic endothelial cell migration in an in vitro model of tumor lymphangiogenesis. Pancreas 34, 444-451.
- **Ohno S, Suzuki N, Ohno Y, Inagawa H, Soma GI, Inoue M.** (2003) Tumor-

associated macrophages: foe or accomplice of tumors?. Anticancer Res 23, 4395-4409.

- **Pepper MS, Skobe M.** (2003) Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. J Cell Biol 163, 209-213.
- **Polverini PJ, Leibovich SI.** (1984) Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. Lab Invest 51, 635-642.
- **Que LG, George SE, Gotoh T, Mori M, Huang YT.** (2002) Effects of arginase isoforms on NO Production by nNOS. Nitric Oxide 6, 1-8.
- **Rimmaudo LE, de la Torre E, Sacerdote de Lustig E, Sales ME.** (2005) Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun 334, 1359–1364.
- **Rinner I, Schauenstein K.** (1993) Detection of choline-acetyltransferase activity in lymphocytes. J Neurosci Res 35, 188-191.
- **Risau W.** (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature 368, 671–674.
- **Rodríguez PC, Hernández CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC.** (2005) Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. J Exp Med 202, 931-939.
- **Roffel F, Meurs H, Zaagsma J.** (2001) Identification, localization and function of muscarinic receptors in the airways. In: Zaagsma J, Meurs H, Roffel AF (Eds.), Muscarinic Receptors in Airways Diseases. Birkhäuser Verlag, Berlin, pp. 63–86.

- **Roitt IM.** (2005) Inmunología: Fundamentos. 10ª ed. Cap. 8 y 12.
- **Rosen LS.** (2002) Clinical experience with angiogenesis signalling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. Cancer Control 9, 36-44.
- **Rundhaug JE.** (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med 9, 267-285.
- **Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K.** (2004) Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. Trends Immunol 27, 387-395.
- **Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P.** (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. Proc Natl Acad Sci 90, 7240-7244.
- **Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Raffi S.** (2003) VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. Blood 101, 168-172.
- **Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D.** (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. Am J Pathol 161, 947-956.
- **Schuller HM, Orloff M.** (1998) Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. Biochem Pharmacol 55, 1377–1384.

- **Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF.** (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219, 983-985.
- **Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G.** (2000) Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. Cancer Res 60,3305-3312.
- **Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M.** (2001) Concurrent Induction of Lymphangiogenesis, Angiogenesis, and Macrophage Recruitment by Vascular Endothelial Growth Factor-C in Melanoma. Am J Pathol 159, 893–903.
- **Smith WL, Meade EA, DeWitt DL.** (1994) Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes 1 and 2. Ann New York Acad Sci 714, 136-142.
- **Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS.** (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res 60, 4873-4880.
- **Song P, Sekhon HS, Jia Y, Séller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER.** (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. Cancer Res 63, 214-221.

- **Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K.** (2002a) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. Nat Rev Cancer 2, 573-583.
- **Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG.** (2002b) The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. FASEB J 16, 922-934.
- **Straub RH, Westermann J, Scholmerich, Falk W.** (1998) Dialogue between the CNS and immune system in lymphoid organs. Inmunol. Today 19, 409-413.
- **Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ.** (1996) Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. Cancer Res 56, 4424-4429.
- **Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M and Nagumo M.** (2001) Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. J Oral Pathol Med 30, 41-47.
- **Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL.** (1999) Effects of the new arginase inhibitor Nω-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. Nitric Oxide 6, 427-438.
- **Tyagi S, Tyagi P, Van-le S, Yoshimura N, Chancellor MB, de Miguel F.** (2006) Qualitative and quantitative expression profile of muscarinic receptors in human urothelium and detrusor. J Urol 176, 1673–1678.

- **Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H.** (2000) Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. Clin Cancer Res 6, 135-138.
- **Urtreger AJ, Ladeda VE, Puricelli LI, Rivelli A, Vidal M del C, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffé E.** (1997) Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary tumor cell lines. Int J Oncol 11, 489-496.
- **Van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ.** (1992) Tumor infiltrating cells in human cancer. On the posible role of CD16+macrophages in antitumor cytotoxicity. Lab Invest 67, 166-174.
- **von Boehmer H.** (2000) T-cell lineage fate: instructed by receptor signals?. Curr Biol 10, 642-645.
- **Walch L, Brink C, Norexl X.** (2001) The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. Therapie 56, 223–226.
- **Wang D, DuBois RN.** (2004) Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. Semin Oncol 31, 64-73.
- **Wang D, DuBois RN.** (2006) Prostaglandins and cancer. Gut 55, 115-22.
- **Wess JW.** (1993) Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. Life Sci 53, 1447-1463.
- **Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.** (1998) Non-Neuronal Acetilcholine, a

locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. Pharmacol Ther 77, 59-79.

- **Wessler I, Kirkpatrick CH.** (2001) Role of non-neuronal and neuronal acetylcholine in the airways. In: Zaagsma J, Meurs H, Roffel AF (Eds.), Muscarinic Receptors in Airways Diseases. Birkhäuser Verlag, Berlin, pp. 25–62.
- **Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.** (1999) The cholinergic "pitfall": Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. Clin Exp Pharmacol Physiol 26, 198-205.
- **Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ.** (2001) The Non-neuronal cholinergic system. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. Jpn J Pharmacol 85, 2-10.
- **Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ.** (2003) The non-Neuronal cholinergic system in human: Expression, function and pathophysiology. Life Sci 72, 2055-2061.
- **Williams CL, Lennon VA.** (1990) Activation of M3 muscarinic acetylcholine receptors inhibits voltage-dependent calcium influx in small cell lung carcinoma. J Biol Chem 265, 1443–1447.
- **Wink DA, Vodovotz Y, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB.** (1998) The multifaceted role of nitric oxide in cancer. Carcinogenesis 19, 711-721.
- **Witte MH, Way DL, Witte CL, Bernas M.** (1997) Lymphangiogenesis: Mechanisms, significance and clinical implications. In Regulation of

angiogenesis, I.D. Goldberg and E.M.Rosen, eds. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp.65-112.

- **Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, Isner JM.** (1998) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. Am J Pathol 153, 381-394.
- **Wu G, Bazer FW, Hu J, Johnson GA, Spencer TE.** (2005) Polyamine synthesis from proline in the developing porcine placenta. Biol Reprod 72, 842–850.
- **Wu G, Morris SM.** (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J 336, 1-17.
- **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 407, 242-248.
- **Zhang S, Zhang D, Sun B.** (2007) Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. Cancer Lett 254, 157-164.