

Tesis Doctoral

Supresión de la angiogénesis tumoral a través de anticuerpos monoclonales

Góngora, Adrián Daniel

2010

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

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

Cita tipo APA:

Góngora, Adrián Daniel. (2010). Supresión de la angiogénesis tumoral a través de anticuerpos monoclonales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Góngora, Adrián Daniel. "Supresión de la angiogénesis tumoral a través de anticuerpos monoclonales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**SUPRESIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL A
TRAVÉS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica**

Adrián Daniel Góngora

Director de Tesis: Dr. Alberto Baldi

Director Asistente: Dr. Alejandro Mladovan

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-
CONICET)

Buenos Aires, 2010

Supresión de la angiogénesis tumoral a través de anticuerpos monoclonales

Resumen

La angiogénesis es el mecanismo por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes. En adultos, la angiogénesis es un evento raro excepto durante la reparación de heridas o en procesos asociados con el ciclo menstrual. Sin embargo, existen desórdenes patológicos dependientes de angiogénesis, como el desarrollo de tumores, la retinopatía diabética, la artritis reumatoidea, entre otras. Este proceso, es modulado en condiciones normales y patológicas por el balance entre factores positivos (pro-angiogénicos) y negativos (anti-angiogénicos), y ha sido propuesto como un factor limitante en el desarrollo tumoral, jugando también un papel importante en la metástasis. Los melanomas son tumores muy agresivos y resistentes a las terapias antineoplásicas que se caracterizan por expresar diversos factores de crecimiento. Estos pueden actuar en forma autocrina e intracrina sobre la proliferación y supervivencia, y en forma paracrina en la angiogénesis. Entre estos factores se destacan el VEGF y el FGF-2.

Este trabajo tiene como objetivo principal el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AMs), capaces de neutralizar los efectos biológicos del VEGF y del FGF-2 sobre las células endoteliales y evaluarlos terapéuticamente sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos, inducidos por distintas líneas de melanoma humanos. También, se caracterizó la expresión de estos factores en las líneas de melanoma para evaluar si existe una relación entre el efecto terapéutico de dichos AMs y el patrón de expresión de dichos factores en las líneas de melanoma. Concluimos que sólo el bloqueo del VEGF con AMs conduce a una reducción del crecimiento tumoral, mientras que el bloqueo del FGF-2 con AMs no mostró efectos terapéuticos en los modelos ensayados, incluso en las líneas que sobre-expresaban FGF-2, ni la combinación de ambos AMs sinergizó el efecto terapéutico del AM anti-VEGF.

Por otro lado, si bien el efecto del bloqueo del VEGF con AMs se observó en todas las líneas neoplásicas ensayadas, evidenciaron una gran diferencia en la respuesta, dependiendo de los niveles de expresión de FGF-2. Las líneas de melanoma que sobre-expresan FGF-2 (A375 y 1205Lu) mostraron una mayor resistencia a esta terapia anti-angiogénica, con una reducción del tamaño tumoral del orden del 50% respecto a los controles. Sin embargo, en la línea de melanoma que expresa bajos niveles de FGF-2 (IIB-Mel-J) esta reducción fue cercana al 90%. En conclusión, demostramos que solo el bloqueo del VEGF con AMs es efectivo en el tratamiento de melanomas experimentales y encontramos que este efecto terapéutico es en parte dependiente de los niveles de expresión de FGF-2, que actuaría en forma intracrina, generando una resistencia al tratamiento mencionado. De esta manera, contribuimos a definir al FGF-2 como un posible marcador de resistencia a esta terapia en melanoma.

Finalmente, a partir del AM anti-VEGF, desarrollamos un anticuerpo recombinante de cadena simple (scFv-Fc) neutralizante de la actividad biológica del VEGF. Resultados preliminares indican que con solo un bajo porcentaje de células transfectadas con un plásmido que expresa el scFv-Fc anti-VEGF, xenotransplantadas en ratones atímicos, alcanza para disminuir significativamente la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Palabras Claves: VEGF, FGF-2, ANTICUERPOS MONOCLONALES, ANGIOGÉNESIS, MELANOMA

Supression of the tumor angiogenesis by means of monoclonal antibodies

Abstract

Angiogenesis is the process by which new blood vessels sprout from pre-existing vasculature. In adults, angiogenesis is a rare event except during the wound healing or menstrual cycle. However there are pathological disorders like tumors, diabetic retinopathy, and rheumatoid arthritis, among others, that depends on angiogenesis. This process is controlled in normal and pathological conditions by a balance between positive (pro-angiogenic), and negative (anti-angiogenic) factors, and it has been proposed as a limiting process in tumor development, and metastasis. Melanoma is an aggressive tumor resistant to antineoplastic therapies and are known to express several growth factors that can act as an autocrine and intracrine way in proliferation and survival and as a paracrine way in angiogenesis. Among other factors, VEGF and FGF-2, are the more important pro-angiogenic factors.

The aim of this work was to develop two monoclonal antibodies (MAs) able to block the biological effects of VEGF and FGF-2 on endothelial cells growth, and to evaluate their therapeutic effect on human melanoma cells growing in athymic mice. Moreover, we have characterized the expression of these factors in three melanoma cell lines, to evaluate the possible relationship between the therapeutic effect of these MAs and the expression of these factors in those cells. We have concluded, that only the MA anti-VEGF induces a reduction on tumor growth, while MAs against FGF-2 showed no anti-tumor activity on the assayed models, even in cell lines that overexpress this factor, and the combination of both MAs did not show improvements in the MA anti-VEGF therapeutic effect.

On the other hand, although the therapeutic effects of VEGF inhibition was observed in all cell lines studied, we have found a great response differences depending on FGF-2 expression levels. Cells that overexpressed FGF-2 (A375 y 1205Lu), showed a greater resistance to this anti-angiogenic therapy with only a 50% on tumor size reduction as compared with the untreated mice. Nevertheless, when the xenotransplanted mice carrying melanoma cell line (IIB-Mel-J), that express lower values of FGF-2, were treated with MA anti-VEGF, the tumor mass reduction was near 90%. In conclusion, we have demonstrated that only the use of MA anti-VEGF is responsible for the decrease of experimental melanoma progression and we found that this therapeutic effect is in part dependent on FGF-2 expression levels, acting as an intracrine factor given rise to anti-VEGF therapy resistance. In this way, we have defined FGF-2 as a possible melanoma resistance molecular marker to this therapy.

Finally, from the MA anti-VEGF, we have developed a recombinant single chain version (scFv) that neutralizes VEGF activity. Preliminar results indicated that only few percentage of melanoma cells transfected with a plasmid codifying scFv-Fc anti-VEGF, and xenotransplanted in athymic mice, are enough to reduce both angiogenesis and tumor progression.

Key words: VEGF, FGF-2, MONOCLONAL ANTIBODIES, ANGIOGENESIS, MELANOMA.

A mis padres María y Ricardo

Agradecimientos

A mis directores Dr. Alberto Baldi y Dr. Alejandro Mladovan por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis, sus conocimientos y su amistad.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio por la incondicional ayuda que me han prestado y por hacer tan gratificante el ambiente de trabajo.

Al Dr. Leonardo Bussmann por prestarme su ayuda, conocimientos, reactivos, etc. cada vez que lo necesité.

A Cele por estar a mi lado y hacerme más feliz la vida.

Y a todos mis amigos del IBYME, principalmente al grupo de los viernes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Angiogénesis	1
Regulación de la angiogénesis por hipoxia	3
Angiogénesis tumoral	5
La familia del VEGF	7
Estructura del VEGF	7
Funciones biológicas del VEGF	8
Regulación de la expresión del VEGF	9
Receptores del VEGF	9
La familia del FGF-2	12
Estructura del FGF-2	12
Regulación de la expresión de FGF-2	14
Funciones biológicas del FGF-2	15
Receptores del FGF	16
Relación entre el VEGF y FGF-2 en la angiogénesis	19
Melanoma	21
Melanoma y el sistema FGF/FGFR	22
Melanoma y el sistema VEGF/VEGFR	22
Anticuerpos monoclonales	24
Generación de los hibridomas	24
Los AMs como agentes terapéuticos	26
Terapias anti-angiogénicas	28
Efectos secundarios y resistencia a las terapias de bloqueo del VEGF	30
Antecedentes del bloqueo del FGF-2 con Anticuerpos	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
Objetivos Específicos	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Obtención de VEGF y FGF-2	34
1.1. Producción de VEGF recombinante	34
1.1.1. Expresión de VEGF en <i>E. Coli</i>	34
1.1.2. Renaturalización a partir de los cuerpos de inclusión	35
1.1.3. Purificación por columna de afinidad	35
1.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida	36
1.1.5. Ensayo de actividad biológica del VEGF	36
1.2. Producción del FGF-2 recombinante	37
1.2.1. Obtención del ARN y RT-PCR	37
1.2.2. Generación del vector de expresión	37
1.2.3. Expresión del FGF-2	38
1.2.4. Purificación del FGF-2	39
1.2.5. Determinación de la pureza del FGF	39
1.2.5a. Electroforesis en gel de poliacrilamida	39
1.2.5b. Espectrometría de masa (<i>MALDI-TOF</i>)	40
1.2.6. Ensayo de actividad biológica del FGF-2	40
2. Desarrollo y selección de los anticuerpos	41
2.1. Inmunizaciones	41
2.1.1. Generación de los inmunógenos	41

2.1.2. Inmunización de conejos	41
2.1.3. Obtención de anticuerpos policlonales	42
2.2. Desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AMs)	43
2.2.1. Inmunización de ratones	43
2.2.2. Obtención de esplenocitos murinos	43
2.2.3. Células progenitoras de fusión (NS0).....	44
2.2.4. Fusión celular	44
2.2.5. Clonados celulares.....	45
2.2.6. Selección de los hibridomas productores de AMs específicos	46
2.2.7. Ensayo de los sobrenadantes sobre la proliferación de HUVEC	47
2.2.8. Purificación de los AMs a partir de los sobrenadantes	47
2.2.9. Titulación del efecto inhibitorio de los AMs.....	48
2.3. Caracterización bioquímica de los AMs	48
2.3.1. Ensayos de <i>Western-blot</i>	48
2.3.1a. Reconocimiento del VEGF ₁₆₅ humano	48
2.3.1b. Reconocimiento de los VEGF ₁₆₃ y VEGF ₁₂₁ humanos y el VEGF ₁₆₄ murino.....	49
2.3.1c. Reconocimiento del FGF-2 humanos.....	50
2.3.2. Titulación por ELISA	50
2.3.3. Determinación de los isotipos por ELISA	51
2.3.4. Determinación de la afinidad de los AMs por ELISA de competencia	51
2.3.4a. ELISA de competencia	51
2.3.4b. Cálculo de la afinidad	51
2.3.5. Afinidad de los AMs anti-VEGF por sistema BIAcore®	52
2.4. Ensayos <i>in vivo</i> con los AMs (anti-VEGF).....	53
2.4.1. Efecto de los AMs sobre la angiogénesis inducida por líneas tumorales.....	53
2.4.2. Efecto del AM P4F7 sobre el crecimiento tumoral (IIB-Mel-J y HT-29)	54
2.4.3. Estudios Histopatológicos	55
2.5. Comparación de la acción inhibitoria (P4F7 vs.. Avastin).....	55
3. Ensayos en líneas celulares de melanoma humanos	56
3.1. Efecto del VEGF y el FGF-2 sobre la proliferación.....	56
3.2. Efecto de los AMs (P4F7 y DB3) sobre la proliferación <i>in vitro</i>	56
3.3. Expresión de VEGF y FGF-2 por ELISA sándwich	57
3.3.1. ELISA sándwich para cuantificar VEGF.....	57
3.3.2. ELISA sándwich para cuantificar FGF-2	58
3.4. Expresión del FGF-2 por inmunofluorescencia	59
3.5. Ensayos sobre el efecto de los AMs sobre el crecimiento tumoral	60
4. Clonado de los Fab y desarrollo del AM recombinante	61
4.1. Obtención del ARN y RT-PCR.....	61
4.2. Clonado de los productos amplificados en el vector pComb 3	62
4.3. Evaluación de la especificidad de los Fab clonados.....	63
4.4. Desarrollo del Anticuerpo recombinante	64
4.5. Producción y evaluación de la especificidad del scVEGF-Fc.....	65
4.6. Capacidad bloqueante del anticuerpo recombinante	65
4.7. Ensayo <i>in vivo</i> con células tranfectadas con pCEFL-scVEGF-Fc.....	66
5. Técnicas Generales	67
5.1. Método del TSS para la transformación de <i>E. Coli</i>	67
5.2. ELISA directo	67
5.3. Producción de AMs en ratones.....	68
5.3.1. Crecimiento de hibridomas en ratones.....	68
5.3.2. Purificación de los AM a partir de ascitis.....	69
5.4. Eliminación de inmunoglobulinas del SFB	69
5.5. Ensayo de <i>Colony</i> PCR	70
5.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	70
5.7. Cultivo celular.....	71
5.7.1. Mantenimiento de los hibridomas y las células NS0	71
5.7.2. Mantenimiento de las células HUVEC.....	71
5.7.3. Mantenimiento de células de melanoma.....	72
5.7.4. Mantenimiento de células de adenocarcinoma de colon HT-29	72
5.7.5. Mantenimiento de células HEK-293.....	72

5.7.6. Congelado y descongelado de las células	72
6. Medios y Soluciones.....	74
RESULTADOS	76
Capítulo 1: Producción de VEGF y FGF-2	76
Expresión del VEGF	76
Ensayo de actividad biológica del VEGF	77
Producción de FGF-2	77
Clonado del FGF-2 humano	78
Expresión y purificación de FGF-2	79
Espectrometría de masa del FGF-2.....	79
Ensayo de actividad biológica del FGF-2.....	80
Conclusiones del capítulo 1	81
Capítulo 2: Desarrollo y selección de AMs anti-VEGF	82
Generación de los hibridomas	82
Caracterización bioquímica de los AMs contra VEGF	83
Determinación del isotipo.....	83
Determinación de la especificidad de los AMs	84
Ensayo de <i>Western blot</i>	84
Titulación por ELISA	84
Afinidad de los AMs	85
Afinidad por ELISA de competencia	85
Afinidad por sistema BIAcore	87
Efectos sobre la proliferación de HUVEC	89
Especificidad del efecto neutralizante de los AMs	89
Titulación del efecto neutralizante de los AMs	90
Efecto <i>in vivo</i> de los AMs sobre la angiogénesis tumoral.....	91
Producción del AMs (P4F7) a partir de ascitis.....	92
Efecto del AM P4F7 sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral.....	93
Comparación de la acción inhibitoria (P4F7 vs.. Bevacizumab).....	96
Conclusiones del capítulo 2	97
Capítulo 3: Desarrollo y selección de AMs anti-FGF-2.....	99
Generación de los hibridomas	99
Ensayo de inhibición de la proliferación en presencia de heparina.....	100
Caracterización bioquímica de los AMs contra FGF-2.....	101
Determinación del isotipo.....	101
Afinidad por ELISA de competencia.....	102
Efectos sobre la proliferación de HUVEC	103
Especificidad del efecto neutralizante de los AMs	103
Titulación del efecto neutralizante de los AMs	104
Conclusiones del capítulo 3	105
Capítulo 4: Estudios en líneas de melanoma humanos.....	106
Estudios <i>in vitro</i>	106
Efecto del VEGF y el FGF-2 sobre la proliferación celular	106
Efecto de los AMs P4F7 y DB3 sobre la proliferación	107
Expresión de VEGF y FGF-2 por ELISA.....	108
Expresión del FGF-2 por inmunofluorescencia.....	109
Estudios sobre el efecto de los AMs sobre el crecimiento tumoral.....	111
Conclusiones del capítulo 4	114
Capítulo 5: Clonado y generación anticuerpos recombinantes	116
Clonado de la fracción Fab de los AMs	116
Desarrollo de Anticuerpos de cadena simple	119
Efecto neutralizante sobre la proliferación de HUVEC	121
Estudio sobre el efecto del scVEGF-Fc en el crecimiento tumoral.....	122
Conclusiones del capítulo 5	125

DISCUSIÓN	126
Conclusión general.....	139
ABREVIATURAS Y CONVENCIONES.....	142
BIBLIOGRAFÍA	146

INTRODUCCIÓN

Angiogénesis

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos se originan mediante dos procesos denominados vasculogénesis y angiogénesis. El primero ocurre tempranamente durante la etapa embrionaria y consiste en la formación de una red vascular primitiva a partir de angioblastos, precursores de células endoteliales derivadas del mesodermo. Este sistema vascular primitivo está formado por capilares uniformes e indiferenciados.

Posteriormente, esta red primitiva se diferencia, se remodela y expande a través de un proceso llamado angiogénesis en el cual se generan nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes [1]. La estabilización de esta vasculatura ocurre con la aparición de las células de soporte peri-endoteliales, que incluyen a los pericitos para pequeños capilares y a las células de músculo liso para los grandes vasos. De esta manera, se progresa hacia un sistema vascular más desarrollado con una organización en vasos de complejidad diferente [2].

En adultos, la angiogénesis es un evento raramente observado excepto durante la reparación de heridas o en procesos asociados con el ciclo menstrual e implantación del óvulo [3]. Sin embargo, existen desórdenes patológicos dependientes de angiogénesis, como el desarrollo de tumores, la retinopatía diabética y la artritis reumatoidea, entre otros [4].

El proceso angiogénico consiste en varios pasos que incluyen la estimulación de células endoteliales (CE), por acción de factores de crecimiento que conducen a la liberación de enzimas proteolíticas, generalmente metaloproteasas de matriz (*MMPs Matrix Metalloproteinases*), que degradan la matriz extracelular, luego las CE migran y proliferan para finalmente reordenarse, adherirse y formar nuevos capilares. Eventualmente, el reclutamiento de células peri-endoteliales (pericitos) estabiliza esta red capilar formada [1].

Diversos estímulos son capaces de iniciar el proceso angiogénico; principalmente la hipoxia y otras formas de estrés metabólico como la hipoglucemia y la acidez de células en rápida división, la respuesta inmune o inflamatoria o directamente, por la acción de mutaciones genéticas como la activación de oncogenes o

la inactivación de genes supresores tumorales [5]. Todos estos procesos son controlados principalmente, por diversos factores proteicos que se unen a receptores de la membrana de las células endoteliales, originando una cascada de señalización y activando la expresión de genes específicos involucrados en la proliferación y la migración de estas células.

El inicio de la angiogénesis, conocido como “*switch*” angiogénico, depende del balance entre factores pro- y anti-angiogénicos en el microambiente cercano a las CE. Un balance favorable hacia los factores pro-angiogénicos conduce a la formación de nuevos vasos, mientras que la prevalencia de factores anti-angiogénicos mantiene el equilibrio hacia vasos quiescentes o, en circunstancias particulares, incluso a la regresión de vasos no estabilizados con células peri-endoteliales [6].

El factor pro-angiogénico de mayor relevancia en la proliferación y diferenciación de las células endoteliales es el **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor* o Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). Es importante destacar que la cascada de señales generadas por VEGF es actualmente considerada como uno de los blancos más promisorios para la inhibición de la angiogénesis tumoral. El segundo factor angiogénico en importancia, corresponde a la familia del **FGF** (*Fibroblast Growth Factor* o Factor de Crecimiento Fibroblástico), este, se sobreexpresa en una amplia variedad de tumores y posee también, efectos tumorigénicos independientes de la angiogénesis.

Muchas otras moléculas como las efrinas, las angiopoyetinas, moléculas de adhesión como las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, diversas metaloproteasas y PDGF entre otras, participan también en el proceso de angiogénesis [2]. Contrariamente, factores como angiostatina, endostatina, trombospondina, interferones α y β , IL-12, inhibidores de metaloproteasas y otros, constituyen inhibidores naturales de este proceso [6] (Tabla 1).

Factores activadores de la angiogénesis	Reguladores negativos de la angiogénesis
<ul style="list-style-type: none"> • Familia del VEGF y diversas isoformas. • Familia del FGF • PDGF (-AA, -AB, -BB) • Angiopoietinas (Ang) y sus receptores (Tie1-2) • Efrinas y sus receptores • Timidina fosforilasa • HGF, EGF, PLGF, IGF-1 • IL-1 y -8 • Angiogenina • Miembros de la familia TGF • TNF-α • MMPs-2, -9, -14, -15, -16, -17, -19 y -26 • Integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$ • NOS • COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> • Angiostatina (fragm. int. de plasminógeno) • Endostatina (fragm. C-term. de colágeno XVIII) • Canstatina (fragmento de colágeno IV) • IFN-α y -β • IL-12 y -18 • Factor plaquetario 4 (PF-4) • Factor inducible por interferón (IP-10) • Trombospondina • TIMP-1, -2, -3 y -4 • Inhibidores de los activadores de plasminógeno • Antitrombina anti-angiogénica • Metalospondinas • Factor derivado del epitelio pigmentado • VEGFR1 soluble, neuropilina-1 soluble • Prolactina

Tabla 1. Activadores e inhibidores de la angiogénesis más estudiados.

Regulación de la angiogénesis por hipoxia

Las células de mamíferos superiores son capaces de censar el oxígeno regulando un número de genes que se expresan en respuesta a la hipoxia [7]. Esto es mediado por el factor transcripcional inducible por hipoxia-1 (HIF-1, *Hypoxia Inducible Factor-1*) que activa la expresión de diversos genes involucrados en el proceso angiogénico, entre los que se destaca el VEGF. HIF-1 está compuesto por dos subunidades (α y β), de las cuales solo HIF-1 α es capaz de responder a los niveles de O₂.

Es interesante destacar que en normoxia, HIF-1 α es hidroxilado en la prolina 564 del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), a través de diversas enzimas denominadas HIF-prolil hidroxilasas. Esta modificación de HIF-1 α posibilita su unión al producto del gen supresor tumoral VHL involucrado en la enfermedad de *Von Hippel-Lindau* [8], una neoplasia renal que se caracteriza por una elevada vascularización. Esta unión marca a HIF-1 α para su ubiquitinación y subsecuente degradación por el sistema de proteosomas. Asimismo, el dominio de trans-activación

carboxi-terminal (C-TAD) es el encargado de reclutar a complejos co-activadores como p300/CBP. Más aún, esta unión se encuentra bloqueada en normoxia debido a la hidroxilación del aminoácido asparagina 803, presente en C-TAD. De tal manera, en presencia de niveles normales de O₂, la hidroxilación de estos aminoácidos promueve la degradación de HIF-1 α e impide su interacción con proteínas co-activadoras. En cambio, durante la hipoxia, la hidroxilación dual de HIF-1 α no tiene lugar. Así, se impide la unión de VHL, aumentando la vida media de la proteína (permitiendo la formación del heterodímero HIF-1 α /HIF-1 β) posibilitando la asociación con p300/CBP [9]. Este complejo puede interactuar con los elementos del ADN que responden a hipoxia (HRE, *Hypoxia Response Element*), incrementando la expresión de diversos genes como VEGF, VEGFR1 y Tie2 entre otros, favoreciendo el proceso angiogénico. Otras moléculas moduladas por HIF-1 incluyen la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS, *Nitric Oxide Synthase*) [10], que regula la producción de óxido nítrico con la consiguiente vasodilatación de las arteriolas, la eritropoyetina que favorece a la eritropoyesis y la inducción de cambios en el metabolismo celular, pasando de la glucólisis aeróbica a anaeróbica [11]. Se deduce de ello, que el HIF-1 α exhibe múltiples efectos y resulta indispensable para el inicio de la re-vascularización tisular. Cabe destacar que actualmente se han descubierto dos genes adicionales relacionados (HIF-2 y -3) con funciones similares y uno que actúa como factor inhibitorio (HIF-1AN) e interacciona con HIF-1 y VHL.

Además de la hipoxia, se han descrito otros mecanismos mediados por hormonas y citoquinas capaces de inducir la angiogénesis a través de HIF-1 α en condiciones de normoxia [12] que serían muy importantes durante la inflamación provocada por tumores [13]. PR39 es un péptido derivado de macrófagos, descrito inicialmente como un factor antimicrobiano y purificado posteriormente del fluido de heridas y lesiones del miocardio [14]. Este factor inhibe la degradación de HIF-1 α por el sistema de proteosomas. De esta forma, durante procesos inflamatorios, la expresión de PR-39 se incrementa con el consiguiente aumento de HIF-1 α y de la angiogénesis. Además, PR39 induce la expresión de receptores para FGF (FGFRs) y es considerado un poderoso inductor de la angiogénesis en pacientes con falla cardíaca.

Cabe destacar, que recientemente se han identificado varios mecanismos independientes de HIF-1 en la angiogénesis inducida por hipoxia y citoquinas [15] agregando aún, mayor complejidad a esta regulación.

Angiogénesis tumoral

La angiogénesis ha sido propuesta, hace mucho tiempo, como un factor limitante en el desarrollo tumoral [16]. Ahora se sabe que la angiogénesis permite el crecimiento sostenido del tumor, su invasividad y juega un papel importante en la metástasis [6].

Muchos estudios han correlacionado la densidad de la microvasculatura tumoral con la agresividad de gran cantidad de neoplasias humanas, incluido los melanomas [17-19]. El “*switch*” angiogénico, es reconocido como un evento fundamental en el crecimiento de varios tumores humanos y murinos [6].

Un tumor comienza generalmente como una pequeña masa no vascularizada y localizada que no puede crecer más de 1-2 mm³, su progresión depende del aporte de nutrientes y de oxígeno provistos por la circulación sanguínea vascular. Algunos tumores comienzan adheridos a vasos preexistentes los que les permiten alcanzar un mayor tamaño, pero ambos pueden progresar solo si realiza un “*switch*” angiogénico que le permita formar nuevos capilares a partir de la vasculatura del hospedador. Este es un proceso crítico en el que el balance entre factores anti-angiogénicos y pro-angiogénicos se desplaza hacia la formación de nuevos vasos por acción del tumor y su microambiente, incluida la hipoxia, las células inflamatorias infiltradas y mutaciones en oncogenes y genes supresores como p53 (Figura 1). A medida que el tumor avanza, el incremento de la hipoxia y la mayor cantidad de células pro-inflamatorias como monocitos y macrófagos (que liberan factores pro-angiogénicos), y posiblemente nuevas mutaciones en el tumor, generarían una angiogénesis exagerada, que conduce a la formación de una vasculatura inmadura, tortuosa y dilatada, con bifurcaciones y capilares sin destino, que se diferencia de la vasculatura normal [5]. Esta vasculatura tumoral por lo general, carece de células de soporte como pericitos y células de músculo liso lo que la hace menos respondedora a sustancias vasoactivas [20]. Por otro lado, la copiosa vascularización tumoral, posibilita la entrada al torrente circulatorio de células neoplásicas facilitando el desarrollo metastático, que conjuntamente con el aumento de la permeabilidad capilar, incrementa la diseminación del tumor primario [5].

En algunos casos, las CEs de los vasos recientemente formados, también son afectadas por factores anti-angiogénicos como la endostatina y la angiostatina generadas por enzimas proteolíticas del tumor y que desencadenan la apoptosis de las células endoteliales [21], principalmente en etapas tempranas del tumor, cuando el desbalance

hacia factores pro-angiogénicos no esta muy exacerbado, lo que contribuiría a controlar el desarrollo de las metástasis. Por el contrario, en el tumor primario, la sobre-expresión de factores pro-angiogénicos como el VEGF y el FGF-2, entre otros, contribuyen a la sobrevida y proliferación de las CE [22] por lo que su angiogénesis no se vería afectada.

El VEGF es considerado el principal factor angiogénico tumoral porque su sobre-expresión ha sido asociada con el aumento de la vasculatura, un pobre pronóstico y una mayor agresividad en la mayoría de los tumores donde fue estudiado [23, 24]. Otros autores, han relacionado el aumento del VEGF y el FGF-2 presente en el suero de pacientes que presentaban distintos tipos de tumores [25].

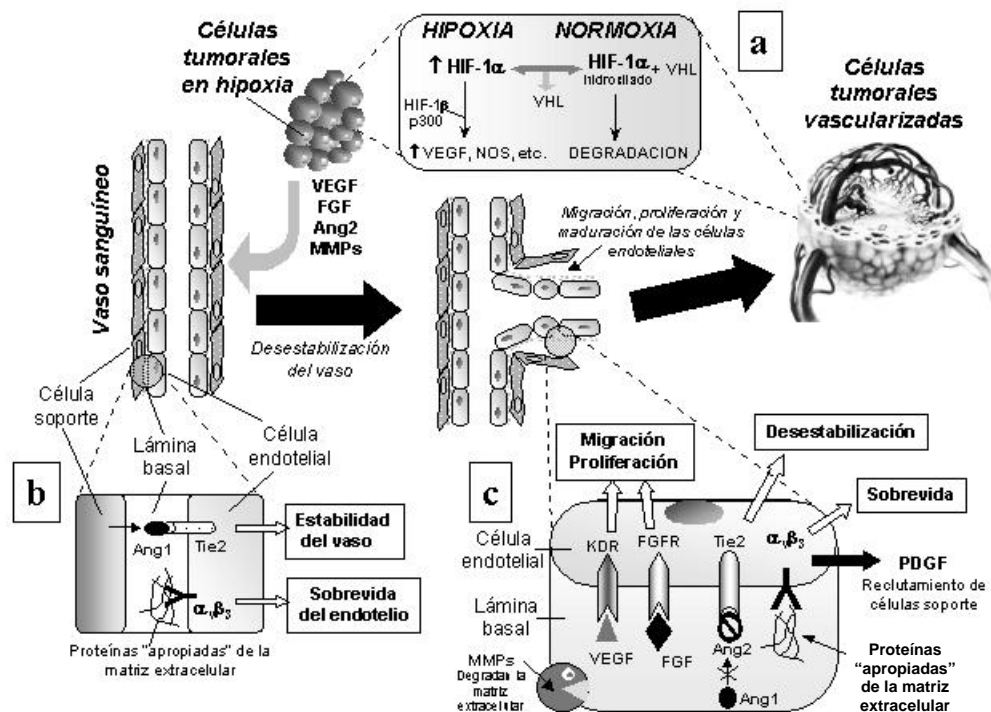


Figura 1. Esquema del proceso de angiogénesis tumoral. a) Equilibrio molecular en el control de los niveles de oxígeno. b) Sistema vascular en reposo. c) Vasculatura en remodelación y endotelio proliferante. Se destacan las principales moléculas involucradas en el proceso angiogénico. Tanto estas moléculas como las propias células endoteliales en proliferación constituyen el blanco de exhaustivos estudios para el desarrollo de terapias anti-angiogénicas.

La familia del VEGF

El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) fue originalmente denominado por Senger y colaboradores en 1983 como factor de permeabilidad vascular (VPF, *Vascular Permeability Factor*), por ser capaz de aumentar la permeabilidad vascular en la piel de cerdos de Guinea [26]. En 1989 Ferrara y Henzel y paralelamente Plouet y colaboradores, publicaron en forma independiente la purificación y secuenciación de un factor mitogénico específico de células endoteliales, que llamaron respectivamente VEGF [27] y Vasculotropina [28]. Estudios posteriores confirmaron que se trataba de la misma proteína.

El VEGF es considerado el prototipo de la regulación de la vasculogénesis y la angiogénesis [3]. El VEGF, también conocido como VEGF-A, es el miembro principal de una familia de factores de crecimiento compuesta por VEGF-A, B, C, D, E (este último de origen viral) y el factor de crecimiento placentario (PlGF, *Placental Growth Factor*) [29]. Se ha establecido que VEGF-B, -C y -D están involucrados en la regulación *in vivo* de la linfoangiogénesis [30] y en la metástasis tumoral por vía linfática [31].

Estructura del VEGF

Estructuralmente el VEGF es una glicoproteína homodimérica de 45 KDa que contiene 2 uniones disulfuro intracatenarios y 2 intercatenarios y es capaz de inducir la mitosis de células endoteliales e incrementar la permeabilidad vascular [32]. Se han descrito al menos seis isoformas del VEGF constituidas por 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos, de las cuales las de 121 y 165 aminoácidos son las isoformas más ampliamente expresadas. Todas ellas son codificadas por un único gen y se generan por *splicing* alternativo [33]. El VEGF₁₆₅ carece de los residuos codificados por el exón 6, mientras que los exones seis y siete, no participan en la codificación de VEGF₁₂₁. El gen humano responsable de la síntesis de VEGF está organizado en ocho exones, localizados en el cromosoma 6, brazo p, región 21.3 [34].

VEGF₁₆₅ en primer lugar y el VEGF₁₂₁ en segundo, constituyen las isoformas más abundantes y son expresadas en un gran número de tumores sólidos. El VEGF₁₆₅ es un mitógeno endotelial más potente que el VEGF₁₂₁ y es capaz de unirse al heparán-

sulfato de los proteoglicanos de la superficie celular y de la MEC, quedando retenida una gran fracción, hasta su eventual liberación por heparanasas, que degradan los azúcares de los proteoglicanos. Por el contrario, el VEGF₁₂₁ no es retenido por el heparán-sulfato. Cabe destacar, que la sigla VEGF es utilizada principalmente para denominar a la isoforma humana de 165 aminoácidos del VEGF-A, habiendo sido el primero en ser descubierto y la isoforma más ampliamente expresada de la familia.

Funciones biológicas del VEGF

La concentración tisular de VEGF es regulada con precisión en forma espacial, temporal y cuantitativa y su presencia es imprescindible para la formación de los vasos sanguíneos. La anulación de los dos alelos de VEGF en ratones “knockout” resulta en una ausencia casi completa de su sistema vascular [35]. Incluso, ratones con un solo alelo funcional para VEGF, mueren en estadios embrionarios debido a severas anomalías en su sistema vascular [36]. Más aún, el VEGF continúa siendo crítico durante el desarrollo posterior al nacimiento, decreciendo su papel en el adulto. El patrón de expresión de este factor sugiere su participación en el desarrollo y mantenimiento del sistema vascular normal y en la angiogénesis fisiológica y patológica. Actúa principalmente sobre las células endoteliales (vasculares y linfáticas), provocando un cambio en su expresión génica, migración y proliferación [37].

El VEGF incrementa la vasodilatación, en forma dosis-dependiente, generando taquicardia e hipotensión [38]. Este efecto ocurriría a través de un aumento de la enzima NOS que conduce a una mayor liberación de óxido nítrico [39], un importante vasodilatador, aumentando la permeabilidad vascular. Este primer evento es precedido por la migración y proliferación de las células endoteliales, siendo este un paso clave en el comienzo de la angiogénesis, permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas, las cuales, junto al VEGF favorecen estos procesos. Además, el VEGF no sólo promueve la proliferación de células endoteliales, sino que activa la supervivencia de las mismas, induciendo la expresión de proteínas como Bcl-2, un inhibidor de la apoptosis [40, 41].

El VEGF también ejerce efectos sobre células no endoteliales. De esta manera, promueve la migración de monocitos y la formación de colonias de progenitores de la serie granulocítica-macrofágica [42]. Asimismo, se ha demostrado que el VEGF inhibe

a las células dendríticas inmaduras, sugiriendo que podría facilitar el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la respuesta inmune [43]. Por otra parte, este factor, es un regulador fundamental de la diferenciación del hemangioblasto [44].

Regulación de la expresión del VEGF

Se ha establecido que la tensión de oxígeno constituye uno de los mayores reguladores de la expresión de VEGF y de la eritropoyetina. En concordancia con ello, se identificó una secuencia, denominada HRE, de 8 pares de bases en el promotor de estos y otros genes, responsable de la inducción de la expresión de los mismos por la hipoxia a través del factor HIF-1 (ver Regulación de la angiogénesis por hipoxia). Sin embargo, la activación transcripcional no es el único mecanismo modulador del VEGF, ya que se ha descrito también, un incremento en la estabilidad del ARNm en condiciones de hipoxia [45].

Otros factores que influyen positivamente en la síntesis de VEGF son: el TGF- β [46], el KGF [47], las interleuquinas 1 β [48] y -6 [49], la prostaglandina-2, la angiotensina-2, la corticotrofina, el EGF y el FGF [50], entre otros.

Receptores del VEGF

El mecanismo de señalización ejercido por el VEGF en las células endoteliales involucra a dos receptores que poseen actividad de tirosina-quinasa, designados VEGFR1 (Flt-1 en ratones) y VEGFR2 (Flk-1 en ratones) [51], este último también conocido en humanos como KDR (*Kinase insert Domain Receptor*). Un esquema de estos y otros receptores que involucran al VEGF, se observa en la Figura 2. La expresión de los VEGFRs ocurre predominantemente en células del endotelio y sus precursores embrionarios, al igual que en los diversos procesos angiogénicos y durante la proliferación neoplásica. Se ha observado que ratones “*knockout*” para VEGFR2, mueren en el útero entre 8.5 y 9.5 días post-fertilización, como resultado de defectos tempranos en el desarrollo hematopoyético y de las células endoteliales, indicando que el complejo VEGF/VEGFR2 actúa en las primeras etapas en la formación del hemangioblasto y del endotelio [52]. Por el contrario, ratones “*knockout*” para VEGFR1, mueren en un tiempo similar, pero muestran progenitores hematopoyéticos

normales y células endoteliales abundantes que migran y proliferan, aunque son incapaces de formar vasos funcionales [53]. Se deduce entonces, que estos dos receptores activan diferentes mecanismos de señalización en las células endoteliales sobre las que actúan.

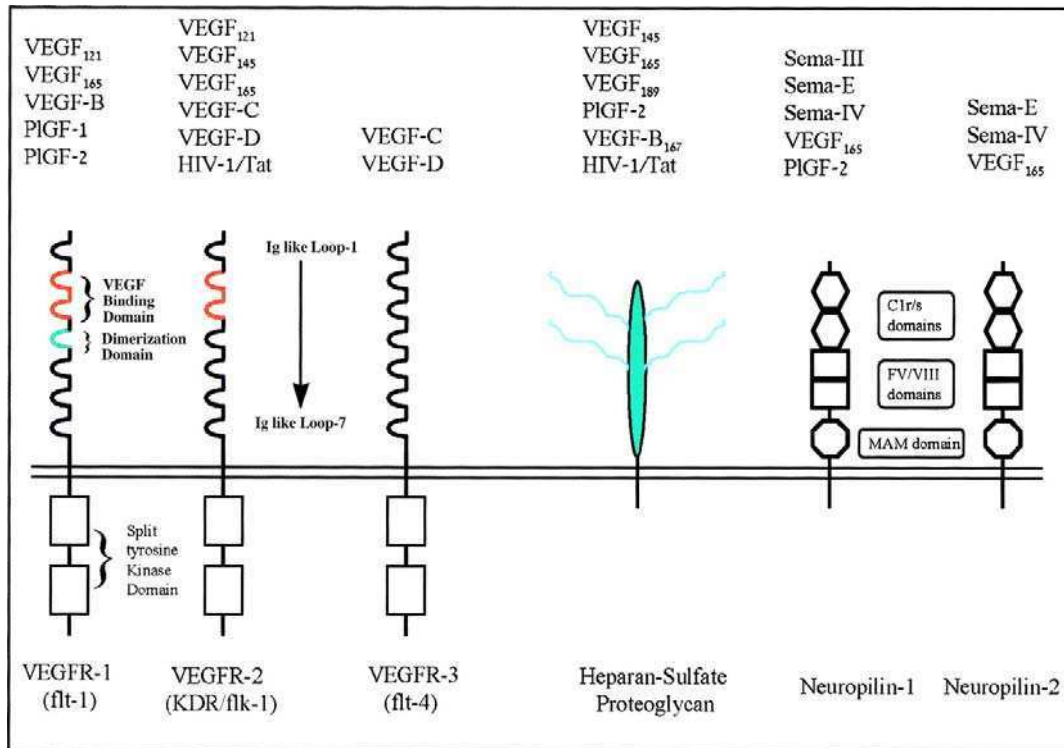


Figura 2. Factores de crecimiento y receptores de la familia del VEGF. Los tres receptores tirosina-quinasa (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), los receptores específicos de determinadas isoformas NP-1 y –2, y el heparán-sulfato de proteoglicanos, se muestran esquematizando sus dominios. Los factores de crecimiento e isoformas de la familia VEGF se representan con sus interacciones conocidas [54].

De esta manera, VEGFR2 parece ejercer una función preponderante como el transductor más importante de la señal de VEGF en células endoteliales, dando lugar a su migración y proliferación. La interacción entre VEGF y VEGFR2 conduce al incremento de la actividad de tirosina quinasa del receptor y su auto-fosforilación. Esto origina una cascada de señales citoplasmáticas que activan diversas vías de transducción como los sistemas de PKC, MEK-MAPK y PI3K-Akt, promoviendo la proliferación y supervivencia endotelial y activando al sistema NOS, el cual favorece la vasodilatación y permeabilidad celular [51].

Por otra parte, VEGFR1, que aisladamente es incapaz de inducir la proliferación de células endoteliales en presencia de VEGF, actúa como un “receptor señuelo” en la etapa embrionaria, regulando la accesibilidad de VEGF a un determinado tejido [55].

En adultos se ha encontrado la expresión de VEGFR1 en otros tipos celulares como monocitos y macrófagos, donde sería responsable de su migración inducida por VEGF [56], también en células tumorales, en donde estaría asociado a una mayor capacidad invasiva y metastásica [57]. Se ha descrito además, la existencia de un tercer miembro de esta familia, el VEGFR3 expresado preferentemente en tejido linfático, capaz de unir VEGF-C y VEGF-D.

Varios investigadores han demostrado la existencia de otras proteínas capaces de unir específicamente VEGF₁₆₅, como neuropilina-1 (Np-1, *Neuropilin-1*). Este receptor glicoproteico fue descrito originariamente durante el desarrollo del sistema nervioso [58]. Se ha establecido que Np-1 no solo se encuentra asociado al endotelio, sino que también se expresa en la superficie de células tumorales derivadas de carcinoma de mama, próstata y melanoma [59]. NP-1 une específicamente la isoforma VEGF₁₆₅, pero no a VEGF₁₂₁ [60]. La diferencia estructural entre VEGF₁₆₅ y VEGF₁₂₁ es de 44 aminoácidos codificados por el exón 7 del gen VEGF, la unión a NP-1 ocurre a través del producto de este exón. En contraste, la unión a VEGFR1 y VEGFR2 es consecuencia de los aminoácidos codificados por los exones 4 y 3, respectivamente (Figura 3). NP-1 constituiría un co-receptor que participa potenciando la unión de VEGF₁₆₅ al VEGFR2, sin embargo, Np-1 no exhibe actividad de tirosina-quinasa por sí mismo.

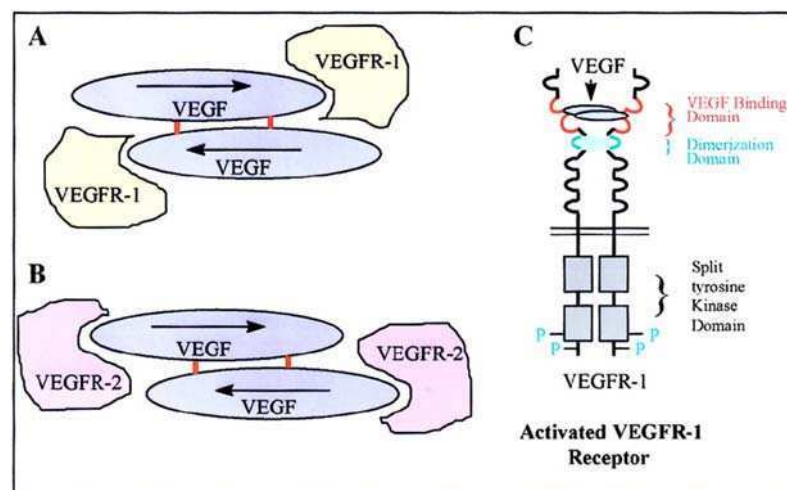


Figura 3. Esquema de la interacción del VEGF con sus receptores tirosina-quinasa, VEGFR1 (A) y VEGFR2 (B). Las flechas sobre los monómeros del VEGF remarcan la unión antiparalela de éstos para formar el dímero. Se muestra que la unión a cada receptor es a través de distintos dominios del VEGF. (C) Se observan los dominios del VEGFR1 (similar al VEGFR2), donde se remarca en rojo los dominios de inmunoglobulina 2 y 3 que intervienen en la interacción con el VEGF y en celeste el dominio 4 que interviene en la dimerización del receptor. También se grafica la región citoplasmática con los residuos tirosina fosforilados (P) [54].

Por último, cabe destacar la existencia de formas naturales “solubles” de NP-1 y de VEGFR1 [61], producidas por “*splicing* alternativo”, compuestas únicamente por una porción del dominio extracelular de estos receptores, los cuales podrían secuestrar VEGF, atenuando su función (Tabla 1).

La familia del FGF-2

El factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), también conocido como factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), es uno de los miembros más importantes de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas con capacidad de unirse a heparán-sulfato. Hasta el presente, la familia del FGF contiene 22 miembros (FGF-1 a -22) que actúan sobre la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de un gran número de estirpes celulares [62].

El FGF-2 fue inicialmente purificado a partir de hipófisis bovinas como una proteína que estimulaba la proliferación de células Balb/c3T3 [63]. Unos años después, se purificó otro miembro destacado de esta familia, pero que por poseer un punto isoeléctrico ácido, se lo denominó factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF/FGF-1) [64]. Posteriormente, se demostró que ambos factores producían mitosis de células endoteliales y eran sobre-expresados por una gran variedad de tumores, lo que llevó a realizar investigaciones sobre su posible relación con la angiogénesis tumoral.

Estructura del FGF-2

El FGF-2 fue inicialmente caracterizado como una proteína monomérica de 18 kDa sin puentes disulfuro [62]. La ausencia de una señal de exportación provoca una acumulación citoplasmática de esta isoforma. En un comienzo, se creía que era liberado durante la necrosis celular, pero esto fue descartado debido a su importante papel durante el desarrollo embrionario donde no ocurre necrosis. Actualmente, se están estudiando mecanismos de secreción de este factor por vías alternativas al aparato de Golgi, que involucraría una exocitosis no clásica.

Una vez secretado, el FGF-2 es retenido en la red de heparán-sulfato de la matriz extracelular (MEC), que funcionaría como un reservorio de este, permitiendo la localización del factor y limitando su difusión tisular [65]. La unión del factor a la MEC

también lo protegería de la proteólisis [66]. Existen al menos dos mecanismos que explican como el FGF-2 inmovilizado es liberado de la matriz extracelular para poder interactuar con sus receptores de membrana. El primero sería por efecto de heparanasas que escinden al heparán-sulfato de la MEC liberando el FGF-2. El segundo, descubierto más recientemente, involucra una proteína *carrier* denominada FGFBP (*FGF Binding Protein*), que conduciría al FGF-2 desde la MEC hasta los receptores ubicados en la superficie celular. Cabe destacar que FGFBP está adquiriendo cada vez más importancia, y su expresión estaría relacionada con el *switch* angiogénico en muchos tipos tumorales [67].

El genoma humano posee una copia del gen que codifica para el FGF-2 situado en el cromosoma 4q 26-27, de 40 kb que incluye 3 exones y 2 intrones [68]. Formas más grandes del FGF-2 (22, 22,5, 24 y 34 kDa), han sido identificadas como productos resultantes del uso de codones alternativos (CUG) del inicio de la traducción [69] (Figura 4). Estas isoformas se suelen llamar en su conjunto formas de alto peso molecular (HMW "*High Molecular Weight*"), y poseen una señal de localización nuclear [70].

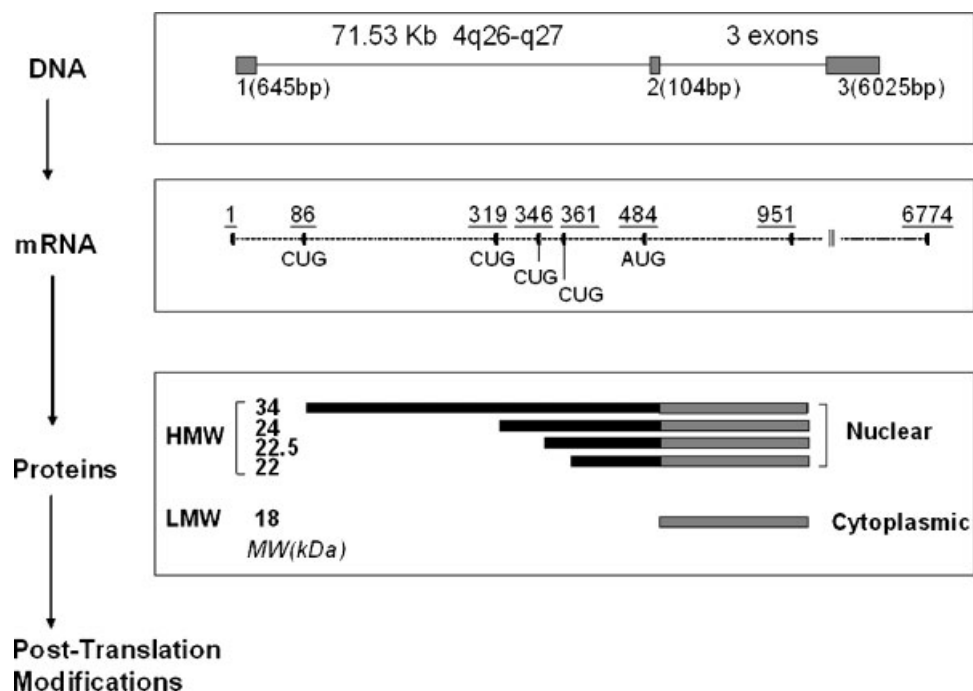


Figura 4. Generación de las distintas isoformas del FGF-2. El gen del FGF-2 contiene 3 exones (en gris) que codifican para un único RNA mensajero, este tiene un sitio de inicio de la traducción canónico (AUG) y 4 sitios alternativos (CUG). Las formas de alto peso molecular (HMW) contienen una señal de localización nuclear mientras que el isoforma de bajo peso molecular (LMW, *Low Molecular Weight*) tendría una localización citoplasmática y extracelular [71].

Estas isoformas ejercerían sus acciones biológicas al menos en parte, en forma independiente de los receptores conocidos. La isoforma de 18 kDa también se encuentra en el núcleo, como producto de su unión en forma autocrina o paracrina a receptores de membrana y posterior internalización [72].

El FGF-2 se caracteriza por tener numerosos residuos aminoacídicos básicos lo que le otorga sus propiedades básicas, con un punto isoeléctrico (pI) = 9,6. El FGF-2 tiene dos dominios de unión a heparina. Se ha descrito que su interacción con heparán-sulfato de proteoglicanos (HSPG, *Heparán-Sulphate Proteoglycan*), de la superficie celular conduce a una dimerización que es obligatoria para la activación de sus receptores de alta afinidad, mientras que el heparán-sulfato de la MEC funcionaría como un reservorio de FGF.

Regulación de la expresión de FGF-2

La expresión de FGF-2 es inducida por TNF α , IL-1 e INF- γ [73]. La unión de fibronectina a la integrina $\alpha 5\beta 1$ también estimula la síntesis de FGF-2 así como la subunidad $\alpha 5$ está a su vez regulada por el FGF de 18 kDa [74]. Como regulador negativo de su expresión se destaca al INF- α , que se encuentra en evaluación como agente antineoplásico [75]. A diferencia de lo que ocurre con otros miembros de la familia y algunos FGFRs, no se conocen mutaciones en oncogenes o genes supresores que directamente incrementen la expresión de FGF-2 [76]. En glioblastomas la mutación de p53 incrementaría la expresión de FGF-2 [77]. Ello se contradice con lo reportado en la mayoría de los melanomas estudiados, donde p53 no se encuentra mutado e igualmente sobre-expresan FGF-2. En melanoma, el proto-oncogén c-MYB es el responsable de la sobre-expresión de FGF-2, aunque lo haría en una forma indirecta, aún desconocida, ya que no se une directamente al promotor del FGF-2 [78].

Actualmente, la bibliografía indica que en la regulación de las funciones biológicas del FGF-2 asociadas a la angiogénesis, aparte de su expresión, sería muy importante la expresión de componentes que inducen la liberación del FGF-2 de la MEC, como son heparanasas y la FGFBP mencionadas anteriormente.

Funciones biológicas del FGF-2

Durante el desarrollo embrionario el FGF-2 es expresado en múltiples etapas y tiene efectos sobre la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de un gran número de linajes celulares derivados principalmente del ectodermo y el mesodermo [79]. El FGF-2 también es fundamental durante la neurogénesis y el posterior mantenimiento del sistema nervioso central [80, 81].

Mientras que muchos miembros de la familia del FGF se expresan únicamente durante la etapa embrionaria, el FGF-2 también tendría un importante papel fisiológico en el adulto, principalmente durante la reparación de tejidos dañados y procesos que involucren a la angiogénesis [82].

La sobre-expresión de FGF esta asociada a la transformación maligna y contribuye con la fisiopatología del cáncer, ya sea por sus acciones angiogénicas como por sus efectos proliferativos y de supervivencia en las células tumorales [83]. En neoplasias el FGF-2 proviene de 4 fuentes; es secretado por las células tumorales, por células inflamatorias infiltradas, por las células endoteliales y movilizado por proteasas y FGFBP desde la MEC [84]. A pesar de esto, se ha encontrado una correlación significativa entre la expresión de FGF-2 en las células tumorales en función del grado de avance del cáncer de páncreas [85], renal [86] y colon [87].

Si bien todas las isoformas del FGF-2 están implicadas en proliferación y supervivencia celular, las formas HMW no tendrían efectos sobre la migración [88], pero se destacan sus acciones de “protección” celular asociada a la resistencia a radioterapia [72] y los quimioterápicos [89].

A pesar de las actividades autocrinas e intracrinas de las distintas isoformas del FGF-2 sobre las propias células tumorales, la isoforma de bajo peso molecular es la única secretada y la responsable de sus efectos sobre la angiogénesis fisiológica y tumoral. Dentro de sus acciones angiogénicas se destacan:

- El FGF-2 es un factor angiogénico que induce la proliferación migración y diferenciación de las células endoteliales [90]. Estos efectos son señalizados principalmente a través del FGFR1 que se expresa mayoritariamente en las células endoteliales [91].

- El FGF-2 en las células endoteliales, modula la expresión de muchos genes implicados en la activación del ciclo celular, diferenciación, adhesión celular y sobrevida [92].
- Estimula en las células endoteliales la secreción de activadores del plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA), colagenasas y otras proteasas que degradan la membrana basal y la MEC, estimulando la migración de las células endoteliales en el proceso angiogénico [93].
- El FGF-2 estimula la proliferación y migración de pericitos, lo que conduciría a una microvasculatura más estabilizada [94].

Receptores del FGF

Todos los miembros de la familia del FGF ejercen sus principales efectos biológicos al interactuar con receptores de membrana de alta afinidad con actividad tirosina-quinasa llamados RTKs (*Receptor Tyrosine Kinase*). Existen 4 genes que codifican para receptores del FGF y se los denominan FGFR1 a 4 [62].

Estos receptores tienen una estructura similar, con una secuencia hidrofóbica que señala su destino en la membrana celular, 2 o 3 dominios extracelulares del tipo inmunoglobulina (siendo necesarios los dominios 2-3 para la unión al FGF), un dominio ácido (*acid box*), una región transmembrana y 2 dominios de tirosina-quinasa citoplasmáticos (Figura 5). La activación se produce por dimerización de estos receptores para lo cual es imprescindible la presencia de heparán-sulfato junto con el FGF, de esta manera, se forma un complejo ternario [95] con una relación 2:2:2 (heparán-sulfato:FGF-2:FGFRs). En apoyo a esta teoría, este complejo fue cristalizado [96], también se ha encontrado un sitio de unión a heparán sulfato en el FGFR1 [97].

Una vez activados, estos receptores ejercen sus funciones biológicas principalmente a través de la activación de las vías de señalización RAS/MAPK, responsables de la proliferación y diferenciación [98]. Asimismo, la activación de la vía PI3K/Akt conduce a un aumento de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, que sería responsable de la sobrevida celular [99]. También se activa la vía de señalización mediada por fosfolipasa C γ , aunque su función biológica aún no han sido claramente

establecida [100, 101] y se ha descrito la activación de otras vías cuyas funciones se encuentran en discusión [102].

Los ARN mensajeros que codifican para los receptores del FGF sufren “*splicing*” alternativo, lo que conduce a la formación de un gran número de variantes con distintas afinidades por los distintos miembros de la familia y son expresados en diferentes etapas del desarrollo en forma tejido específico (Figura 6) [103].

El FGFR1 se expresa mayoritariamente en las células endoteliales y es el principal señalizador de las respuestas angiogénicas [104, 105]. También, se ha encontrado la expresión de una isoforma del FGFR2 en células endoteliales de aorta murinas [106], mientras que el FGFR3 y FGFR4, no han sido detectados en células endoteliales. El FGFR2 está involucrado en el desarrollo de distintos órganos durante la etapa embrionaria, el FGFR3 estaría involucrado en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y la formación de los huesos [107], mientras que el FGFR4, se expresa únicamente en la etapa embrionaria y estaría implicado en el desarrollo y la diferenciación de los músculos [102, 108].

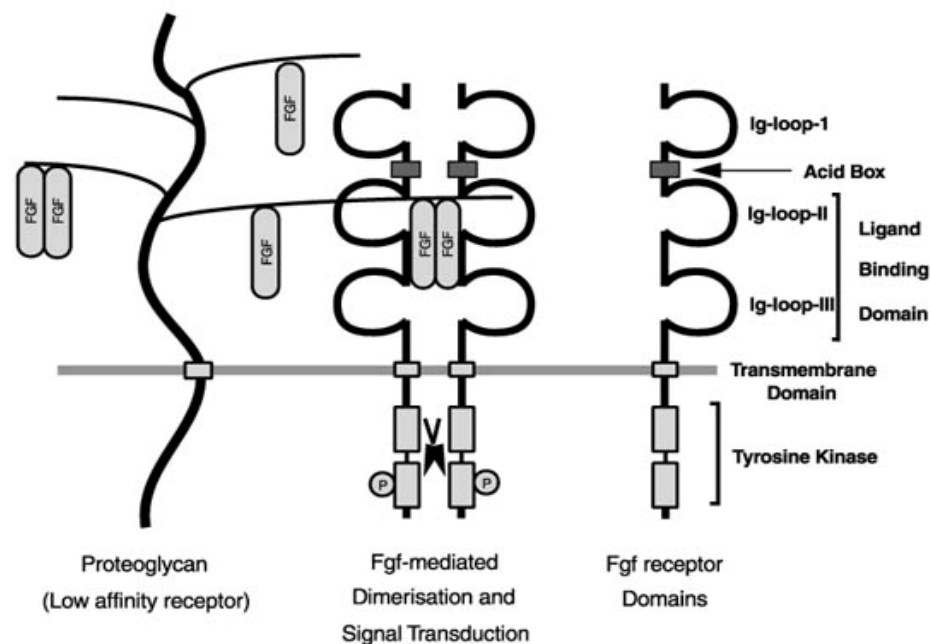


Figura 5. Interacción del FGFR y su ligando. El FGF-2 transduce su señal al unirse a su receptor en forma conjunta con heparán-sulfato de proteoglicanos de membrana, formando así un complejo ternario. Como resultado, se produce una auto-fosforilación y activación de su dominio tirosina-quinasa que inicia una cascada de señalización a través de segundos mensajeros. A la derecha, se observa la estructura clásica de un receptor de FGF con sus distintos dominios [76].

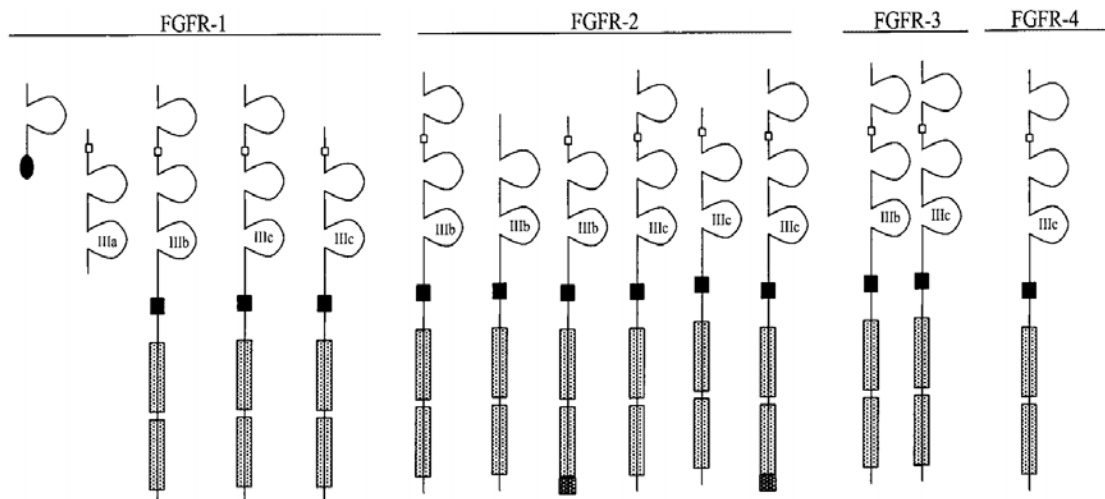


Figura 6. Los distintos receptores del FGF con sus variantes de “*splicing*” más estudiadas. ([102].

Recientemente, se han descrito varias proteínas que actuarían como receptores “promiscuos” no clásicos del FGF-2, sin actividad tirosina-quinasa, de menor afinidad, pero más abundantes, estos receptores también jugarían un papel importante en la señalización mediada por el FGF-2 [100]. Entre este tipo de receptores, se destacan Syndican-4 que al unirse al FGF-2 y en ausencia de RTKs, activa la vía de señalización mediada por la proteína-quinasa $C\alpha$, y la integrina $\alpha 5\beta 3$ que se une al FGF-2 regulando proteínas de membrana, las cuales favorecerían la adhesión celular en forma independiente de los RTKs [109]. Entre otras moléculas que actúan como receptores o co-receptores del FGF-2, se destacan NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), N-cadherina y gangliósidos con distintas funciones [100].

La alta complejidad del sistema de señalización mediada por FGF-2 hace muy difícil predecir los efectos biológicos de cualquier agente bloqueante del mismo.

Relación entre el VEGF y FGF-2 en la angiogénesis

El VEGF y el FGF-2 están relacionados en varias etapas de la angiogénesis, linfoangiogénesis y vasculogénesis. Hay evidencias de que gran parte de la actividad angiogénica del FGF-2 sería activando la vía del VEGF/VEGFRs. En ciertos modelos, los antagonistas del VEGFR2, inhiben la angiogénesis inducida tanto por VEGF como por FGF-2 [110]. El bloqueo del FGFR1 o del FGFR2 en células de glioma, provoca una disminución de la expresión de VEGF concomitantemente con una disminución de la vascularización tumoral [111].

Tanto el FGF-2 endógeno como el exógeno regulan positivamente la expresión de VEGF en las células endoteliales [112]. En el endotelio de la córnea en ratones, el FGF estimula la expresión de VEGF mientras que la neutralización de éste con anticuerpos monoclonales (AMs), reduce la angiogénesis inducida por FGF-2 [112].

El bloqueo del VEGFR1 con AMs o dominantes negativos, inhibe la formación de capilares inducido por FGF-2 [113]. El FGF-2 incrementa la expresión del FGFRs y VEGFRs en células endoteliales [114], principalmente del VEGFR2 [115], siendo este efecto mediado por el FGFR1.

La formación de estructuras tubulares de células endoteliales mediada por VEGF depende del FGF-2 endógeno [116]. El VEGF y el FGF-2 actúan en forma sinérgica en la proliferación de células endoteliales *in vitro* [117], y en distintos modelos de angiogénesis *in vivo* [117-119]. Ambos factores también actúan en forma conjunta en el reclutamiento de pericitos hacia los capilares a través de un mecanismo que involucra una mayor señalización del eje PDGF-B/PDGFR β , el VEGF aumenta la expresión de PDGF-B en las células endoteliales, mientras que el FGF-2 induce un aumento del PDGFR β en los pericitos [120].

Si bien ambos factores regulan en forma similar la expresión de muchos genes relacionados con la angiogénesis, también se diferencian en la expresión de otros. El FGF-2, pero no el VEGF, induce la actividad de telomerasa previniendo la senescencia celular [121]. Hay una gran diferencia en la morfología de la vasculatura inducida por cada factor, en donde sólo el VEGF genera una vasculatura fenestrada [32, 122]. Si bien ambos factores (VEGF y FGF-2), inducen la expresión de proteasas encargadas de degradar la MEC y la membrana basal durante el comienzo de la angiogénesis, sólo el

FGF-2, induce la expresión de varios componentes de la MEC que contribuyen a su reestructuración y la maduración de los vasos [123].

El FGF-2 es muy importante en la linfoangiogénesis, incrementando la expresión de VEGF-C y VEGF-D, que interactuando con el VEGFR3, controlan la proliferación y migración de células del endotelio linfático [124].

Se ha establecido que el sistema VEGF/VEGFR resulta esencial para el desarrollo de la vasculatura embrionaria [1]. La situación no está claramente definida para el sistema FGF/FGFR. En ratones *knockout* para el FGF-2, no se encontraron grandes diferencias en la morfología vascular [125], aunque muestran un menor tono vascular y baja presión arterial [81], lo que reflejaría una redundancia en la familia del FGF [126]. Mientras que en ratones *knockout* para el FGFR1 el desarrollo embrionario se interrumpe tempranamente a nivel de la gastrulación, no permitiendo estudiar su papel en la vasculogénesis y angiogénesis embrionaria [127, 128]. En una etapa posterior del desarrollo embrionario, utilizando un adenovirus que codifica para un dominante negativo del FGFR1, se observó un desarrollo anormal de la vasculatura en embriones de ratón [129].

El FGF-2 promueve la proliferación y diferenciación de células que expresan VEGFR2, precursoras de angioblastos y hemangioblastos derivadas del mesodermo [130]. En sintonía con esto, se ha encontrado que el VEGF y el FGF-2 incrementan la sobrevivencia de angioblastos, pero sólo el VEGF es responsable de la formación de la red vascular primitiva [131].

Melanoma

Los melanoma son tumores extremadamente agresivos que se caracterizan por un comienzo localizado en la piel que rápidamente puede generar metástasis a distintos órganos. Es el tumor de mayor crecimiento en la incidencia poblacional de las últimas décadas [132] y el de peor pronóstico en su forma metastásica, debido a su resistencia a distintos tratamientos [133, 134].

El melanoma se inicia a partir de melanocitos epidérmicos o de células progenitoras de melanocitos, las cuales se originan en la cresta neural para luego migrar a la piel y folículos pilosos durante el desarrollo embrionario. El progreso de un melanoma se da en distintas fases; partiendo de un lunar melanocítico, con progresión a una displasia y una fase de crecimiento radial u horizontal que luego progresa a una fase de crecimiento vertical infiltrativa y finalmente, a su forma metastásica [135]. La transición de la fase radial hacia la fase de crecimiento vertical, ha mostrado ser dependiente de la angiogénesis y está asociada con un mayor grado de malignidad [136-138]. Incluso, la probabilidad de metástasis ha sido correlacionada con la densidad microvascular del tumor primario [19, 139, 140].

Se cree que la gran agresividad de los melanoma se debe a que sus células se caracterizan por producir una gran cantidad de factores de crecimiento, muchos de los cuales actúan en forma paracrina en la angiogénesis, y también pueden actuar en forma autocrina e intracrina para sostener el crecimiento y la supervivencia de estas células tumorales. Entre estos factores se destacan el VEGF y el FGF-2 [141], pero también se ha reportado la expresión de FGF-1, EGF, IGF-1, PDGF [142], PlGF [143], IL-8 [144], TGF α y TGF β [145], entre otros.

Aparentemente, en la progresión de un melanoma, se detecta tempranamente la expresión de FGF-2 durante la fase de displasia y la de crecimiento horizontal, seguido de la expresión de VEGF en la fase de crecimiento vertical [138, 141].

Melanoma y el sistema FGF/FGFR

El FGF-2 es el factor más uniformemente expresado por células de melanoma, desde el comienzo de la displasia, pero no por melanocitos normales [146], además de sus efectos paracrinos descritos sobre la angiogénesis, se considera el factor autocrino más importante para la proliferación y supervivencia de melanoma. Tanto los melanocitos normales como las células de melanoma expresan el FGFR1, pero sólo el melanoma también pueden expresar el FGFR4 [147]. El FGF-1 que también se expresa en varios melanoma [148], puede activar al FGFR1 y contribuir a su estimulación autocrina. [149].

Numerosas evidencias indican que el FGF-2 activa en forma intracrina a su receptor en las células de melanoma [150]. La inactivación intracelular del FGF-2 o el FGFR1 con nucleótidos antisentido o siARN, conduce a una marcada disminución de la proliferación *in vitro* y la pérdida de la capacidad tumorigénica *in vivo* de las células de melanoma [147, 151].

La transfección de melanocitos murinos con el ADNc que codifica para el FGF-2, provoca la sobre-expresión de este factor permitiendo el crecimiento autónomo de estas células en cultivo, pero cuando las mismas son inoculadas en ratones, no se observa la formación de tumores, lo que indicaría que, si bien el FGF-2 incrementa la proliferación y supervivencia de estas células, no resulta suficiente por sí solo para generar un fenotipo tumoral [152].

Melanoma y el sistema VEGF/VEGFR

La expresión de VEGF se incrementa durante la progresión de todos los melanoma, siendo indetectable en los lunares y displasias. En algunos casos se lo detecta en la fase radial, pero invariablemente se expresa durante las fases de crecimiento vertical y la metastásica. Su rol crucial como factor paracrino sobre las células endoteliales durante la angiogénesis fue discutido previamente.

Las células de melanoma se caracterizan por tener aumentada la expresión constitutiva de VEGF, posiblemente como consecuencia de distintas mutaciones en oncogenes y genes supresores, y aparentemente, este incremento basal de VEGF sería mucho más importante que el VEGF inducido por hipoxia durante la angiogénesis

asociada a melanoma [153]. En esta patología, el efecto del VEGF sobre la permeabilidad vascular estaría relacionado con un mayor escape de células hacia los vasos, lo que explicaría en parte la muy alta capacidad metastásica de estos tumores [154].

Por otro lado, se ha reportado una significativa expresión del VEGFR2 en varias líneas de melanoma (incluida las A375 que se utilizaron en este trabajo), lo que permite especular que el VEGF también pueda tener un efecto autocrino sobre la proliferación de estas células [155], aunque este mecanismo no sería significativo, ya que el bloqueo de la expresión de VEGF no afecta su crecimiento *in vitro* [156]. Los mismos autores, en otro trabajo, muestran que el bloqueo en la expresión de VEGF en células de melanoma inoculadas en ratones, si bien retarda la aparición de los tumores, estos finalmente prolifera a una velocidad comparable a los tumores generados por sus células parentales [157]. Ello presumiblemente indica que, en ausencia de VEGF, otros factores de crecimiento pueden sostener la angiogénesis y el crecimiento tumoral en melanoma.

Anticuerpos monoclonales

La biotecnología aplicada al desarrollo de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales (AMs) ha proporcionado, por su especificidad, reproducibilidad y obtención en cantidad ilimitada, una nueva dimensión en la investigación de la proteómica celular, la inmunología y el diagnóstico. El avance de la ingeniería genética permitió la humanización y creación de diversas formas recombinantes para su aplicación terapéutica en muchas enfermedades, entre ellas el cáncer.

Generación de los hibridomas

La generación de los hibridomas se basa en la fusión de linfocitos (obtenidos del bazo de ratones previamente inmunizados con el antígeno), con células derivadas de un mieloma murino adaptadas para crecimiento en cultivo. Una ilustración esquemática del protocolo que usualmente se emplea para la fusión, selección, clonado y cultivo de hibridomas, se muestra en la Figura 7.

Se ha demostrado que no existe exclusión alélica en la expresión de genes de inmunoglobulinas (Igs) cuando se fusionan dos células, pues la información de ambas progenitoras se expresa concomitantemente en las células fusionadas. De esta forma, en la fusión de dos células productoras de Igs, se expresarían todas las posibles combinaciones de ambas cadenas pesadas con ambas cadenas livianas [158]. Por esto, las líneas celulares de mieloma utilizadas en la obtención de hibridomas, deben carecer de la propiedad de secretar Igs propias [159]. En consecuencia, las células híbridas o hibridomas, sólo producen las inmunoglobulinas cuyos genes de Igs fueron aportados por el linfocito activado [160].

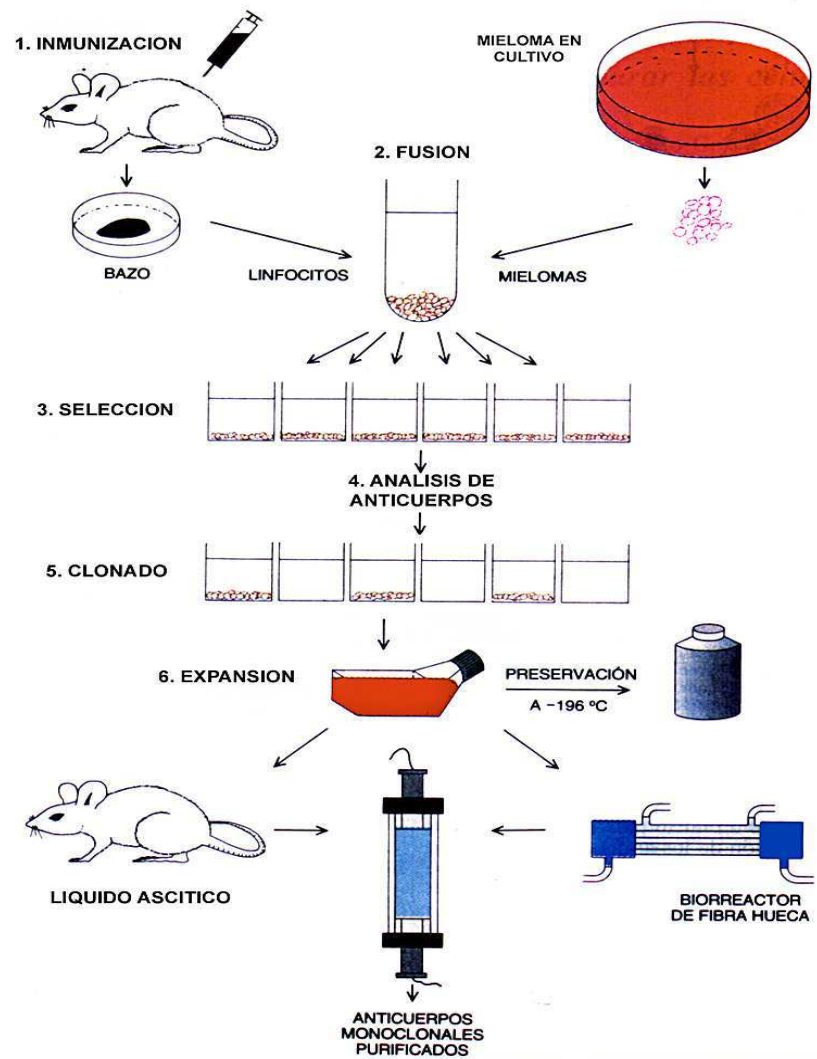


Figura 7: Esquema general de las principales etapas involucradas en la biotecnología de hibridomas productores de AMs.

El agente de fusión más comúnmente utilizado es el polietilen-glicol (PEG, *polyethylene glycol*) [161]. Los medios de cultivo conteniendo hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT, *Hypoxanthine Aminopterin Thymidine*) son empleados rutinariamente para la selección de hibridomas. El fundamento por el cual actúa el medio selectivo para el crecimiento exclusivo de células híbridas, se basa en que: a) las células del bazo (linfocitos), mueren por su imposibilidad de crecer indefinidamente en cultivos *in vitro* y b) las líneas de cultivo de mieloma que son empleadas para la generación de AMs, son mutantes, resistentes al metabolito tóxico 8-azaguanina, porque carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT, *Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl Transferase*). Así, estas células mueren en

presencia de aminopterina, la cual bloquea la ruta principal (o *de novo*) para la síntesis de ADN, debido a que no pueden utilizar la ruta de recuperación de bases [162].

Únicamente las células híbridas, provenientes de la fusión de los linfocitos del bazo (HGPRT⁺), con las células de mieloma (HGPRT⁻), sobrevivirán en presencia de aminopterina; pero necesitan para su crecimiento la presencia de hipoxantina y timidina, utilizadas como sustrato para sintetizar ADN por la ruta de recuperación de bases o vía alternativa.

Luego de la fusión, estas células cultivadas en presencia de HAT, son mezclas de distintos clones, algunos no secretores de inmunoglobulinas (por ser producto de fusión con un linfocito no secretor), otros secretores de anticuerpos que no reconocen el antígeno deseado y finalmente, los que producen anticuerpos que reaccionan en forma específica con el antígeno de interés. Para separar estas distintas estirpes celulares, debe realizarse un paso de clonado que consiste en introducir estadísticamente una célula en cada pocillo de una placa, las cuales al crecer darán una progenie genéticamente igual (clones) y por lo tanto, serán secretores de Igs iguales, denominados a partir de allí anticuerpos monoclonales. Posteriormente se analizan, en los sobrenadantes de cultivo de los pocillos en los que se observan clones, la presencia del anticuerpo específico. El análisis suele consistir en el reconocimiento del antígeno por ELISA. Así se identifican a los clones de interés, que reconocen al antígeno, los cuales son expandidos o criopreservados en nitrógeno líquido para posteriores estudios.

Los AMs como agentes terapéuticos

Desde el descubrimiento y difusión de la tecnología de AMs en la década de 1970 por Köhler y Milstein [163] se han generado un sinnúmero de reactivos que han revolucionado y facilitado diversas áreas de la biología molecular y celular y el diagnóstico clínico. Sin embargo, las promesas que estas moléculas generaron inicialmente como agentes terapéuticos se vieron oscurecidas por la aparición de la respuesta inmune contra estos anticuerpos murinos denominada HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*), con la consiguiente inhibición en la actividad de estos anticuerpos en tratamientos reiterados. Aún así, diversos AMs murinos (o fragmentos de ellos), han resultado de gran utilidad en el diagnóstico *in vivo* por imágenes como así también en ciertos tratamientos agudos, como OKT-3 anti-CD3, para el rechazo agudo del

transplante renal [164] o el ReoProTM, contra una integrina plaquetaria, para el tratamiento de complicaciones en angioplastías [165].

El advenimiento de las técnicas de PCR y el desarrollo de la ingeniería de anticuerpos ha permitido, en los últimos 10 años, la conversión de anticuerpos murinos en drogas no inmunogénicas apropiadas para la terapéutica humana. Dichos procesos incluyen la creación de anticuerpos humanizados, en donde sólo la región determinante de la especificidad denominada CDRs (*Complementarity Determining Regions*) corresponden a secuencias de origen murino (5-10 % de la Ig), anticuerpos quiméricos con regiones variables murinas (~30% de la Ig) y regiones constantes humanas o la “desinmunización” en donde se remueven los epítopes inmunogénicos de las inmunoglobulinas murinas. De esta forma, ya se utilizan en la clínica diversas terapias basadas en AMs humanizados y quiméricos para el tratamiento de varias enfermedades, por ejemplo: a) enfermedades neoplásicas: el RituximabTM anti-CD20 para linfomas B y el HerceptinTM para terapia adyuvante de cáncer de mama; b) Rechazo en trasplantes: ZenapaxTM anti-receptor de IL-2 (anti-Tac) y SimulectTM anti-CD25; c) enfermedades autoinmunes: RemicadeTM anti-TNF α para la enfermedad de Crohn y artritis reumatoidea; y d) tratamiento de enfermedades virales: como el SinagisTM contra una proteína del virus respiratorio sincicial.

Asimismo, la creación de diversas tecnologías, como la bibliotecas combinatoriales de anticuerpos humanos expresados en fagos (*Phage Display*), o ratones transgénicos con los genes de inmunoglobulinas humanas (XenomouseTM), prometen la creación de anticuerpos totalmente humanos contra cualquier antígeno de interés.

Estos desarrollos, junto a novedosos sistemas de producción como transfectomas, células de levadura o animales y plantas transgénicas, han permitido el resurgimiento del interés en la terapéutica basadas en AMs. Estas conforman en la actualidad, el grupo más importante de moléculas derivadas de la biotecnología con más de 200 AMs en ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades tan diversas como cáncer, desordenes autoinmunes y neurológicos, enfermedades dermatológicas, respiratorias, alérgicas e infecciosas, entre otras [166].

Terapias anti-angiogénicas

Las terapias anti-angiogénicas como tratamiento del cáncer son consideradas muy prometedoras, dado que están diseñadas para inhibir la angiogénesis asociada con el desarrollo tumoral reduciendo la proliferación de las células endoteliales normales que irrigan al tumor. Estas no sufren mutaciones, como es el caso de las células neoplásicas, por lo que no generarían la resistencia característica de los quimioterápicos y exhiben un efecto amplificador sobre la muerte de las células tumorales [167].

A comienzos de los 90 cuando varias investigaciones confirmaron la importancia de la angiogénesis en el cáncer [167], se iniciaron las evaluaciones de cientos de agentes anti-angiogénicos. Estos inhibidores corresponden a varias categorías dependiendo de su mecanismo de acción. Algunos bloquean la habilidad de las células endoteliales y tumorales para degradar la matriz extracelular, otros inhiben a las células endoteliales directamente, mientras que un tercer grupo se basa en inhibir alguna etapa de la cascada de señalización de la angiogénesis, mediada por los factores de crecimiento y sus receptores.

Dentro del primer grupo, muchos estudios preclínicos demostraron que las metaloproteasas (MMPs) liberadas por las células endoteliales y cancerosas son críticas para el desarrollo de la angiogénesis, invasión tumoral y metástasis. Los inhibidores de metaloproteasas evaluados tuvieron buenos resultados en ratones pero fracasaron en las investigaciones clínicas [168], y hasta el presente, la FDA no ha aprobado ningún agente de este grupo para el tratamiento del cáncer.

En el segundo grupo, se encuentran todas las moléculas que directamente inhiben el crecimiento de las células endoteliales. Se incluyen agentes desarrollados para atacar a las células endoteliales en división, algunos de ellos son quimioterápicos ya utilizados en cáncer, pero empleados a menores dosis por periodos más extensos, constituyendo la denominada “terapia metronómica”. También hay proteínas y micromoléculas presentes naturalmente, que inhiben la angiogénesis y el crecimiento de tumores en animales. Dentro de esta categoría cabe destacar a la endostatina [169] y la angiostatina [170], las cuales despertaron el interés mundial en la década pasada por los promisorios resultados antitumorales obtenidos en animales [171]. A pesar del entusiasmo que generaron en un comienzo, nunca se pudo demostrar su efectividad en

el tratamiento del cáncer humano. Actualmente, se las evalúan en terapia génica mediante vectores virales.

Otras drogas, como la combretastatina A4, causa que las células endoteliales en crecimiento entren en apoptosis [172]. Otros fármacos están siendo evaluados, incluyendo anticuerpos monoclonales que interactúan con integrinas expresadas en la superficie de células endoteliales en proliferación promoviendo su inhibición, [173] .

La importancia de las terapias anti-angiogénicas en el tratamiento del cáncer humano, ha sido recién validada por la FDA con la aprobación de 3 agentes que bloquean la señalización mediada por VEGF. El primer agente utilizado en la clínica con este fin, es un anticuerpo monoclonal contra el VEGF denominado Bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche). También se han aprobado 2 inhibidores de quinasas, Sorafenib (Nexavar, Bayer) y Sunitinib (Sutent, Pfizer), ambos inhiben la actividad tirosina-quinasa de los receptores del VEGF, principalmente el VEGFR2. Hasta marzo del 2008, Bevacizumab ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de colon metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas y ciertos tumores cerebrales metastásicos, todos en combinación con quimioterapia. Sorafenib y Sunitinib han sido aprobados para el tratamiento del carcinoma renal, un tumor altamente vascularizado. Además, Sunitinib fue aprobado para el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal y Sorafenib para el carcinoma hepatocelular [174-177].

Numerosas investigaciones clínicas están evaluando a estos agentes y derivados de los mismos en otros tipos de tumores y buscando otras funciones para estos inhibidores del VEGF, por ejemplo, para el tratamiento de diversas manifestaciones de la retinopatía diabética [178-180]. Por otro lado, cientos de otros agentes anti-angiogénicos, muchos de ellos también relacionados con la vía de señalización del VEGF, se encuentran en evaluación como monodrogas y/o en combinación con otras drogas, para el tratamiento de prácticamente todos los tumores conocidos y otras patologías que involucran angiogénesis. Para mayor información sobre las investigaciones clínicas en curso con agentes anti-angiogénicos ver: (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/angiogenesis-inhibitors>).

Efectos secundarios y resistencia a las terapias de bloqueo del VEGF

A pesar del convencimiento previo acerca de que los agentes anti-angiogénicos, y en particular los que inhiben la vía del VEGF, no tendrían efectos tóxicos, las investigaciones clínicas han demostrado que presentan efectos secundarios cuando se los administra por vía sistémica [181, 182]. Los principales efectos secundarios asociados al bloqueo del VEGF son la hipertensión, asociada especialmente al bloqueo del VEGFR2, relacionado posiblemente con la reducción de la permeabilidad vascular sistémica. Otra complicación es el aumento en la incidencia de trombosis, aparentemente el VEGF en concentraciones fisiológicas, es necesario para la reparación de microlesiones espontáneas en el endotelio vascular. Cuando se lo neutraliza, dicho efecto no tiene lugar, quedando expuesta la membrana basal y facilitando la adhesión de factores coagulatorios, plaquetas y ésteres de colesterol, con la consecuente formación de un trombo.

Por otro lado, también en contra de lo que se especulaba, se ha observado que el bloqueo del VEGF si bien prolonga la supervivencia de los pacientes tratados al disminuir la velocidad de crecimiento de los tumores, este efecto solo perdura unos meses en la mayoría de los casos, a partir de los cuales el tumor retoma el crecimiento nuevamente, incluso en algunos casos, en una forma más agresiva [183]. Cabe destacar que las terapias de bloqueo del VEGF en humanos, solo han sido ensayadas y aprobadas en los casos de tumores muy avanzados, siempre metastáticos, donde todas las terapias previas no tuvieron efectos.

Actualmente, esta inesperada resistencia a los tratamientos anti-VEGF es motivo de un gran debate en el ambiente académico mundial y muchas teorías se han vertido para encontrar una explicación [184, 185]. Una de las teorías de mayor vigencia, está relacionada con la selección de subpoblaciones de células tumorales más resistentes a la hipoxia, generada por los tratamientos anti-angiogénicos. Estas subpoblaciones serían más agresivas y metastásicas liberando otros factores angiogénicos, que permitirían sostener su crecimiento incluso bajo el bloqueo del VEGF.

Antecedentes del bloqueo del FGF-2 con Anticuerpos

El bloqueo del FGF-2 con anticuerpos monoclonales y policlonales como tratamiento del cáncer se estudia desde hace aproximadamente 20 años en modelos murinos. En esta área se destacan dos trabajos; uno consiste en el estudio sobre el efecto de anticuerpos policlonales, inhibidores *in vitro* de la migración de CE mediada por FGF-2, sobre el crecimiento tumoral inducido por 3 líneas malignas murinas (CT26, EHS, o B16/BL6), implantadas en ratones, no habiéndose obtenido reducción en el crecimiento tumoral [186]. Un segundo trabajo empleando anticuerpos monoclonales, que si bien inhibían *in vitro* la proliferación de CE, no fueron capaces de bloquear el crecimiento tumoral generado por la implantación subcutánea de los mismos hibridomas productores de estos AMs [187]. Un grupo publicó resultados interesantes sobre la inhibición del crecimiento de un glioblastoma humano en ratones atómicos con AMs bloqueantes del FGF-2 inyectados en forma intratumoral [188], pero desafortunadamente por motivos desconocidos no continuó con los estudios.

Estos trabajos en los que el bloqueo del FGF-2 con anticuerpos resultó ineficiente para detener el crecimiento tumoral, junto a la aparición del VEGF como regulador central de la angiogénesis, indujeron al abandono del FGF-2 como blanco de las terapias anti-angiogénicas. Sin embargo, en los últimos años el FGF-2 retomó importancia al confirmarse que el sólo bloqueo del VEGF, no es suficiente para inhibir completamente la angiogénesis tumoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se mencionó anteriormente, la angiogénesis es regulada por muchos factores, entre los que se destacan el VEGF y el FGF-2, en forma individual; el primero conduce a la formación de vasos permeables, inestables y de fácil remodelación, que le confieren al tumor una mayor agresividad y velocidad de crecimiento. El FGF-2, en cambio, genera vasos más estables poco permeables, que conducen a una angiogénesis con vasos maduros que se remodelan lentamente generando un tumor de crecimiento localizado y menos agresivo. Como el VEGF es expresado en distintos niveles por todos los tumores sólidos donde fue estudiado, es lógico pensar que aquellos tumores en los que también se expresa FGF-2, como en los melanoma, la angiogénesis fuera generada en gran parte, por un balance entre ambos factores.

Es posible que el bloqueo del FGF-2 con anticuerpos, que solo ha sido evaluado como monoterapia, no haya tenido efectos terapéuticos, debido a que permitiría al VEGF, ejercer una actividad primordial en la regulación de la angiogénesis. Por ejemplo, en cáncer de mama se ha encontrado que una mayor expresión de FGF-2 se asocia al desarrollo de un tumor menos agresivo y de mejor pronóstico [189]. Por otro lado, el bloqueo del VEGF que si bien disminuye significativamente el crecimiento tumoral, no lo inhibe por completo en la mayoría de los casos. Pensamos que podría ser bajo estas circunstancias donde el bloqueo del VEGF debería ser combinado con el bloqueo de otros factores pro-angiogénicos (como el FGF-2), para lograr una mayor efectividad del tratamiento anti-angiogénico. Sin embargo, el bloqueo combinado de estos dos factores con AMs no ha sido reportado.

Por todo esto, basamos nuestra hipótesis en que el bloqueo de ambos factores podría resultar en una mayor inhibición de la angiogénesis y por consiguiente del crecimiento tumoral. El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar AMs bloqueantes de la actividad angiogénica de dichos factores y evaluarlos en forma combinada sobre el crecimiento de tumores generados por distintas líneas de melanoma humano inyectadas en ratones atímicos.

El segundo objetivo, fue generar versiones recombinantes de cadena simple de estos AMs que pudieran emplearse en terapia génica *in situ*, de manera de aumentar la concentración del AM en el microambiente tumoral, y así mejorar su eficacia y disminuir sus posibles efectos secundarios.

Objetivos Específicos:

- Clonar, expresar y purificar VEGF y FGF-2 humanos de manera que conserven su actividad biológica.
- Generar AMs neutralizantes contra el VEGF y el FGF-2 y seleccionar los de mayor potencia inhibitoria *in vitro* sobre la proliferación de células endoteliales.
- Caracterizar bioquímicamente ambos AMs (Isotipo, afinidad, etc).
- Cuantificar los niveles de VEGF y FGF-2 expresado por las células tumorales a ensayar.
- Desarrollar anticuerpos policlonales anti-FGF-2 y anti-VEGF en conejos, que junto con los monoclonales seleccionados, nos permita formular un ELISA sándwich específico para la cuantificación de cada factor.
- Evaluar la capacidad de estos AMs bloqueantes para inhibir el crecimiento tumoral inducido por 3 líneas de melanoma humanos (A375, IIB-Mel-J y 1205Lu), crecidas en ratones atímicos. Estudiar posibles efectos sinérgicos de la inhibición del crecimiento tumoral al emplear el AM anti-VEGF en forma conjunta con el AM anti-FGF-2. Evaluar si la eficiencia del tratamiento depende de los niveles de expresión de estos factores en las distintas líneas tumorales ensayadas.
- Clonar las regiones variables de ambos AMs (anti-VEGF y anti-bFGF), obtener su secuencia aminoacídica e identificar los CDRs y *Framework*. Generar anticuerpos recombinantes de cadena simple (scFv), neutralizantes de estos factores para su posible utilización en terapia génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de VEGF y FGF-2

El VEGF utilizado en la mayoría de los ensayos, corresponde a la secuencia humana, salvo que se especifique lo contrario. El VEGF empleado en este estudio fue expresado en bacterias a partir de un plásmido pET-15b-VEGF₁₆₃, también se empleó VEGF₁₆₅ proveniente de sobrenadante de cultivo de células HEK-293 transfectadas con el plásmido pEE14-VEGF₁₆₅, ambos contienen la secuencia del gen VEGF-A humano (ambos plásmidos fueron cedidos por el Dr. E. Mesri, Cornell University Medical College, NY, USA). También se evaluaron los factores comerciales VEGF₁₆₅ (R&D Systems), expresado en células de insectos Sf-21; VEGF₁₂₁ (PreProTech, USA), expresado en *E. coli* y VEGF₁₆₄ murino (Sigma, USA), expresado en células de insectos Sf-21.

El FGF-2 fue desarrollado íntegramente en nuestro laboratorio, (ver 1.2). Solo en los ensayos comparativos se utilizó FGF-2 recombinante humano de Invitrogen y Prospec, ambos expresados en *E. coli*.

1.1. Producción de VEGF recombinante

1.1.1. Expresión de VEGF en *E. Coli*.

Se utilizaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) crecidas en medio LB. Las mismas fueron transformadas por el método del TSS [190] (ver 5.1) con el plásmido pET-15b-VEGF₁₆₃. Este plásmido carece de la señal de secreción y utiliza a la metionina en posición +3 del VEGF 165 humano como inicio de la traducción, generando un producto de 163 aminoácidos, la ausencia de estos 2 aminoácidos iniciales así como la falta de glicosilación, dado que es expresado en bacterias, no afecta su actividad biológica ni su estabilidad (comunicación personal del Dr. E. Mesri).

A partir de una colonia positiva, se realizó un cultivo en 10 ml de medio LB-Amp (LB con ampicilina 100 µg/ml), a 37°C en agitación durante la noche. Este inóculo fue adicionado a 1 litro de LB-Amp y se continuó creciendo en agitación a 37°C monitoreando periódicamente su absorbancia a 600 nm (A₆₀₀). Cuando las bacterias

alcanzaron una A_{600} de 1-1,2 unidades, se indujo la expresión de la proteína con el agregado de 1 mM de IPTG (iso-propil tio-galactósido, Sigma) por 120 minutos (min) a 37°C. En estas condiciones la proteína se expresó en forma de cuerpos de inclusión.

1.1.2. Renaturalización a partir de los cuerpos de inclusión

El precipitado bacteriano proveniente de 1 L de medio de cultivo fue lavado por resuspensión, incubación y centrifugación en 40 ml de una solución de sacarosa 20%, 50 mM Tris pH 7,4 y 1 mM EDTA y posteriormente, con 40 ml de agua destilada (H₂O_d) 4°C. Seguidamente, se resuspendió en 40 ml de *buffer* 50 mM Tris pH 8 y 1 mM de EDTA, se sonicó 4 veces por 30 segundos (seg) en hielo y se centrifugó 40 min a 16.000 g. El precipitado fue resuspendido en el mismo *buffer* con el agregado NP-40 (1% v/v final), sonicado en forma similar y centrifugado por 20 min a 12000 g, repitiendo esta operación 2 veces. Los cuerpos de inclusión fueron finalmente resuspendidos mediante 4 ciclos de sonicación en 8 ml de 7 M Guanidina-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM DTT y 50 mM Tris pH 8, centrifugados a 18.000 g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante fue diluido 10 veces por goteo de un *buffer* de renaturalización (0,5 M L-arginina, 50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl y 2 mM glutatión reducido y 1 mM glutatión oxidado), durante toda la noche a 4°C en agitación. Por último, se diluyó 5 veces en 50 mM Tris pH 7,4 y se mantuvo la solución en agitación a 4°C durante 1 h.

1.1.3. Purificación por columna de afinidad

La solución conteniendo la proteína renaturalizada fue centrifugada a 4°C durante 45 min a 18.000 g y el sobrenadante filtrado (0,45 µm, Millipore). Para el proceso de purificación se empleo un equipo de purificación de proteínas ÄktaPrime (GE Helthcare Life Sciences). Se utilizaron las siguientes soluciones; *buffer* A (25 mM Tris pH 7,4) y *buffer* B (25 mM Tris pH 7,4, 1 M NaCl). La columna *Hi-Trap Heparin-Sepharose* (GE Helthcare Life Sciences), fue equilibrada con 5 volúmenes de columna conteniendo 30 % *buffer* B en *buffer* A y se cargó la muestra en la columna a un flujo constante de 1,5 ml/min, se lavó con 35 % de *buffer* B. El VEGF₁₆₃ se eluyó con 60 % de *buffer* B y fue cuantificado por A_{280} (una unidad de absorbancia = 3,125 mg/ml, utilizando una formula teórica que considera la composición aminoacídica de la proteína). La pureza fue determinada por análisis electroforético en gel de

poliacrilamida (*SDS-PAGE*). También, se evaluó la funcionalidad biológica del VEGF₁₆₃ purificado, mediante un ensayo de proliferación de células endoteliales (ver 1.1.5).

1.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Una alícuota (10 µl) de cada fracción eluida de la columna de afinidad fue calentada a 90°C por 5 min, en *buffer* de siembra (50 mM Tris-HCl, pH 6,6, 2% SDS, 10 % glicerol y 0,05% azul de bromofenol), sembrada sobre un gel de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se desarrolló en *buffer* 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8.3 a una corriente constante de 30 mA/gel en una celda de electroforesis (Mini-Protean® II, Bio-Rad). Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250* en 40% metanol, 10% ácido acético en agua, en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó 4 veces con agitación durante 20 min en solución decolorante (40% metanol; 10% ácido acético en agua).

1.1.5. Ensayo de actividad biológica del VEGF

Las células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano denominadas HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) fueron obtenidas y mantenidas como se describe en técnicas generales (ver 5.7.2). Las mismas fueron tripsinizadas, contadas en cámara de *Neubauer* y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2500 células por pocillo en 100 µl de medio M199 conteniendo 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina. A las 2 hs, se agregaron por cuadruplicado 50 µl del mismo medio suplementado con VEGF₁₆₃ o VEGF₁₆₅ (R&D Systems), partiendo de 100 ng/ml con diluciones sucesivas 1:5 y medio sin factores como control negativo. A las 24 hs se adicionó 25 µl por pocillo del mismo medio, conteniendo metil-[³H]-timidina a una concentración final 2,5 µCi/ml, la incubación prosiguió 48 hs adicionales. El ensayo se detuvo por el agregado de 50 µl de cloruro de guanidinio 6M. Las células se lisaron completamente mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. El ADN celular fue recogido en filtros Whatman GFC mediante un cosechador (*Cell Harvester 8*, Nunc), fijado con etanol 96%, secado al aire y la radioactividad incorporada, fue determinada en presencia de 1 ml de solución centelladora (*OptiPhase Hi Fase 3*, *Wallac*

Scintillation Products) en un contador de centelleo líquido (Packard 1600 TR, Canberra Company).

1.2. Producción del FGF-2 recombinante

1.2.1. Obtención del ARN y RT-PCR

El ARN total de 10^7 células HT-29 derivada de un adenocarcinoma de colon humano, se obtuvo utilizando el método de TRIzol (Gibco), según instrucciones del fabricante. Se ha descrito que las HT-29 expresan altos niveles de FGF-2 [191, 192]. La primer cadena de ADN codificante (ADNc) se sintetizó utilizando 5 µg de ARN, 100 nM dNTPs (Invitrogen), transcriptasa reversa y *buffer M-MLV, Reverse Transcriptase* (Promega), junto con *random primers* de 6 nucleótidos (Biodynamics), en un volumen final de 50 µl durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, la amplificación específica del gen del FGF-2 fue obtenida por PCR utilizando 2,5 µl de la reacción anterior, 1 µl PFU y *buffer* (Promega), 250 nM dNTPs (Invitrogen), y los *primers*; -5'atgcaggccgggagcat 3'-(FGFf) y -5'tcagctcttagcagacat 3'-(FGFr). La reacción de PCR consistió en una primera incubación a 94 °C por 4 min seguida de 30 ciclos de 94°C 30 seg, 60°C 30 seg y 72°C 45 seg y una amplificación final de 10 min a 72°C. Por los motivos mencionados en los resultados (ver Resultados, Capítulo 1, Producción de FGF-2), se realizó una segunda reacción de PCR utilizando 2 µl del producto anterior, en las mismas condiciones que la primer PCR, utilizando los *primers*; 5'-atgctagcatatggctgctgtagtattacaacctgccggcgctgcc ggaagatggtgtagtggtgcattcccggggccactcaag-3'- y 5'-tgcaagatctttagctctta gcagacat tgaag-3', los cuales introducen las mutaciones en la región TIR además de agregar los sitios de restricción necesarios para su posterior clonado [193].

1.2.2. Generación del vector de expresión

El producto de PCR fue digerido con enzimas de restricción Nde I y Bgl II (todas las enzimas de restricción utilizadas fueron de *New England Biolabs* y utilizadas con los *buffers* y condiciones descritas por el fabricante). La reacción de ligado se realizó utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* y su *buffer* (Promega), según instrucciones

del fabricante, en el vector de expresión pET-20 (Novagen), previamente linearizado con las enzimas de restricción correspondientes entre los sitios Nde I y BamH I (este último compatible con Bgl II) (Figura 8). De esta manera, se generó un nuevo plásmido al que denominamos pET-20-FGF-2.

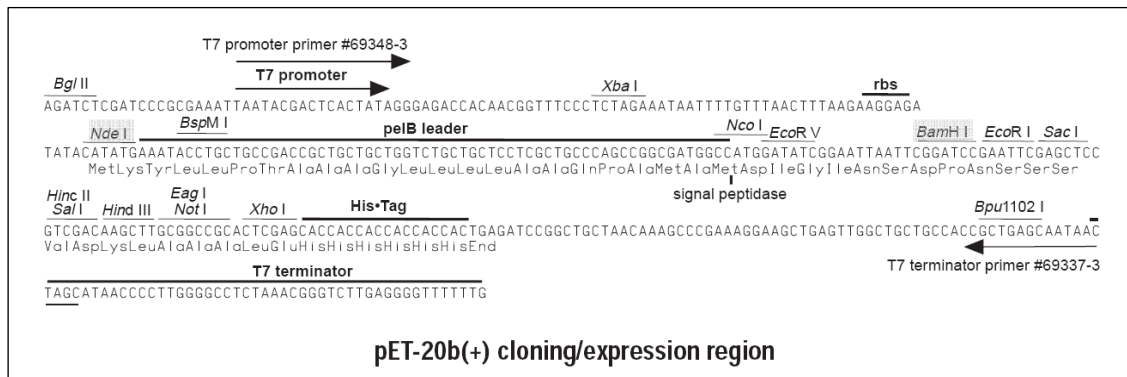


Figura 8. Región de clonado y expresión del plásmido pET-20b. En gris se remarcan las enzimas utilizadas para la inserción del ADNc correspondiente al gen de FGF-2.

Con este vector (pET-20-FGF-2), se transformaron bacterias *E. Coli* DH5 α con el método del TSS (ver 6.1). Luego, se seleccionaron clones positivos por *Colony* PCR (ver 5.5), se purificaron los plásmidos con columnas *Illustra*[®] *plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Helthcare Life Sciences), según instrucciones del fabricante y fueron enviados para su secuenciación (Macrogen Inc. Corea), con el fin de verificar que la secuencia clonada fuese la correcta y carente de mutaciones no deseadas. Posteriormente, se seleccionó un clon con la secuencia correcta y se sub-clonó en bacterias *E. coli* BL21 (DE3), utilizando para la transformación el método TSS (ver 6.1).

1.2.3. Expresión del FGF-2

El vector pET-20-FGF-2 contiene un promotor que es reconocido exclusivamente por la ARN polimerasa T7. Dado que las bacterias *E. coli* BL21 (DE3), contienen en su genoma a la polimerasa T7 bajo el promotor LacUV5 inducible por IPTG, la expresión del FGF-2 es directamente inducida por IPTG. Bacterias *E. coli* BL21 (DE3), conteniendo el vector pET-20-FGF-2 fueron crecidas en 1 L de medio LB-Amp en agitación a 37°C hasta alcanzar una A₆₀₀ en el rango de 1,8–2 unidades. Seguidamente, se agregó 0,1 mM de IPTG durante 16 hs a 28°C. En estas condiciones, gran parte de la proteína recombinante se acumuló en la fracción soluble bacteriana.

1.2.4. Purificación del FGF-2

Las bacterias fueron centrifugadas a 3000 g por 30 min, resuspendidas en 200 ml de PBS y centrifugadas nuevamente en las mismas condiciones. El precipitado fue resuspendido en 40 ml de *buffer* NaCl 500 mM, Tris 50 mM pH 8, sonicadas en hielo a máxima potencia durante 5 ciclos de 20 seg y centrifugadas a 12000 g 30 min. El sobrenadante (40 ml), fue llevado a 100 ml con un *buffer* A (Tris 50 mM pH 8) y filtrado (0,45 μ m). La purificación se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía ÄktaPrime, (GE Helthcare Life Sciences), que permite el monitoreo en tiempo real de la absorbancia a 280 nm, el pH, y la conductividad. Este equipo se conectó a dos *buffers*; un *buffer* A (50 mM de Tris pH 8) y un *buffer* B (50 mM Tris pH 8, 2 M NaCl). Se cargó la muestra con un flujo de 4 ml/min en una columna conteniendo 20 ml de una resina de intercambio catiónico *SP Sepharose Fast Flow* (GE Helthcare Life Sciences), previamente activada con 100 ml de 50% de *buffer* B y equilibrada con 7,5 % de *buffer* B. Una vez cargada la muestra se lavó con 100 ml de 15 % de *buffer* B y se eluyó la proteína de interés con 50 ml de 35 % de *buffer* B. A continuación, se reemplazó la columna por otra conteniendo 20 ml de una resina de afinidad *Heparin Sepharose 6 Fast Flow* (GE Helthcare Life Sciences) equilibrada con 25 % de *buffer* B, se cargó la muestra (50 ml eluidos de la primer columna), a 4 ml/min, se lavó la columna con 100 ml de 40 % *buffer* B y el FGF-2 se eluyó con 50 ml de 100 % *buffer* B. La muestra se dializó contra PBS, se cuantificó la masa del FGF-2 por absorbancia a 280 nm (A_{280}), multiplicando este valor de A_{280} obtenido por el factor 1,15 (obtenido en forma teórica en base a la composición aminoacídica de la proteína), para determinar su concentración en mg/ml. Finalmente, se la esterilizó por filtración (0,22 μ m, Millipore) y se conservaron alícuotas a -80°C .

1.2.5. Determinación de la pureza del FGF

1.2.5a. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La pureza de FGF-2 fue analizada en geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*) no reductoras. Alícuotas de 0,5 y 50 μ g fueron calentadas (90°C 5 min) en *buffer* de siembra (50 mM Tris-HCl, pH 6,6, 2%

SDS, 10 % glicerol y 0,05% azul de bromofenol). La electroforesis y la tinción con *Coomassie Blue* se desarrollaron en forma similar a la descrita en 1.1.4.

1.2.5b. Espectrometría de masa (MALDI-TOF)

Una muestra (100 µg) del FGF-2 purificado fue enviado al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría *MALDI-TOF* (CEQUIBIEM) de la FCEN-UBA. En donde se analizó el espectro de masa de la muestra intacta y de los fragmentos producidos por la digestión con tripsina.

1.2.6. Ensayo de actividad biológica del FGF-2

Las células a ensayar (HUVEC), fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2500 células por pocillo en 100 µl de medio M199 conteniendo 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina. A las 2 hs, se agregaron por cuadruplicado 50 µl del mismo medio en que fueron sembradas con el agregado del FGF-2 desarrollado en el laboratorio, y otros dos comerciales (Invitrogen y Prospec), partiendo de 10 ng/ml con diluciones sucesivas 1:3 y medio sin factores como control negativo. A las 24 hs se adicionó 25 µl por pocillo del mismo medio conteniendo la metil-[³H]-timidina en una concentración final de 2,5 µCi/ml, la incubación continuó durante 48 hs. El ensayo fue detenido y cuantificado en forma similar al descrito en 1.1.5. Utilizando el programa *GraphPad Prism 5* se determinaron las concentraciones que indujeron un 50 % de la estimulación máxima (EC₅₀) y sus errores estándares, estas fueron comparadas por una prueba de ANOVA seguida de *Tukey*.

2. Desarrollo y selección de los anticuerpos

Como se emplearon estrategias similares tanto para la obtención de anticuerpos monoclonales (AMs) contra el VEGF como para la obtención de los AMs contra el FGF-2, estas serán descritas en forma conjunta aunque los resultados se analizan en separadamente (Resultados: Capítulo 2 para los Anticuerpos contra VEGF y Capítulo 3 para los anticuerpos contra FGF-2). Los anticuerpos policlonales, cuyo desarrollo también se describe en esta sección, fueron utilizados en distintos ensayos donde los resultados se describen en el Capítulo 4.

2.1. Inmunizaciones

Debido a que tanto el VEGF como el FGF-2 humanos son proteínas de bajo peso molecular y con alto grado de homología a las propias de los animales que se utilizaron para las inmunizaciones (ratones y conejos), fueron acopladas covalentemente a una proteína *carrier* para incrementar su inmunogenicidad.

2.1.1. Generación de los inmunógenos

El VEGF y el FGF-2 fueron llevados a una concentración de 2 mg/ml, 5 ml de cada solución fue dializada contra agua y conjugados utilizando el sistema *Imject BSA and EDC Conjugation Kits* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos factores fueron conjugados con SABc (seroalbúmina bovina cationizada), en una relación de 10 mg de factores cada 2 mg SABc. Los productos de cada conjugación fueron dializados contra PBS, obteniéndose finalmente 15 ml de cada producto conjugado.

2.1.2. Inmunización de conejos

Con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales de conejo contra cada factor, el producto de cada conjugación fue emulsionado en partes iguales con una solución de Alúmina *Imject® Alu* (Pierce), como adyuvante. Para cada factor, 3 conejos (cepa: Nueva Zelandia), fueron inmunizados con 250 µl de la emulsión en forma de múltiples

inyecciones subcutáneas dorsales. Las inmunizaciones se repitieron 3 veces cada 21 días. A los 6 días posteriores a la última inmunización, se obtuvieron muestras sanguíneas del seno paraorbital de cada conejo. Los sueros procedentes de estas muestras fueron titulados empleando un inmunoensayo enzimático en fase sólida del tipo ELISA directo (ver 5.2.). Dos días después, los 2 animales con mayor título de anticuerpos específicos contra el VEGF y un animal con alto título de anticuerpos contra el FGF-2, fueron sangrados por punción cardiaca, la sangre coagulada, fue centrifugada a 5000 g por 30 min y los sueros conservados a -20°C hasta su utilización. Los conejos, fueron adquiridos y hospedados bajo condiciones controladas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN, UBA).

2.1.3. Obtención de anticuerpos policlonales

Con el objetivo de purificar los anticuerpos policlonales específicos a partir de los sueros de conejos inmunizados contra cada factor, se conjugó 20 mg de cada factor, a 2 ml de agarosa previamente activada *Affi-Gel 10* (Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. Las resinas conjugadas con VEGF o FGF-2 fueron lavadas con PBS y empaquetadas en columnas de 2 ml cada una. La purificación de los anticuerpos policlonales se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía ÄktaPrime (GE Helthcare Life Sciences), conectado a dos soluciones; solución A (PBS) y solución B (glicina 0.1 M pH 2.7). Diez ml de los sueros de conejos fueron diluidos 1:1 en PBS-T (PBS *Tween*-20 0,05% v/v), y cargados en la columna equilibrada con PBS-T, luego se lavó con 10 ml de PBS-T y los anticuerpos se eluyeron con solución B en fracciones de 900 µl, cada fracción fue neutralizada con 100 µl de Tris-HCl 1M pH 8,0. La concentración de proteínas en el eluido se determinó mediante A_{280} , siendo el coeficiente de extinción molar promedio de $1,33 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{280} \times 0,75 = \text{Igs en mg/ml}$). La titulación de los mismos se analizó con un ensayo de ELISA directo (Ver 5.2).

2.2. Desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AMs)

Los AMs anti-VEGF se desarrollaron cronológicamente antes que los AMs anti-FGF-2 por lo que en los ensayos *in vivo* descritos en esta sección solo se evaluaron los AMs anti-VEGF.

2.2.1. Inmunización de ratones

Emulsiones similares a las generadas para la inmunización de conejos (ver 2.1.2) se utilizaron para inmunizar 5 ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad, con cada factor. Los ratones fueron adquiridos y hospedados bajo condiciones controladas en el bioterio del IBYME. La inmunización se realizó durante dos meses mediante inyecciones intraperitoneales (ip) de 50 μ l de cada emulsión cada 20 días (3 inmunizaciones). A los 6 días posteriores a la tercera inmunización, se obtuvieron muestras sanguíneas de la cola de cada ratón. Los sueros procedentes de estas muestras fueron titulados empleando un ELISA directo (ver 5.2.), seleccionándose los 2 animales inmunizados con cada factor que mostraron mayor título de anticuerpos específicos. En los tres días previos a la fusión se inyectaron a los ratones seleccionados, por vía intravenosa (iv), los factores conjugados a SABc en PBS sin adyuvante.

2.2.2. Obtención de esplenocitos murinos

Los esplenocitos fueron obtenidos a partir del bazo de los ratones inmunizados seleccionados. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los bazos extraídos en forma estéril. Los linfocitos fueron aislados mediante la perfusión sucesiva de los bazos con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA), empleando una jeringa de 5 ml y aguja 20G. La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos para decantar los pequeños trozos de tejido y el sobrenadante, conteniendo los esplenocitos, fue lavado dos veces con medio RPMI 1640 con 50 μ g/ml de gentamicina. Se realizó un recuento celular y se evaluó la viabilidad de los linfocitos obtenidos por el método de exclusión con Azul de Tripán (*Trypan Blue*, Sigma). Se aislaron aproximadamente 12×10^7 células por bazo, con una viabilidad promedio >95%.

2.2.3. Células progenitoras de fusión (NS0)

Para la generación de los hibridomas se empleó la líneas celular de mieloma murino NS0 [194] ATCC (*The American Type Culture Collection, USA*). Estas células se caracterizan por no secretar inmunoglobulinas propias y ser mutantes para la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT⁻*), cuya ausencia determina su sensibilidad al medio selectivo (ver Introducción: Generación de los Hibridomas). Dichas células, se fusionan con alta frecuencia y son capaces de crecer a bajas densidades celulares, lo cual las hace de gran utilidad para la generación hibridomas productores de AMs. Esta línea celular fue cultivada *in vitro*, en placas de *Petri* o frascos de cultivo de diversos tamaños (Corning, USA), con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % SFB y 50 µg/m de gentamicina (RPMI completo), incubadas bajo atmósfera gaseada con 5% de CO₂ en aire a 37°C en crecimiento exponencial (repiques cada 48-72 horas realizando diluciones 1:10). Con el objeto de evitar la presencia de células revertantes HGPRT⁺, las células fueron incubadas durante aproximadamente 15 días en el mismo medio suplementado con 8-azaguanina (8-Aza). Este es un metabolito tóxico, análogo de precursores metabólicos de nucleótidos, que es incorporado por las células HGPRT⁺, provocando la muerte de las mismas debido a la imposibilidad de sintetizar ADN. Previo a la fusión, se verificó la ausencia de revertantes de la mutación, evaluando la sensibilidad de las líneas celulares al medio selectivo HAT (*hypoxanthine aminopterin thymidine, Sigma*). Con éste objetivo se sembraron las células de mieloma en placas de cultivo en presencia del medio selectivo. Diariamente, durante una semana, se contó el número de células y se evaluó la viabilidad celular por tinción con azul de Tripán. Como control, se utilizaron células de mieloma mantenidas en medio RPMI completo sin HAT.

2.2.4. Fusión celular

Se empleó la técnica de Kohler y Milstein [163] con diversas modificaciones. Los esplenocitos y las células de mieloma murino fueron lavadas en medio RPMI 1640. En un tubo se mezclaron 10⁸ linfocitos provenientes de los 2 bazos de los ratones inmunizados y 10⁷ células NS0, mantenidas en fase de crecimiento logarítmico. El preparado fue centrifugado durante 7 min a 400 g a temperatura ambiente. El

precipitado celular fue resuspendido agregando durante 1 minuto 0,8 ml del agente de fusión polietilenglicol PEG 1500 (BDH, Inglaterra) al 45% P/V, con agitación suave y continua a 37°C. Con el objeto de diluir el PEG se agregó progresivamente medio RPMI 1640, pH 8,0 precalentado a 37°C utilizando secuencialmente 2 ml, 10 ml y 13 ml durante 2 min, 3 min y 4 min., respectivamente. Luego de centrifugar las células durante 10 min a 400 g, estas se resuspendieron en medio RPMI 1640 conteniendo 20% de SFB, y se sembraron en 4 placas de 96 pocillos en ausencia de células alimentadoras, a una concentración de aproximadamente 2×10^5 células por pocillos. Las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Luego de 24 horas de transcurrida la fusión, se removió un tercio del volumen de sobrenadante de cultivo y se le agregó igual volumen del mismo medio conteniendo el agente selectivo HAT (Sigma). En forma progresiva, se reemplazó el medio de cultivo por tercios con HAT, hasta alcanzar un 100% de este medio selectivo.

Cuando se detectó crecimiento celular (aproximadamente a los 10 días luego de la fusión), se cambió el medio cada 2-3 días. A los 30 días se eliminó la aminopterina del medio HAT y sustituyéndolo por suplemento HT (hypoxanthine thymidine, Sigma) al mismo tiempo que se redujo el SFB al 15%. Finalmente, a partir de los 40-60 días, las células fueron mantenidas en medio RPMI con 10% de SFB y 50 µg/m de gentamicina sin suplementos. Los ensayos, para la detección de hibridomas productores de anticuerpos específicos, fueron realizados por ELISA (ver 2.2.6) a partir de los 30 días de la fusión, cuando los cultivos presentaron más de un 30% de confluencia celular.

2.2.5. Clonados celulares

Cuando los pocillos, conteniendo los productos de la fusión, fueron identificados como positivos en los ensayos de detección de anticuerpos por ELISA (ver 2.2.6), los hibridomas fueron clonados por el método de diluciones limitantes [195]. Para este propósito, las células se diluyeron en medio RPMI, conteniendo SFB al 20%, sembradas en 0,2 ml en 10 placas de 96 pocillos, en un número de 1 y 0,5 células cada por pocillo. Las placas de cultivo fueron mantenidas en incubadora gaseada con 5% de CO₂ en aire a 37°C, realizándose los primeros cambios de medio de cultivo cuando se observó la acidificación del mismo, en función del crecimiento celular. La detección de anticuerpos específicos en los sobrenadantes de cultivo se inició cuando los clones alcanzaron un 30-40% de confluencia.

Las placas, sembradas a 1 y 0,5 células por pocillo, que presentaron menos del 40% de los pozos con crecimiento, según el criterio descrito por Lefrovitz [195], fueron seleccionadas para detectar la presencia de anticuerpos específicos (ver 2.2.6) en las fosas conteniendo clones en crecimiento. Los hibridomas fueron re-clonados empleando la metodología descrita con el objeto de garantizar el origen monoclonal de los anticuerpos secretados, verificándose nuevamente su capacidad de secreción de anticuerpos específicos. Los sobrenadantes seleccionados de los hibridomas doblemente clonados y productores de anticuerpos monoclonales específicos, fueron preliminarmente analizados en un ensayo de proliferación de HUVEC, inducida por VEGF o por FGF-2 según corresponda, para seleccionar aquellos hibridomas productores de anticuerpos neutralizantes de la acción mitogénica de dichos factores sobre las células endoteliales (ver 2.2.7). Los hibridomas pre-seleccionados fueron expandidos en cultivo, sus AMs purificados (ver 2.2.8) y cuantificados para continuar con la selección del mejor AMs bloqueante de la acción mitogénica de cada factor.

2.2.6. Selección de los hibridomas productores de AMs específicos

Los sobrenadantes de los pocillos, donde se observó crecimiento celular durante las distintas etapas de la generación de hibridomas, fueron examinados mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), para detectar la presencia de AMs específicos para VEGF o FGF-2. Para esto, se utilizaron placas de 96 pocillos (*Maxisorp*, Nunc) que fueron sensibilizadas con 100 μ l del VEGF o el FGF-2 purificado, a una concentración de 1 μ g/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con 200 μ l/pocillo de PBS-T (PBS Tween 0,05% v/v) y fueron bloqueados con PBS-L (PBS Leche 1% p/v) durante 1 h a 37°C. Luego de lavar los pocillos 3 veces con PBS-T, se incubaron por duplicado durante 1 h a 37°C con 100 μ l de los diferentes sobrenadantes en estudio. A partir de este paso el ELISA se desarrolló como se describe en técnicas generales (ver 5.2).

2.2.7. Ensayo de los sobrenadantes sobre la proliferación de HUVEC

Las células a ensayar (HUVEC), fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2500 células por pocillo en 50 µl de medio M199 conteniendo 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina (M199 completo). A las 2 hs, se agregaron por cuadruplicado 100 µl por pocillo una solución conteniendo: 50 µl de cada sobrenadante a evaluar o RPMI completo como control junto con 50 µl de VEGF (30 ng/ml, 3X) o de FGF-2 (6 ng/ml, 3X) en M199 completo, previamente preincubados 45 min a temperatura ambiente (volumen final por pocillo 150 µl, concentración final de los factores: 10 ng/ml de VEGF y 2 ng/ml de FGF-2). A las 24 hs se adicionó 25 µl por pocillo del mismo medio conteniendo la metil-[³H]-timidina a una concentración final 2,5 µCi/ml, durante 48 hs adicionales. El ensayo se detuvo por el agregado de 50 µl de cloruro de guanidinio 6M y fue cuantificado como se describió previamente (1.1.5).

2.2.8. Purificación de los AMs a partir de los sobrenadantes

Los hibridomas preseleccionados, 5 contra el VEGF y 8 contra el FGF-2, fueron expandidos en cultivo en placas P100 y cultivados en medio RPMI 1640 con 5 % de SFB el que previamente fue privado de inmunoglobulinas bovinas (ver 5.4). Se tomaron 20 ml de sobrenadante de cada hibridoma, centrifugados a 1000 g por 10 min, filtrados (0.45 µm, Millipore) y diluidos al medio en la solución A (20 mM fosfato de sodio pH 7,1). Cuarenta ml de esta solución fueron cargados en una columna de afinidad de 1 ml de Sepharosa-proteína G HiTrap (GE Helthcare Life Sciences), equilibrada con 5 volúmenes del *buffer A*, utilizando un sistema de cromatografía líquida de baja presión ÄktaPrime (GE Helthcare Life Sciences). La columna fue lavada con 5 ml del mismo *buffer* y los AMs fueron eluidos, en purificaciones individuales, con un solución B (0.1M glicina-HCl pH 2,7) en fracciones de 900 µl en tubos conteniendo 100 µl *buffer* 1M Tris-HCl pH 8 para neutralizar la acidez del eluido. Las fracciones que contenían AMs, generalmente los tubos 3-5, fueron unificadas y dializadas exhaustivamente contra PBS, se estimó su pureza por *SDS-PAGE* y se calculó la concentración de anticuerpos por A₂₈₀ utilizando el valor de absorción de 0,75 mg de Igs por unidad de absorbancia. Todos los AMs fueron ajustados a una

concentración de 200 µg/ml en PBS. Posteriormente, cada solución fue esterilizada por filtración (con filtros de 0,22 µm, Millipore) y almacenadas a 4°C en fracciones de 1 ml.

2.2.9. Titulación del efecto inhibitorio de los AMs.

Una vez purificados y cuantificados los AMs anti-VEGF o anti-FGF-2, obtenidos a partir de los hibridomas pre-seleccionados por la capacidad inhibitoria específica de sus sobrenadantes, se tituló la concentración necesaria para inhibir el 50 % (IC₅₀) de la proliferación de las HUVEC. Para ello, empleamos un ensayo de proliferación similar al realizado con los sobrenadantes (ver 2.2.7), en donde los sobrenadantes fueron remplazados por distintas concentraciones conocidas, en diluciones seriadas, del AM a ensayar en 50 µl de medio M199 completo o 50 µl de medio solo como control, junto con 50 µl del mismo medio conteniendo VEGF (30 ng/ml, 3X) o FGF-2 (6ng/ml, 3X) en función del AM a evaluar. El ensayo fue finalizado y cuantificado de igual forma que el descrito previamente (ver 1.1.5). Utilizando el programa *GraphPad Prism 5*, se calculó la concentración que provoca un 50 % de inhibición en la proliferación (IC₅₀) para cada AM y los AMs con menor IC₅₀, fueron seleccionados.

2.3. Caracterización bioquímica de los AMs

2.3.1. Ensayos de *Western-blot*

2.3.1a. Reconocimiento del VEGF₁₆₅ humano

Las células HEK-293 (ver 5.7.5) fueron transfectadas con un plásmido pEE14-VEGF₁₆₅ que induce la expresión de VEGF₁₆₅ humano o con un plásmido control en forma similar a la descrita en la sección 4.5. Los sobrenadantes de cultivos de dichas transfecciones (15 µl por calle) fueron calentados 5 min a 90°C en *buffer* de siembra (50 mM Tris-HCl, pH 6,6, 2% SDS, 10 % glicerol y 0,05% azul de bromofenol), y sembrados en un gel de poliacrilamida al 10%, (*SDS-PAGE*) en condiciones no reductoras. La electroforesis se desarrolló durante 70 min en *buffer* 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8.3 a una corriente constante de 30 mA/gel en una celda de

electroforesis *Mini-Protean® II* (Bio-Rad). Posteriormente, el gel fue equilibrado en *buffer* de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 150 mM glicina; 20% (v/v) metanol) durante 15 min y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa *Hybond* (GE Helthcare Life Sciences) a 100 V, durante 1 h a 4°C en una celda de transferencia electroforética *Mini-Trans-Blot* (Bio-Rad). Las proteínas transferidas, fueron teñidas en una solución con 0,2 % de rojo *Ponceau* en 0,5% de ácido acético en H₂O para visualizar las proteínas totales y constatar la eficacia de la transferencia en todos los carriles. Las membranas fueron bloqueadas con una solución conteniendo 5% p/v de leche descremada en polvo (Molico) en PBS durante toda la noche a 4°C, lavadas 3 veces con PBS-T, e incubadas durante 1 h con 1 µg/ml del anticuerpo correspondiente (P4F7, P1G4, P1E10, P2H3 y P5D9), en PBS-L. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-T y la detección se llevó a cabo incubándolas durante 1 h con anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa 1 µg/ml (producido por el Dr. L. Bussmann, IBYME), en PBS-L a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas un minuto con una solución quimioluminiscente sustrato de la peroxidasa (ECL™, GE Helthcare Life Sciences). El resultado se visualizó por autorradiografía de la reacción de quimioluminiscencia.

2.3.1b. Reconocimiento de los VEGF₁₆₃ y VEGF₁₂₁ humanos y el VEGF₁₆₄ murino

El VEGF₁₆₃ recombinante humano producido en el laboratorio (5 ng/calle), el VEGF₁₆₄ murino (50 ng/calle, Sigma), y el VEGF₁₂₁ humano (10 ng/calle, PreProTech), fueron sembrados en un volumen de 10 µl alternadamente (5 calles cada uno), en un gel de poliacrilamida al 10%, (*SDS-PAGE*) en condiciones no reductoras. La electroforesis y transferencia se desarrollaron en forma similar a la descrita en la sección anterior (ver 2.3.1a). Las membranas fueron bloqueadas con PBS-L durante toda la noche a 4°C, e incubadas durante 1 h con 1 µg/ml de cada uno de los 5 AMs correspondientes en PBS-L y un anticuerpo no relacionado como control negativo (3B6). Finalmente, se reveló la presencia de los distintos VEGFs de igual manera que en el ensayo anterior (ver 2.3.1a).

2.3.1c. Reconocimiento del FGF-2 humanos

El FGF-2 recombinante humano desarrollado en el laboratorio fue calentado (90°C, 5 min) en *buffer* de siembra (50 mM Tris-HCl, pH 6,6, 2% SDS, 10 % glicerol y 0,05% azul de bromofenol), y sembrados en un gel de poliacrilamida al 12%, (*SDS-PAGE*), en 4 repeticiones de 5, 20 y 50 ng/calle. El ensayo de *Western-Blot* se desarrolló en forma similar a la descrita en la sección 2.3.1a, utilizando los AMs anti-FGF-2 (DB3, DA2 y CC12), en lugar de los anti-VEGF como primer anticuerpo y revelado de manera similar.

2.3.2. Titulación por ELISA

El ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) se desarrolló con el objetivo principal de caracterizar y titular los AMs que reaccionan específicamente con el VEGF o el FGF-2. En esta sección únicamente se describen los materiales y procedimientos utilizados en la titulación de los AMs purificados.

Se utilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc), que fueron sensibilizadas con 100 µl del VEGF₁₆₃ (200 ng/ml), o del FGF-2 (500 ng/ml), en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-T y se bloquearon con PBS-L durante 1 h a 37°C. Luego de lavar nuevamente los pocillos 3 veces con PBS-T, se incubaron por 1 h a 37°C con los diferentes AMs por duplicado, en diluciones seriadas 1:5 en PBS-L, partiendo de una concentración de 10µg/ml, junto a un control sin AMs. El ensayo se finalizó como se describe en 5.2. La concentración óptima de VEGF o FGF-2 para el sensibilizado de la placa en este ensayo, fue establecida con un ELISA en placas sensibilizadas con diluciones seriadas del VEGF₁₆₃ o del FGF-2 purificados, con concentraciones de 5000 ng/ml hasta 10 ng/ml, e incubadas con el AM correspondiente, las reacciones se detuvieron de igual manera que en el ensayo anterior, determinándose que 200 ng/ml de VEGF y 500 ng/ml de FGF-2 resultaron adecuadas para alcanzar el 50% de absorbancia máxima (A_{450}) en las condiciones ensayadas (datos no mostrados).

2.3.3. Determinación de los isotipos por ELISA

Los isotipos de los AMs se determinaron por un ensayo de ELISA con un kit de Bio-Rad según instrucciones del fabricante. La placa se sensibilizó con VEGF o FGF-2 como fue descrito anteriormente. Cada uno de los AMs a monitorear fue incubado en 16 pocillos a una concentración de 1 µg/ml, en un volumen de 100 µl por pocillo, por 1 h a 37°C y lavadas 3 veces con PBS-T. Luego se incubó por 1 h a 37°C con 1 µg/ml de distintos anticuerpos específicos para cada isotipo: dos anticuerpos para determinación de cadena liviana (específico para λ o κ) y 6 anticuerpos para determinar la cadena pesada (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA). Estos anticuerpos fueron incubados por duplicado con cada uno de los AMs en estudio en un volumen de 50 µl/pocillo. Posteriormente, se lavó con PBS-T y se incubó 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidada (cedido por el Dr. L. Bussmann, IBYME). Por último se lavó y reveló de igual forma que en el ELISA directo (ver 5.2.).

2.3.4. Determinación de la afinidad de los AMs por ELISA de competencia

2.3.4a. ELISA de competencia

Los AMs se incubaron, en una concentración de 20 ng/ml (267 pM considerando 2 sitios de unión al antígeno por anticuerpo), por duplicado durante 2 hs a 37°C, con diluciones seriadas de VEGF₁₆₃ (peso molecular por monómero 18.997 Da) o FGF-2 (17.200 Da), partiendo de 200 ng/ml (10.526 pM para el VEGF y 11.628 pM para el FGF-2), y controles sin AM y/o sin antígeno. El AM libre fue cuantificado incubando estas mezclas durante 30 min a 25°C en una placa previamente sensibilizada con 100 µl VEGF o FGF-2 (1 µg/ml), y reveladas de forma similar al ELISA directo (ver 5.2.).

2.3.4b. Cálculo de la afinidad

A partir del ELISA anterior y empleando concentraciones molares, se calculó la fracción de AM libre (f) como A/A_{MAX} , donde A es la absorbancia en ese valor y A_{MAX} es la absorbancia máxima (control sin el agregado de antígeno competidor). Se graficó la fracción de AM unido ($1-f$) en función de la concentración de antígeno. Utilizando el

programa *GraphPad Prism 5*, se generó una regresión no lineal ajustando a una función sigmoidea que permitió calcular la concentración de antígeno que induce un 50 % de la absorbancia máxima (C_{50}).

La afinidad se calculó a partir de este único valor utilizando la ecuación descrita por Stephen Seligman [196] para el análisis de afinidad de AMs por ELISA:

$$K_d = a_0 \cdot (1 - f) / f - i_0 \cdot (1 - f)$$

Donde: K_d es la constante de disociación en equilibrio, a_0 la concentración de antígeno en ese valor, i_0 la concentración de AM inicial y f la fracción de AM libre. Se utilizó además la corrección de Stevens [197], que considera la naturaleza bivalente de los anticuerpos, utilizando un valor de f de 0,707 (raíz cuadrada de 0,5) para el C_{50} , en lugar del 0,5 utilizado para anticuerpos monovalentes. Para el cálculo de cada K_d y su Error Estándar se realizaron 3 ensayos de ELISA de competencia independientes.

2.3.5. Afinidad de los AMs anti-VEGF por sistema BIAcore®

Dado que el ELISA de competencia solo permite calcular afinidades del orden nM [196], y debido a que los AMs anti-VEGF seleccionados mostraron con la técnica mencionada afinidades del orden pM, se decidió estudiar la afinidad de estos AMs (solo los anti-VEGF), por el sistema BIAcore. El sistema BIAcore® permite el análisis cuantitativo de interacciones moleculares en tiempo real, por lo que hace posible determinaciones de constantes de asociación y disociación. Utiliza el principio de resonancia de plasmón en superficie, un fenómeno mecánico cuántico que detecta cambios en las propiedades ópticas de una superficie delgada de oro sobre un soporte de vidrio (superficie sensora) donde la resonancia ocurre a un ángulo específico de luz incidente. El ángulo de resonancia depende del índice de refractancia en las vecindades de la superficie metálica y es monitoreado continuamente, permitiendo seguir en tiempo real la asociación y disociación de las moléculas a la superficie sensora. Este sistema evita el marcado de los componentes. La superficie sensora lleva una matriz de dextrano sobre la cual uno de los reactivos es unido directamente o a través de un intermediario (en nuestro caso se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón para fijar los AMs anti-VEGF seleccionados), mientras que el otro reactivo (el VEGF en nuestro sistema), es

introducido mediante un flujo sobre la superficie. Este análisis fue realizado por el Dr. Johan Hoebeke en Francia (UPR 9021 “*Inmunologie et Chimie Thérapeutiques*” CNRS, 67084 Estrasburgo, Francia).

Se determinó la cinética de asociación y disociación del VEGF para cada uno de los AMs utilizando un programa (BIAevaluation®). Este analiza los sensogramas que reflejan las interacciones entre el antígeno y el AM sobre el chip en la celda de flujo y luego los ajusta a modelos cinéticos para calcular la constante de asociación cinética (k_{ON}) y la constante de disociación cinética (k_{OFF}). De esta forma se calcula la constante de afinidad de un anticuerpo ($K_a = k_{ON} / k_{OFF}$). La Figura 5 muestra un esquema de la cinética de asociación-disociación para un anticuerpo típico, en un sensograma que grafica unidades de resonancia (RU) en función del tiempo.

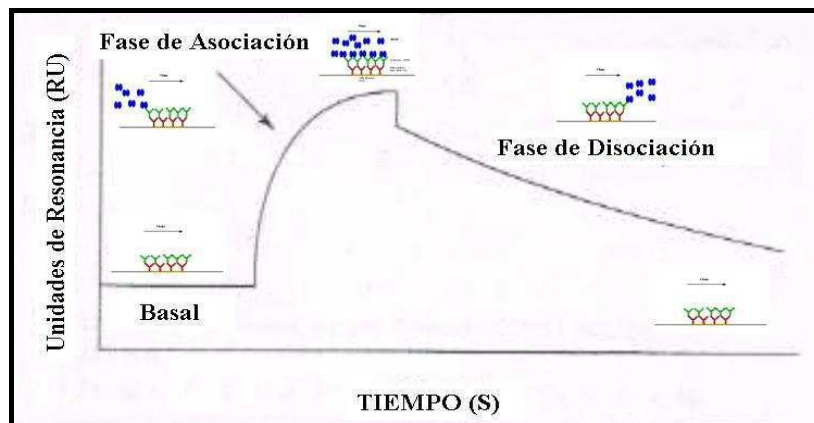


Figura 9. Esquema de un sensograma para un anticuerpo típico por el sistema de BIAcore®. La asociación/disociación del anticuerpo se traduce en un aumento/decrecimiento en la señal de resonancia medida como RU en función del tiempo (s).

2.4. Ensayos in vivo con los AMs (anti-VEGF)

2.4.1. Efecto de los AMs sobre la angiogénesis inducida por líneas tumorales

Ratones atímicos hembras de 2 meses de edad (Swiss *nude*, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata), fueron inoculados con células de melanoma humano IIB-Mel-J (ver 5.7.3), las monocapas de células en cultivo, fueron disgregadas con tripsina, centrifugadas, contadas en cámara de *Neubauer* y resuspendidas a razón de 60×10^6 células/ml en PBS. La inoculación intradérmica (id) con 25 μ l ($1,5 \times 10^6$ células) se realizó en ambos

laterales de 21 ratones atímicos. El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales (ip) de 40 µg de cada AM (anti-VEGF) en 100 µl PBS, los días -1, 2 y 4 post-inoculación sobre 3 ratones para cada grupo. Los animales fueron sacrificados el día 6 para observar la neovascularización inducida por las células tumorales. Se cuantificó la densidad vascular peritumoral en vasos por mm², que fue cuantificada a partir de fotos, de la cara interna de la dermis de los ratones proyectada sobre una pantalla cuadrada, en donde se cuantifica el número de vasos por cuadrante que equivalen a 1 mm² obteniéndose un promedio para cada inóculo. El análisis estadístico consistió en un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey*. Este ensayo fue repetido con las células IIB-Mel-J y HT-29 (ver 5.7.4), una vez que el AM P4F7 fue purificado a partir de líquido ascítico, y analizado de forma similar.

2.4.2. Efecto del AM P4F7 sobre el crecimiento tumoral (IIB-Mel-J y HT-29)

Las células IIB-Mel-J y HT-29 fueron crecidas en placas P100 (100 mm de diámetro) como se describe en 5.7.3 y 5.7.4 respectivamente. Una vez que se alcanzó el número necesario de células, fueron despegadas con tripsina, lavadas en PBS y contadas en cámara de *Neubauer*. Ambas estirpes celulares fueron ajustadas a 75 x 10⁶ células en 1 ml de PBS y 24 ratones atímicos (*nude*, Swiss. Provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata), fueron inoculados en forma subcutánea (sc), en el flanco derecho con 40 µl de cada suspensión celular (IIB-Mel-J y HT-29). Los ratones fueron hospedados bajo condiciones controladas en el bioterio del IBYME donde fueron observados semanalmente para registrar aparición de los tumores. A los dos días cuando los tumores fueron palpables, 21 ratones inoculados con cada estirpe celular (IIB-Mel-J y HT-29) fueron separados al azar en 3 grupos de 7 animales. Los tratamientos consistieron en la administración intraperitoneal (ip) de 100 µg del AM P4F7 en 100 µl de PBS dos veces por semana (tratamiento 100 µg), 10 µg del AM P4F7 (tratamiento 10 µg), o PBS (control). Los mismos días en que se aplicó el tratamiento se valoró el largo (L) y ancho (A) de los tumores para calcular el tamaño tumoral (L x A). Una vez finalizado el experimento los animales fueron sacrificados, los tumores fueron removidos quirúrgicamente, pesados, fijados y procesados para estudios histopatológicos.

2.4.3. Estudios Histopatológicos

Los tumores extraídos fueron fijados con formalina al 10 % en PBS y enviados a la Fundación Diagnóstico Maipú (Libertad 1530, 3er piso - Vicente López, Argentina) en donde fueron coloreados mediante hematoxilina-eosina. El análisis de la histología patológica fue realizado por la Dra. Graciela Fernández Alonso (Directora Científica de la Fundación).

2.5. Comparación de la acción inhibitoria (P4F7 vs.. Avastin)

Las HUVEC en cultivo fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2500 células por pocillo en 100 μ l de medio M199 conteniendo 10% de SFB y 50 μ g/ml de gentamicina. Transcurridas 2 hs, se agregaron por sextuplicado, 50 μ l del mismo medio conteniendo 5 ng/ml del VEGF₁₆₃ preincubado 45 min a temperatura ambiente con diluciones seriadas (1:2) del AM P4F7 o el AM bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche), partiendo de 1000 ng/ml hasta 0.457 ng/ml o en ausencia de anticuerpos como ensayo control. A las 24 hs se adicionó 25 μ l por pocillo del mismo medio, conteniendo metil-[³H]-timidina en una concentración final 2,5 μ Ci/ml, durante 48 hs adicionales. El ensayo se detuvo y cuantificó de forma similar a la ya descrita (ver 1.1.5). Las IC₅₀ (concentraciones que provocan el 50 % de la inhibición de la proliferación), fueron calculadas utilizando el programa *GraphPad Prism 5*, para esto, se aplicó el logaritmo a las concentraciones de los AMs y utilizando un ajuste no lineal el programa calcula el valor de IC₅₀ y su error. Los 2 valores obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante *t-test*.

3. Ensayos en líneas celulares de melanoma humanos

3.1. Efecto del VEGF y el FGF-2 sobre la proliferación

Las células en cultivo de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu (ver 5.7.3) fueron tripsinizadas, contadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2000 células por pocillo en 100 µl de medio DMEM conteniendo 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina, utilizando 32 pocillos para cada línea celular. Luego de 14 hs, cuando todas las células estaban adheridas el medio fue desechado, los pocillos lavados suavemente con PBS, agregándosele 100 µl/pocillo de DMEM con antibiótico en ausencia de suero, este “hambreado” de las células continuó durante 48hs. Posteriormente, el medio fue remplazado por 150 µl de DMEM sin SFB (control -), DMEM con 10% SFB (control +), DMEM con 10 ng/ml de VEGF (tratamiento VEGF) y DMEM con 5 ng/ml de FGF-2 (tratamiento FGF-2), cada tratamiento fue realizado por octuplicado para cada línea celular. A las 24 hs se adicionó 25 µl por pocillo de DMEM conteniendo la metil-[³H]-timidina a una concentración final 0,5 µCi/ml, durante 24 hs adicionales. El ensayo se detuvo y cuantificó de forma similar a la ya descrita (ver 1.1.5). El estudio estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de *Bonferroni* utilizando el programa *GraphPad Prism 5* a partir de 3 repeticiones independientes del mismo ensayo.

3.2. Efecto de los AMs (P4F7 y DB3) sobre la proliferación *in vitro*

Las células de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu (ver 5.7.3), fueron tripsinizadas, contadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1500 células por pocillo en 100 µl de medio DMEM conteniendo 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina, utilizando 30 pocillos para cada línea celular. Luego de 14 hs, cuando las células estaban adheridas, el medio fue desechado, los pocillos lavados suavemente con PBS y se les agrego 100 µl/pocillo de DMEM con antibiótico y sin suero, este “hambreado” continuó durante 24hs. Posteriormente, el medio fue remplazado por 150 µl de DMEM sin SFB (control s/SFB), DMEM con 10% SFB (control c/SFB), DMEM sin SFB y 1 µg/ml del AM P4F7 (tratamiento P4F7 s/SFB), DMEM con 10% SFB y 1

µg/ml del AM P4F7 (tratamiento P4F7 c/SFB), DMEM sin SFB y 1 µg/ml del AM DB3 (tratamiento DB3 s/SFB), o DMEM con 10 % SFB y 1 µg/ml del AM DB3 (tratamiento DB3 c/SFB). A las 24 hs se adicionó 25 µl por pocillo de DMEM conteniendo metil-[³H]-timidina en una concentración final 0,5 µCi/ml, durante 24 hs adicionales. El ensayo se detuvo por el agregado de 50 µl de cloruro de guanidinio 6M. Las células se lisaron completamente mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. El ADN celular fue aislado, procesado y valorado de acuerdo a ensayos anteriores. Cada valor corresponde a un ensayo por quintuplicado para cada línea celular. El estudio estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de *Bonferroni* utilizando el programa *GraphPad Prism 5* a partir de 3 repeticiones independientes del mismo ensayo.

3.3. Expresión de VEGF y FGF-2 por ELISA sándwich

Durante este trabajo se desarrollaron dos ELISA sándwich que permiten la cuantificación del VEGF humano a partir de sobrenadantes de cultivo y de FGF-2 humano a partir de extractos celulares. En estos ensayos se emplearon dos anticuerpos específicos contra cada factor; los anticuerpos policlonales de conejo que se desarrollados contra ellos (ver 2.1.2 y 2.1.3) y los AMs (P4F7 y DB3). El ensayo exhibe un rango de linealidad entre 400-20 pg/ml para el VEGF humano y 4000-200 pg/ml para el FGF-2, y permite cuantificar con alta especificidad todas las isoformas del VEGF-A humano y del FGF-2 humano. Las condiciones del ensayo mencionadas a continuación son el resultado de una minuciosa optimización.

3.3.1. ELISA sándwich para cuantificar VEGF

Las células de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu, fueron crecidas como fuera indicado (ver 5.7.3), en placas de 35 mm hasta una confluencia de 100%, en estas condiciones, el medio fue remplazado por DMEM conteniendo 10% de SFB e incubado durante 12 hs, a continuación el sobrenadante fue retirado y conservado a -20°C para su posterior evaluación y las células separadas de su soporte con tripsina y contadas.

Para el ELISA sándwich se utilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc), que fueron sensibilizadas con 100 μ l del anticuerpo policlonal anti-VEGF (purificado por afinidad), en una concentración de 300 ng/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-T y bloqueados con PBS-L, durante 1 h a 37°C. Luego de lavar los pocillos 3 veces con PBS-T, se incubaron por 3 h a temperatura ambiente (TA) con diferentes sobrenadantes de cultivo diluidos 1:10 en PBS-L por cuadruplicado y un curva control del VEGF en PBS-L, realizada en diluciones seriadas 1:1 conteniendo desde 400 hasta 20 pg/ml del VEGF₁₆₃. Luego, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-T e incubados durante 1 h a TA con 100 μ l/pocillo del AM P4F7 en una concentración de 500 ng/ml en PBS-L. Nuevamente, se lavo la placa 3 veces con PBS-T y fue incubada durante 1 h a TA con 100 μ l/pocillo de PBS-L conteniendo un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (cedidos por el Dr. L. Bussmann, IBYME), diluido 1:5000 junto con una dilución 1:1000 de un suero de conejo no inmunizado. Finalmente, la placa se lavó 3 veces con PBS-T y se reveló con 100 μ l/pocillo del sustrato cromogénico TMB (Sigma). La reacción fue detenida a los 30 min por el agregado de 50 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 2N cuantificándose la absorbancia a 450 nm (A_{450}), en un lector automático de placas de ELISA. La cuantificación del VEGF en los sobrenadantes se realizó extrapolando en la curva control de VEGF, el promedio de absorbancia obtenido para cada muestra utilizando el programa *GraphPad Prism 5*. El estudio estadístico consistió en un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey* a partir de los valores de VEGF obtenidos de 4 placas de cultivo de cada línea celular.

3.3.2. ELISA sándwich para cuantificar FGF-2

Las células de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu, fueron crecidas en placas P100 como se describió previamente (ver 5.7.3) hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %, a continuación, las células fueron tratadas con tripsina, recolectadas y contadas. El precipitado proveniente de 5×10^6 células fue resuspendido en 900 μ l de H₂O_d, lisado por 3 ciclos de congelado y descongelado y llevado a PBS 1X con el agregado de 100 μ l de PBS 10X. Luego, se adicionó DNAsa (Sigma), en una concentración de 10 μ g/ml e incubado 15 min a TA, sonificado por 3 ciclos de 10 s a

máxima potencia, en hielo. Finalmente, fue centrifugado a 12000 g durante 20 min a 4°C y los sobrenadantes conservados a -20 °C hasta su cuantificación.

En el ELISA sándwich, se utilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc), sensibilizadas con 100 µl del anticuerpo policlonal anti-FGF-2 (purificado por afinidad), en una concentración de 500 ng/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-T, fueron bloqueados con PBS-L, durante 1 h a 37°C. Luego de lavar los pocillos 3 veces con PBS-T, se incubaron 2 h a TA con los diferentes extractos celulares diluidos 1:1 en PBS-L, por cuadruplicado incluyendo una curva control del FGF-2 en PBS-L realizado con diluciones seriadas 1:1 en desde 4000 hasta 200 pg/ml del FGF-2. Seguidamente, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron durante 1 h a TA con 100 µl/pocillo del AM DB3 a una concentración de 1 µg/ml en PBS-L. A continuación, el ELISA sándwich se continuó y reveló de igual forma que el del VEGF (ver 3.3.1). La cuantificación del FGF-2 proveniente de los extractos celulares se realizó extrapolando el promedio de absorbancia obtenido de las muestras en la curva control de FGF-2, utilizando el programa *GraphPad Prism 5*. El estudio consistió en un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey* a partir de los valores de FGF-2 obtenidos de 4 placas de cultivo de cada línea celular.

3.4. Expresión del FGF-2 por inmunofluorescencia

Las células de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu, fueron crecidas en placas Labteck® (Nunc) de 8 pocillos (ver 5.7.3), hasta alcanzar una confluencia del 80%. Los pocillos conteniendo las células, fueron lavados con PBS y las células fijadas con formaldehído 3.8% en PBS. La solución de fijación residual fue eliminada por el agregado de glicina 0.02M en PBS, las membranas celulares se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 10 min a TA. Cada etapa fue precedida por 3 lavados con PBS-T. Luego del bloqueo con SAB-PBS (sero-albúmina bovina 5% p/v en PBS), durante 1h a 37°C, las células fueron incubadas con 5 µg/ml del anticuerpo policlonal anti-FGF-2 en SAB-PBS durante 1 h a 37°C. Los anticuerpos primarios unidos, fueron detectados por incubación con un anticuerpo anti-conejo conjugado con el fluoróforo Cy-3 (*Goat polyclonal to Rabbit IgG Cy3[®]*, H&L), diluido 1:200 en SAB-PBS durante 1h a 37°C y lavadas con PBS-T. La fluorescencia se observó en un Microscopio Olympus BX41.

3.5. Ensayos sobre el efecto de los AMs sobre el crecimiento tumoral

Las células de melanoma humano IIB-Mel-J, A375, y 1205Lu fueron crecidas en 4 frascos plásticos T150, para cada línea celular, como fuera descrito (ver 5.7.3). Una vez alcanzado el número necesario de células, fueron colectadas con tripsina, lavadas con PBS y contadas en cámara de *Neubauer*. Las 3 líneas celulares fueron ajustadas a 100×10^6 células en 1 ml de PBS. Dichas líneas, fueron xenotransplantadas en forma sc con 40 μ l de cada suspensión celular, en el flanco derecho de 25 ratones *nude* Swiss (Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata) para cada línea celular. Los animales fueron hospedados bajo condiciones controladas en el bioterio del IBYME y observados semanalmente para registrar la aparición de tumores. A los 6 días, cuando los tumores mostraron un valor promedio de 2 mm x 2 mm (LxA), los ratones fueron separados al azar en 4 grupos de 6 animales, incluyendo los controles. Los animales fueron tratados por vía ip dos veces por semana con 100 μ l de PBS conteniendo 10 μ g del AM P4F7 (tratamiento V), 200 μ g del AM DB3 (tratamiento F), la suma de los 2 tratamientos anteriores (tratamiento FV) o PBS solo (control). El crecimiento de los tumores se fue monitoreado, 3 veces por semana, determinando el largo (L) y ancho (A) en función del tiempo, los valores fueron graficados utilizando el programa *GraphPad Prism 5*. El ensayo con las células 1205Lu se realizó cronológicamente después que el de las otras 2 líneas celulares, con la única diferencia que las mediciones del tamaño tumoral se realizaron 2 veces por semana, en lugar de 3 veces.

Una vez finalizado el experimento, los animales fueron sacrificados, y los tumores se removieron quirúrgicamente, pesados y fijados para los estudios histopatológicos. El estudio estadístico consistió en un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey* comparando los pesos de los tumores entre los distintos tratamientos, con las 3 líneas celulares.

4. Clonado de los Fab y desarrollo del AM recombinante

4.1. Obtención del ARN y RT-PCR

El ARN total de 10^7 células NS0 y de los hibridomas P4F7 y DB3, se obtuvo utilizando el método de TRIzol (Gibco), según instrucciones del fabricante. La primer cadena de ADN codificante (ADNc), se sintetizó utilizando 5 µg del ARN, transcriptasa reversa y su *buffer* (*M-MLV Reverse Transcriptase*, Promega), junto con *random primers* de 6 nucleótidos y 100 nM dNTPs (ambos de Invitrogen), en un volumen final de 50 µl durante 1 hora a 37°C. La amplificación de la región variable junto al dominio CH1 (*heavy chain 1*) de la cadena pesada (Fd) y la cadena liviana κ, que en su conjunto se denomina Fab, se realizó con los ADNc de los 2 hibridomas seleccionados y el de las células NS0 como control. Para ello, se utilizó la metodología y los *primers* para el clonado de inmunoglobulinas murinas descritos en [198, 199] con modificaciones. Esta metodología se basa en la utilización de distintas combinaciones de *primers* en la reacción de PCR para lograr la amplificación diferencial de las cadenas de inmunoglobulinas de interés. Primero se evalúan y seleccionan los *primers* que amplifican un producto del tamaño esperado (550-690 pb), a partir del ADNc de las células del hibridoma de interés, pero no un producto del mismo tamaño a partir del ADNc proveniente de las células NS0. Ello se realizó para las dos cadenas (pesada y liviana) de ambos hibridomas (P4F7 y DB3). Las reacciones de PCR se desarrollaron con los reactivos ya descritos (ver 1.2.1), las combinaciones de *primers* a evaluar, 2,5 µl del producto de la RT, consistiendo de una primer incubación a 94°C por 4 min seguida de 30 ciclos de 94°C 30 seg 56°C 30 seg y 72°C 45 seg y una amplificación final de 10 min a 72°C. En algunos casos, se ensayaron temperaturas de complementariedad (*annealing*) superiores (60 y 62°C). A continuación se detallan los *primers* utilizados.

Primers utilizados para la amplificación de la cadena pesada variable extremo 5' (CPV), de IgG1 de ratón (subrayado se muestra el sitio de restricción Xho 1):

- CPV 1. 5'-AGGT(C/G)(C/A)A(G/A)CT(G/T)CTCGAGTC(T/A)GG-3'
- CPV 2. 5'-AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG-3'
- CPV 3. 5'-AGGTCCAGCTGCTCGAGTCAGG-3'
- CPV 4. 5'-AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG-3'
- CPV 5. 5'-AGGTCCAGCTTCTCGAGTCAGG-3'
- CPV 6. 5'-AGGTCCAACTGCTCGAGTCTGG-3'
- CPV 7. 5'-AGGTCCAACTGCTCGAGTCAGG-3'

CPV 8. 5'-AGGTCCAACTTCTCGAGTCTGG-3'

CPV 9. 5'-AGGTCCAACTTCTCGAGTCAGG-3'

CPV 10. 5'-AGGTCGAACTTCTCGAGTC(T/A)GG-3'

Primers utilizados para la amplificación de la cadena pesada extremo 3', alineada sobre el final del dominio CH1 de las IgG1 de ratón (subrayado se muestra el sitio de restricción *Spe I*):

MHdwFd: 5'-AGGCTTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAATT-3'

Primers utilizados para la amplificación de la cadena liviana variable κ extremo 5' (CLV κ) de ratón (subrayado se muestra el sitio de restricción *Sac I*):

CLV 1. 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA-3'

CLV 2. 5'-CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA-3'

CLV 3. 5'-CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA-3'

CLV 4. 5'-CCAGATGTGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCA-3'

CLV 5. 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA-3'

Primers utilizados para la amplificación de la cadena liviana variable κ extremo 3' (CL κ), complementaria con el final del dominio constante de las CL κ de ratón (subrayado se muestra el sitio de restricción *Xba I*):

MLDWFd-9. 5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA-3'

Los productos de estas reacciones de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1,5 % (ver 5.6), la electroforesis se desarrolló en solución TAE 1X a 100 V durante 30 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/ml) y visualizados en un transiluminador con luz UV. Los productos de PCR que mostraron una amplificación diferencial fueron extraídos del gel utilizando el sistema *MinElute Gel Extraction Kit* (GE Healthcare Life Sciences), según instrucciones del fabricante y reamplificados por PCR en las mismas condiciones en que fueron generados.

4.2. Clonado de los productos amplificados en el vector pComb 3

Una vez obtenidas la cadena liviana y la cadena pesada de ambos AMs (P4F7 y DB3), fueron clonadas en el vector pComb 3 [200]. Para ello, las cadenas pesadas fueron cortadas con las enzimas de restricción *XhoI* y *SpeI* y las cadenas livianas con *SacI* y *XbaI* (*New England Biolabs*), según instrucciones del fabricante. Las cadenas pesadas fueron ligadas en el vector pComb3 entre los sitios de las enzimas de restricción *XhoI* y *NheI*, esta última es una alternativa (a *SpeI*), que permite excluir el

fragmento gIII (que se utiliza para desplegar el Fab en la cápside de fagos), y obtener la fracción Fab soluble (Figura 10). Finalmente, este producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias *E. Coli* (DH5 α), según el método del TSS (ver 5.1).

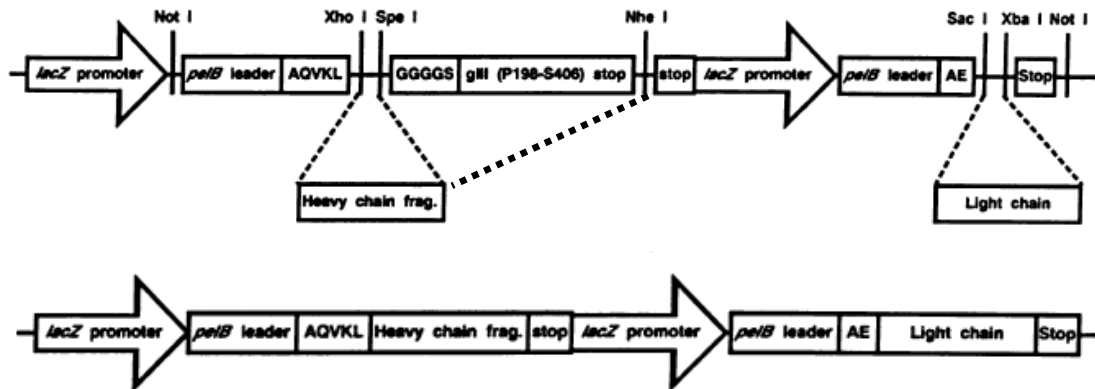


Figura 10. Esquema de la zona de clonado del vector pComb 3 en donde se observan dos sitios de clonado para las dos cadenas de inmunoglobulinas (CL y CP), ambas bajo la regulación del promotor lacZ (inducible por IPTG). También, se muestra las dos posibilidades de clonado de la cadena pesada, incluyendo el fragmento gIII cuando se utiliza la enzima Spe1 o excluyéndola, al emplear la enzima Nhe1 (arriba). Abajo, se muestra el producto final del clonado de ambas cadenas cuando se excluye el fragmento gIII.

4.3. Evaluación de la especificidad de los Fab clonados

Unas 10 colonias transformadas con el pComb 3 portando el Fab derivado del AM DB3 o del AM P4F7 fueron crecidas en medio LB hasta alcanzar una A₆₀₀ de 1 e inducidas toda la noche con 1 mM de IPTG a 30°C. El día siguiente, las bacterias fueron centrifugadas a 12000 g por 15 min y el precipitado sonificado en PBS hasta obtener una lisis completa. El preparado fue centrifugado nuevamente a 12000 g por 15 min y el sobrenadante ensayado mediante un ELISA directo contra FGF-2 o VEGF, según corresponda, en forma similar al descrito en técnicas generales (ver 5.2). De esta manera, se verificó la especificidad de los genes clonados. Se purificó el plásmido de 5 clones positivos para cada AM utilizando el sistema *Illustra*[®] *plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences), según instrucciones del fabricante y se secuenciaron (Macrogen, Corea).

4.4. Desarrollo del Anticuerpo recombinante

Una vez conocidas las secuencias de las CL y CP de ambos anticuerpos se diseñaron *primers* que a través de amplificaciones por PCR de ambas cadenas y posteriores solapamientos utilizando un conector largo que codifica para una secuencia de 18 aa [201], permitieron la obtención de versiones de simple cadena (scFv).

Inicialmente se amplificó por separado las CL de ambos anticuerpos. La reacción de PCR se realizó con los mismos reactivos descritos en (1.2.1), y consistió en una primera incubación a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de 94°C 45 seg, 50°C 45 seg, 72°C 1 min y una amplificación final de 10 min a 72°C, utilizando como templado 5 ng del plásmido pComb 3 (donde fue clonado en forma de Fab el AM P4F7 o el DB3 según corresponda) además de los *primers*:

LUP: 5'-TACTCGCGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACMCAGWCT3'

LDW: 5'-CGCCAGATCCGGGCTTGCCGGATCCAGAGGTGGAGCCTTTGATTT
CCAGCTTKGTSCC-3'

Similarmente, se realizó con la CP utilizando las condiciones descritas de PCR y los *primers*:

HUP1VF: 5'-CGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCCAGGTS
AARCTGCTCGAGTC-3' (para el extremo 5' de la CP del AM P4F7)

HUP2DEG: 5'-CGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCCAGG
TGMARCTGCWSGAGTC-3' (para el extremo 5' de la CP del AM DB3)

HDW: 5'-TACTCGCGGCCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACYGWGG-3'
(el mismo *primer* para el extremo 3' de la CP para ambos AMs)

Los sitios de corte para la enzima de restricción Sfi I que se usarán para el posterior clonado del scFv se encuentran subrayados (*primers* LUP y HDW). Posteriormente, 200 ng de ambos productos de PCR (CL y CP) para cada AM, fueron unidos en una nueva reacción de PCR con el objetivo de solaparlos, esta reacción de PCR consistió en una primera incubación a 94°C por 4 min seguida de 8 ciclos de 94°C 45 seg, 50°C 45 seg, 72°C 1 min. Posteriormente, se agregó a la misma reacción los *primers* externos (LUP y HDW), continuando la reacción de PCR en las mismas condiciones con 25 ciclos adicionales. De esta manera, se obtuvo un producto de aproximadamente 770 pb que corresponde a la versión de cadena simple para cada AM.

Estos fragmentos fueron cortados con la endonucleasa Sfi I (NEB) según instrucciones del fabricante y clonadas en el plásmido pCEFL-Fc. El plásmido pCEFL es derivado del pcDNA3, en donde el promotor de citomegalovirus (CMV), fue remplazado por el promotor del factor de elongación 2 (E2F), y el plásmido pCEFL-Fc fue desarrollado en el laboratorio, sobre el pCEFL que posee dos sitios de clonado Sfi I (GGCCXXXXXGGCC), compatibles con los utilizados en ambos extremos de la construcción del scFv. Estos sitios de restricción son ligeramente distintos en sus 5 bases centrales para ambos extremos, lo que le da direccionalidad al clonado y se encuentran entre una señal de exportación y la porción Fc (CH2+CH3) de una IgG humana. De esta manera, se generaron dos nuevos vectores capaces de expresar y secretar en células de mamíferos, los anticuerpos recombinantes de cadena simple. Estos nuevos plásmidos fueron denominados pCEFL-scVEGF-Fc y pCEFL-scFGF-2-Fc respectivamente, según provengan del AM P4F7 (anti-VEGF), o del AM DB3 (anti-FGF-2).

4.5. Producción y evaluación de la especificidad del scVEGF-Fc

Los plásmidos generados para la expresión de los anticuerpos recombinantes de cadena simple (pCEFL-scVEGF-Fc y pCEFL-scFGF-2-Fc), fueron transfectados en forma transiente en células HEK-293. Las células fueron sembradas en medio MEM sin antibiótico con 10% de suero en placas de 35 mm a una confluencia del 80 %, al día siguiente fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según instrucciones del fabricante, a las 6 hs el medio fue removido y remplazado por el mismo medio con SFB libre de inmunoglobulinas (ver 5.4). A los 4 días de la transfección, los sobrenadantes de ambas transfecciones fueron evaluados por un ELISA directo (ver 5.2) contra el factor correspondiente para verificar si mantenían la capacidad de reconocimiento específico.

4.6. Capacidad bloqueante del anticuerpo recombinante

A partir del resto del sobrenadante de la misma transfección con el vector pCEFL-scVEGF-Fc descrita anteriormente (ver 4.5), el anticuerpo recombinante de cadena simple anti-VEGF (scVEGF-Fc), fue purificado con una columna de proteína G

en forma similar a la purificación de a AMs a partir del sobrenadante de hibridomas (ver 2.2.8) y analizado en un ensayo de proliferación de HUVEC similar al descrito para los AMs (ver 2.2.9).

4.7. Ensayo *in vivo* con células tranfectadas con pCEFL-scVEGF-Fc

Las células IIB-Mel-J fueron sembradas en 16 placas P100 en medio DMEM 10% de SFB sin antibiótico, a las 24 hs, 9 placas fueron transfectadas con el plásmido pCEFL-scVEGF-Fc, 6 placas con el pCEFL-Fc (como control del tratamiento) y 1 placa con el plásmido p-eGFP, plásmido que induce la expresión de proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), que se utilizó como control de la eficiencia de transfección. Todas las transfecciones se realizaron en condiciones similares utilizando 24 µg de plásmido por placa y Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. A las 48 hs todas las células fueron recolectadas, y las provenientes de la placa transfectada con el plásmido pCEFL-eGFP, fueron cuantificadas por citometría de flujo (Servicio de Citometría de Flujo del Laboratorio de Inmunopatología, IBYME), para determinar la eficiencia de la transfección. En concordancia con ensayos preliminares la eficiencia de transfección de estas células resultó del 4%.

Las células transfectadas con el pCEFL-scVEGF-Fc fueron contadas, lavadas, resuspendidas en PBS y 30×10^6 células fueron inoculadas en 10 ratones atímicos (*nude*) en forma subcutánea a razón de 3×10^6 6 células por ratón, a este grupo se lo denominó 4% scVEGF-Fc. Por otro lado, 15×10^6 de células transfectadas con el pCEFL-scVEGF-Fc fueron mezcladas con igual número de células sin transfectar e inoculadas en 10 ratones en forma similar al grupo anterior, a este grupo se lo denominó 2% scVEGF-Fc. De igual manera, las células provenientes de la transfección con el pCEFL-Fc fueron inoculadas en los ratones, a este grupo se lo denominó control 4% Fc. También, se utilizaron células sin transfectar que fueron inoculadas en el grupo denominado control s/transfectar. Los tumores generados por la inoculación de estas células en ratones, fueron monitoreados en función de su tamaño como fue descrito. A los 38 días post-inoculación todos los animales fueron sacrificados y sus tumores extirpados y pesados. El estudio estadístico consistió en un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey* comparando los pesos de los tumores entre los distintos tratamientos.

5. Técnicas Generales

5.1. Método del TSS para la transformación de *E. Coli*.

Para preparar 1 ml de bacterias competentes que permite realizar 10 transformaciones aproximadamente. Las bacterias *E. Coli* (DH5 α o BL21 DE3), se crecieron en 10 ml en LB hasta una A₆₀₀ de 0,4, enfriadas en hielo y centrifugadas. El precipitado se resuspendió en 0,5 ml de LB, agregándosele 0,5 ml del medio TSS 2X bajo agitación suave, y enfriadas 5 min en hielo. Se fraccionaron en alícuotas de 100 μ l por tubo y a cada uno se les agregó el plásmido o el producto de ligación seleccionado para la transformación, en un volumen no mayor a 5 μ l. El preparado se incubó en hielo durante 30 minutos, seguidamente los tubos se transfirieron en un baño a 42°C durante 90 seg y enfriados en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 900 μ l de LB e incubaron en un baño a 37°C durante 1 h. Finalmente, se centrifugaron 5 min, se retiraron de la preparación 900 μ l y se sembró el resto en una placa de Petri con LB-agar conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) en la mayoría de los casos.

5.2. ELISA directo

Esta técnica fue ampliamente utilizada para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales (de conejos y ratones), específicos para VEGF o FGF-2 a partir de diluciones del suero de animales inmunizados, sobrenadantes de cultivo o distintas soluciones conteniendo los anticuerpos purificados. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc), que fueron sensibilizadas con 100 μ l de VEGF o de FGF-2 purificado, en una concentración de 1 μ g/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-T y bloqueados con PBS-L, durante 1 h a 37°C. Luego de lavar los pocillos 3 veces con PBS-T, se incubaron 1 h a 37°C con las diferentes diluciones del suero, sobrenadante o el anticuerpo purificado por duplicado. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron durante 1 h a 37°C con 100 μ l/pocillo con 1 μ g/ml de un anticuerpo de cabra anti-ratón, anti-conejo o anti humano (según correspondiera), conjugado con peroxidasa (cedidos por el Dr. L. Bussmann, IBYME) en PBS-L. Posteriormente, la placa se lavó 3 veces con PBS-T y se

reveló con 100 µl/pocillo del sustrato cromogénico TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine, Sigma). La reacción fue detenida a los 20 min por el agregado de 50 µl/pocillo, de ácido sulfúrico 2N cuantificándose la absorbancia a 450 nm (A_{450}), en un lector automático de placas de ELISA.

5.3. Producción de AMs en ratones

5.3.1. Crecimiento de hibridomas en ratones

Los hibridomas fueron generados a partir de líneas de mieloma y esplenocitos de ratones de la cepa Balb/c, de modo que las células resultantes son compatibles con estos animales, por lo que pueden ser inoculadas en los mismos para ser mantenidas *in vivo*, sin ser rechazadas. El cultivo de hibridomas en la cavidad peritoneal de ratones, en forma de tumores ascíticos, se utiliza tanto como estrategia para la producción de alto título de AMs, como para la obtención de gran cantidad de células híbridas con alto porcentaje de viabilidad.

Se utilizaron 5 ratones BALB/c por hibridoma. Previamente se inyectó por vía ip 0,5 ml pentametilhexadecano (*Pristane*, Sigma) por ratón y entre los 5 y 10 días posteriores se les inoculó vía ip 10^7 células de hibridoma por ratón. Aproximadamente, entre los 10 y 15 días subsiguientes a la inoculación de las células, se observó un aumento del volumen abdominal de los ratones, que permitió la recolección del líquido ascítico. El mismo fue removido mediante punción con aguja hipodérmica 19G realizada en la parte baja del abdomen del ratón. La suspensión fue recogida en tubos cónicos de 15 ml. En cada punción se obtuvo un promedio de 2-4 ml de líquido y se repitió a los 3-4 días luego de lo cual se sacrificó el animal. Para recuperar la solución rica en anticuerpos a partir del líquido ascítico se separaron las células por centrifugación a 200 g durante 5 min. El líquido ascítico fue alicuotado y congelado (-20°C) con el agregado de 0,1% p/v de azida sódica (NaN_3) como conservante, hasta su utilización.

5.3.2. Purificación de los AM a partir de ascitis

Las ascitis obtenidas como se describió previamente fueron descongeladas, filtradas (0.45 μm) y diluidas 3 veces en *buffer* 20 mM fosfato de sodio pH 7,1. Un volumen de 50 ml de esta solución fue cargado en una columna de afinidad *G-sepharosa HiTrap* (GE Helthcare Life Sciences), de 5 ml, equilibrada con 5 volúmenes de *buffer* 20 mM fosfato de sodio pH 7,1, utilizando un sistema de cromatografía líquida de baja presión ÄktaPrime (GE Helthcare Life Sciences), la columna fue lavada con 5 volúmenes del mismo *buffer* y la muestra eluida con un *buffer* 0.1 M glicina-HCl pH 2,7 en fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 100 μl *buffer* 1M Tris pH 9, para neutralizar la acidez del *buffer* de eluido. El equipo utilizado permite seguir todo el proceso y seleccionar las fracciones donde eluye el AM de acuerdo al detector de A_{280} , además del monitoreo de pH, y conductividad, todos los procedimientos fueron realizados a un flujo de 5ml/min.

Las fracciones seleccionadas fueron unificadas y dializadas exhaustivamente contra un volumen 100 veces mayor de PBS, se calculó la concentración de anticuerpos por A_{280} utilizando el valor de absorción de 0,75 mg de Igs por unidad de absorbancia y ajustadas a una concentración de 1mg/ml. La solución fue esterilizada por filtración (0,22 μm) y conservada a 4°C en fracciones de 1 ml.

5.4. Eliminación de inmunoglobulinas del SFB

Se diluyeron 20 ml de suero fetal bovino (Natocor, Argentina), en igual volumen de PBS y se procedió de igual manera que en la purificación de los AM a partir de ascitis (ver 5.3.2.), excepto que en este caso las inmunoglobulinas bovinas, fueron absorbidas por la columna *G-sepharosa HiTrap* (GE Helthcare Life Sciences) de 5 ml y el percolado fue recolectado y esterilizado por filtración. Las Igs fueron eluidas con un *buffer* 0.1M glicina-HCl pH 2,7. De esta manera se obtuvieron 40 ml de SFB diluido 1:1 en PBS libre de Igs bovinas.

5.5. Ensayo de *Colony* PCR

La reacción denominada *Colony* PCR, fue utilizada con el fin de identificar colonias de *E. Coli* que contengan el plásmido con el inserto deseado luego de una transformación de bacterias con el producto de una ligación. Para esto, las colonias seleccionadas son numeradas y repicadas en forma estéril y depositadas en tubos de PCR conteniendo 10 µl de H₂O_d, calentados a 96°C durante 5 min y enfriados en hielo seguido por el agregado de 10 µl de una mezcla 2X de PCR (*HotMaster*[®] *Taq. DNA Polymerase Kit*, Eppendorf), conteniendo todos los reactivos necesarios para la reacción con excepción de los *primers*. Los *primers* (200 nM), utilizados fueron los mismos con los que se generó el inserto de interés. La reacción de PCR consistió en una desnaturalización a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos de 95°C por 30 s, 50-55°C por 30 s, 72°C (1 min/kb), y una elongación final a 72°C por 5 min. Finalizada la reacción de PCR, 10 µl de cada tubo fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5-2 % p/v (ver 5.6).

5.6. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles fueron preparados con agarosa 0,8-2 % p/v de agarosa (*Agarose Routine Use*, Sigma) en una solución de TAE 1X (50 ml), para ello la solución conteniendo la agarosa fue calentada a 90°C hasta la cristalización de la solución y vertida en una cuba de electroforesis (*Mini sub cell*, Bio Rad). Se introdujo un peine de 15 calles y mantuvo a TA hasta su gelificación. Las muestras fueron cargadas con *Buffer* de siembra para ADN (6X: Glicerina 60% (v/v), azul de bromofenol 0.25% p/v), se sembraron 10 µl de muestra en cada calle del gel. La electroforesis se desarrollo a 100 voltios durante 30 min. El gel fue retirado de la cuba e incubado 10 min en agitación con una solución de TAE 1X conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio, lavado con H₂O_d y observada en un transiluminador con luz UV.

5.7. Cultivo celular

Para el mantenimiento de las diversas líneas celulares descritas en este trabajo, se utilizaron técnicas clásicas de cultivo de células en condiciones de esterilidad utilizando una campana de bioseguridad nivel 2 y bajo normas de seguridad biológica [202]. Los medios utilizados fueron adquiridos a Gibco o HyClone[®] (USA), el suero fetal bovino (SFB) de Natocor (Argentina), los materiales de plástico utilizados fueron de Orange Scientific y Corning Life Sciences (USA), insulina (Laboratorio Beta), tripsina, EDTA, ácido ascórbico y gentamicina se adquirieron en Sigma.

5.7.1. Mantenimiento de los hibridomas y las células NS0

Los hibridomas generados fueron cultivados en medio RPMI con 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina y mantenidos en incubadora gaseada con 5% de CO₂ en aire a 37°C, con repiques cada 4-5 días realizando diluciones 1:10 o 1:20. Para ello, las células fueron resuspendidas mediante un golpe en el lateral del frasco de cultivo y mediante el sucesivo flujo de medio, dirigido con pipeta contra la superficie del recipiente y diluidas o criopreservadas.

5.7.2. Mantenimiento de las células HUVEC

Las HUVEC fueron cedidas por la Dra. M. Schattner (Academia Nacional de Medicina), en el repique +2. Las mismas fueron cultivadas entre los repiques +3 y +8 en frascos T75 en medio M199 con 10 % de SFB, 50 µg/ml de gentamicina suplementado con FGF-2 y VEGF en una concentración final de 2 ng/ml y 10 ng/ml respectivamente y mantenidas en incubadora gaseada con 5% de CO₂ en aire a 37°C. Para los repiques las células fueron lavadas con PBS e incubadas 5 minutos a 37°C con 1 ml de una dilución de 0,017 % p/v de tripsina y 0,18 mM de EDTA en PBS, inmediatamente después se les agregó 10 ml del mismo medio para diluir la tripsina, y fueron centrifugadas a 200 g por 5 min, el sobrenadante fue descartado, las células se resuspendieron en el volumen apropiado de medio y fueron contadas en una cámara de *Neubauer* para ser utilizadas en distintos ensayos.

5.7.3. Mantenimiento de células de melanoma

Las células de melanoma IIB-Mel-J [203] fueron cedidas por el Dr J. Mordoh (Instituto de Investigaciones Bioquímicas Luis F. Leloir), mientras que las A375 [204] y las 1205Lu [205], fueron obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*, USA). Se cultivaron en medio DMEM con 10 % SFB, insulina 5 µg/ml, ácido ascórbico 100 µM y gentamicina 50 µg /ml y mantenidos en incubadora gaseada con 5% de CO₂ en aire a 37°C, repicadas cada 3-4 días con el agregado de 1 ml de 0,025% tripsina y 0,53mM de EDTA en PBS durante 5 min a temperatura ambiente, inmediatamente después, se les agregó 10 ml del mismo medio para diluir la tripsina, se centrifugaron a 200 g por 5 min y las células se resuspendieron en el volumen apropiado de medio y se contaron en una cámara de *Neubauer* para ser utilizadas en distintos ensayos.

5.7.4. Mantenimiento de células de adenocarcinoma de colon HT-29

Estas células, obtenidas de la ATCC, fueron cultivados en medio RPMI 1640 con 10 % SFB, gentamicina 50 µg/ml y mantenidas como fuera descrito para las células de melanoma.

5.7.5. Mantenimiento de células HEK-293

Las células HEK-293 fueron obtenidas de la ATCC en el repique 30, se cultivaron en medio MEM con 10 % SFB y gentamicina 50 µg/ml hasta un repique no mayor de 40. Fueron mantenidas con repiques periódicos como fuera descrito para las células HUVEC y utilizadas para la producción de VEGF₁₆₅ y el scVEGF-Fc con alta eficiencia de transfección.

5.7.6. Congelado y descongelado de las células

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en fase logarítmica de crecimiento, con una viabilidad superior al 90%. Las células fueron recolectadas del frasco de cultivo como se describió para cada tipo celular y centrifugadas a 200 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y fueron resuspendidas en una solución de dimetilsulfóxido (*DMSO*) al

10% en SFB, a 4°C. Esta suspensión celular fue ajustada entre $0,5-2 \times 10^6$ células/ml para las células HUVEC y $1-5 \times 10^6$ células/ml para las restantes, previo a la criopreservación. Se empleó el sistema *Mr. Frosty* (Nalgene), que consiste en un recipiente plástico conteniendo isopropanol, que permite un descenso gradual de la temperatura hasta -80°C a razón de ~1°C por min. Al día siguiente los criotubos fueron transferidos desde el freezer de -80°C a un tanque con nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento.

Para el descongelado de las células, los criotubos fueron transferidos rápidamente a un baño a 37°C. Las células fueron inmediatamente diluidas con su correspondiente medio de cultivo, centrifugadas a 200 g por 5 min, resuspendidas en el medio correspondiente y sembradas en frascos de cultivo.

6. Medios y Soluciones

- **Azul de Coomassie:** *Coomassie Brilliant Blue R 250* 0.25% (p/v) en metanol:agua:ácido acético (4:5:1).
- **Bromuro de Etidio (10.000 X):** bromuro de etidio 10mg/ml en H₂O.
- **Buffer de Corrida:** glicina 385mM, Tris Base 50mM, SDS 0.1% (p/v).
- **Buffer de Siembra 6X (ADN):** glicerina 60% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v).
- **Buffer de siembra 6X (Proteínas):** Tris-HCl 480mM pH 6.8, SDS 12% (p/v), glicerol 66%, 1% (p/v) de azul de bromofenol, con o sin β-mercaptoetanol 5% (v/v) dependiendo si se corre en condiciones reductoras o no respectivamente.
- **Buffer de Transferencia:** Glicina 385mM, Tris Base 50mM, metanol 20% (v/v).
- **Buffer del gel de concentración (4X):** Tris-HCl 1M pH 6.8.
- **Buffer del gel de separación (4X):** Tris-HCl 1.5M pH 8.0.
- **DMEM completo:** DMEM (Gibco) suplementado con 10 % SFB y 50 µg/m de gentamicina.
- **EDTA 0.5M pH 8.0:** (250ml) 46.53g de EDTA, 175ml de H₂O, agitar con calor, llevar a pH 8.0 con NaOH 10N, completar volumen con H₂O y autoclavar.
- **IPTG 100mM:** 2.4mg de IPTG (Sigma) en 10 ml de H₂O.
- **LB:** Triptona 1% (p/v), Extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v), glucosa 0.2% (p/v), pH 7.0.
- **LB-Agar:** LB, Agar-Select 1.5% (p/v).
- **LB-Amp:** LB, ampicilina 100 µg/ml.
- **M199 completo:** M199 (Gibco) suplementado con 10 % SFB y 50 µg/m de gentamicina.
- **MEM completo:** MEM RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % SFB y 50 µg/m de gentamicina.
- **PBS:** NaCl 17.4g, Na₂HPO₄ 2.1g y NaH₂PO₄ 0.62g, pH 7.4.
- **PBS-L:** Leche descremada (Molico) 1 % p/v en PBS.
- **PBS-T:** PBS Tween-20 (Sigma) 0,05% v/v
- **Reactivo de Bradford:** *Bio-Rad Protein Assay*, diluido 1/5 en agua.
- **Rojo Ponceau:** Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 1% (v/v) en H₂O

- **RPMI completo:** RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % SFB y 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ de gentamicina.
- **Solución Decolorante:** Metanol 40% y ácido acético glacial 10% (v/v) en H_2O .
- **TAE 50X:** (1L) 242g de Tris Base, 57.1ml de ácido acético glacial, 100 ml de 0.5 M EDTA pH 8.0.
- **TMB:** (3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, Sigma) 1X.
- **Tris-HCl 1M pH 8.0:** (1L) 121g de Tris Base, 700ml H_2O , llevar a pH 8.0 con HCl 5N. Completar volumen con H_2O .
- **TSS 2X (100 ml):** Triptona 0,8 g, extracto de levadura 0,5 g, NaCl 0,5 g, PEG 8000 20 g, DMSO 10 ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M) 10 ml, pH 6,5 y H_2O hasta completar 100 ml.

RESULTADOS

Capítulo 1: Producción de VEGF y FGF-2

Expresión del VEGF

El VEGF utilizado en el trabajo de la presente Tesis, salvo se especifique lo contrario, fue obtenido a partir de cuerpos de inclusión producidos por bacterias *E. Coli* (BL21 λ DE3). Dicho VEGF recombinante contiene 163 aminoácidos (VEGF₁₆₃) y proviene del ADNc del VEGF₁₆₅ humano (ver Materiales y Métodos 1.1).

Una vez expresado y renaturalizado a partir de los cuerpos de inclusión, el VEGF₁₆₃ fue purificado mediante una columna de Sepharosa-heparina, aprovechando la capacidad de esta isoforma de unirse a heparina. En la Figura 11 se observa el análisis electroforético (*SDS-PAGE* no reductor), de las diferentes fracciones eluidas, la última calle corresponde a un control positivo en donde se sembró VEGF₁₆₃ validado con anterioridad. Se combinaron las fracciones 3-6 que fueron dializadas en PBS determinándose su concentración por A₂₈₀. Se obtuvo un rendimiento de 10 mg por litro de cultivo original de bacterias y con una pureza estimada por *SDS-PAGE* del 90%.

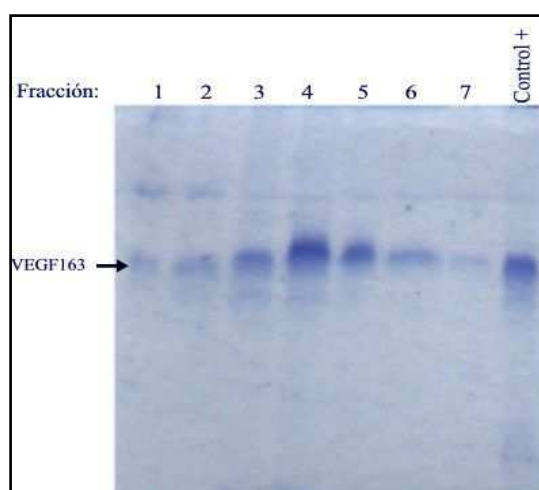


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) de las fracciones eluidas luego de la purificación con la columna de Sepharosa-heparina.

Ensayo de actividad biológica del VEGF

Se verificó la actividad mitogénica del VEGF₁₆₃ por medio de un ensayo de proliferación en HUVEC cuantificado por la incorporación de metil-[³H]-timidina, en donde se utilizó como control VEGF₁₆₅ comercial (R&D Systems). La actividad biológica de ambos factores resultó similar (Figura 12).

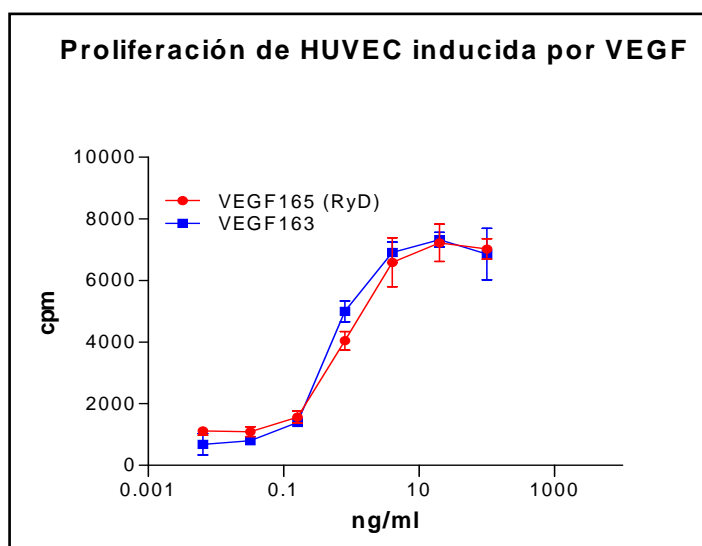


Figura 12. Actividad del VEGF₁₆₃ sobre la proliferación de HUVEC cuantificada por la incorporación de metil-[³H]-timidina. Se evaluaron distintas diluciones del VEGF₁₆₃ producido (azul) y de VEGF₁₆₅ R&D (rojo). Cada valor corresponde al promedio de incorporación de metil-[³H]-timidina en CPM ± Error Estándar (n=4).

Producción de FGF-2

Se ha descrito que la expresión de FGF-2 en *E. Coli*, solo es efectiva cuando su ADNc se encuentra fusionado con otra proteína o péptido en su extremo NH³-terminl. Como uno de los principales objetivos fue su utilización como inmunógeno para la obtención de anticuerpos, se hizo necesario obtener dicho factor en su estado nativo, libre de otras proteínas o péptidos que pudieran inducir una respuesta inmunológica no específica.

Por otro lado, se sabe que la eficiencia de traducción es crítica cuando se expresan genes recombinantes en *E. Coli*. Se ha observado que la región de inicio de la traducción TIR (*translation initiation region*), definida como los primeros 70 codones es importante para la expresión de las proteínas recombinantes. Estructuras secundarias

del ARNm en esta región, causadas por un alto contenido de G+C, limitarían la traducción de la proteína. Además, la “preferencia” de *E. Coli* por determinados codones, también es un factor a tener en cuenta en la expresión de una proteína recombinante. Siendo aún más importante su efecto, si estos codones “no preferidos” por *E. coli*, se encuentran en la región TIR.

Se ha reportado que ciertas mutaciones en esta región favorecen la expresión del FGF-2 en *E. Coli*. Así, se ha determinado una serie de mutaciones en la región TIR que reducen el contenido de G+C, al mismo tiempo que modifican los codones para que se utilicen los “preferidos” por *E. Coli*, sin alterar la secuencia aminoacídica de la proteína de interés [193].

Clonado del FGF-2 humano

Por lo mencionado anteriormente empleamos las mutaciones descritas (ver Materiales y Métodos 1.2.1) sobre el ADN codificante del FGF-2 previamente a su clonado en el plásmido pET-20.

El ADNc modificado fue ligado en el plásmido pET-20 para generar un vector que denominamos pET-20-FGF-2 con el que transformamos *E. Coli* BL21 (DE3), la región codificante de este vector fue secuenciada para confirmar la identidad del producto clonado (Tabla 2).

```

atggctgctggtagtattacaaccctgccggcgctgccggaagatggtagtggtgca
M A A G S I T T L P A L P E D G G S G A
ttcccgcgggccaacttcaaggaccccaagcggctgtactgcaaaaacgggggcttcttc
F P P G H F K D P K R L Y C K N G G F F
ctgcatcccccgcggccgagttgacgggggtccgggagaagagcgcacctcacatc
L R I H P D G R V D G V R E K S D P H I
aagctacaacttcaagcagaagagagaggagttgtgtctatcaaaggagtgtgtgctaac
K L Q L Q A E E R G V V S I K G V C A N
cgttacctggctatgaaggaagatggaagattactggcttctaaatgtgttacgggatgag
R Y L A M K E D G R L L A S K C V T D E
tgtttcttttttgaacgattggaatctaataactacaataacttaccgggtcaaggaaatac
C F F F E R L E S N N Y N T Y R S R K Y
accagttggtatgtggcactgaaacgaactgggcagtataaacttggatccaaaacagga
T S W Y V A L K R T G Q Y K L G S K T G
cctgggcagaaagctataactttttcttccaatgtctgctaagagctaa
P G Q K A I L F L P M S A K S -

```

Tabla 2. Secuencia codificante clonada en el vector pET-20-FGF-2. Las letras minúsculas corresponden a la secuencia nucleotídica, remarcando en negrita los nucleótidos mutados para mejorar la expresión en *E. Coli*. En mayúsculas, se expresa la secuencia de aminoácidos que resultó idéntica con la del FGF-2 humano de bajo peso molecular.

Expresión y purificación de FGF-2

Los procedimientos de expresión, purificación, almacenamiento y ensayo de actividad biológica del FGF-2 recombinante, fueron optimizados y las metodologías resultantes como las más adecuadas son las descritas en Materiales y Métodos (ver 1.2.3-1.2.6). Para su purificación se aprovechó la característica básica (pI: 9,6) de esta proteína empleando una resina de intercambio catiónico y su alta afinidad por heparán-sulfato, utilizando una resina conjugada a heparina. El producto resultante (FGF-2) exhibió una pureza superior al 95% determinada por *SDS-PAGE* y un rendimiento final de 90 mg por litro de cultivo (Figura 13).

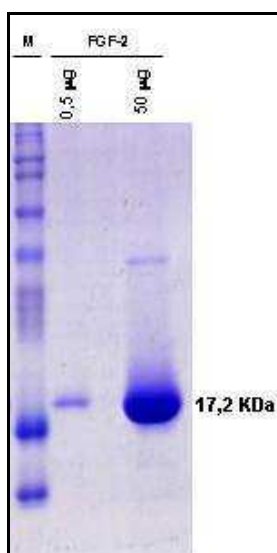
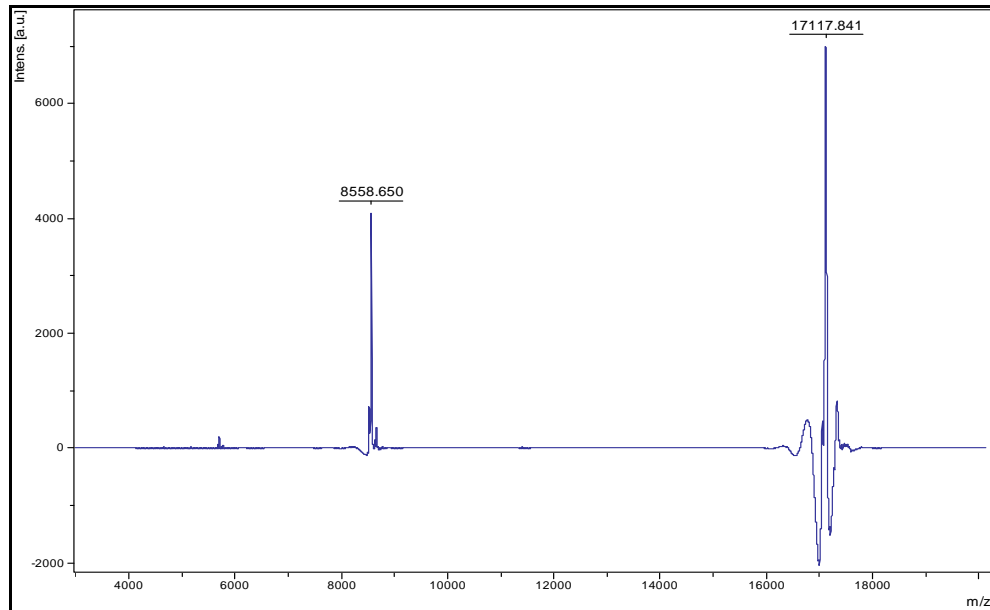


Figura 13. Análisis electroforético (*SDS-PAGE*) del FGF-2 purificado. La primera calle (M) corresponde al marcador de peso molecular (12-225 KDa, *Full-Range Rainbow*, GE), mientras que la segunda y la tercera, corresponden a 0,5 µg y 50 µg del FGF-2 purificado, respectivamente.

Espectrometría de masa del FGF-2

El análisis de de la espectrometría de masa del FGF-2 purificado (Figura 14) indicó que se encontraba puro sin contaminantes detectables siendo su masa molecular de 17,118 Da. Por otro lado, una búsqueda en *Mascot* (www.matrixscience.com), con los fragmentos generados por la digestión con tripsina, permitieron confirmar que se trataba de FGF-2 humano (resultados no mostrados), careciendo de la metionina inicial, característica común en la expresión de proteínas recombinantes en *E. Coli*.

a)



b)

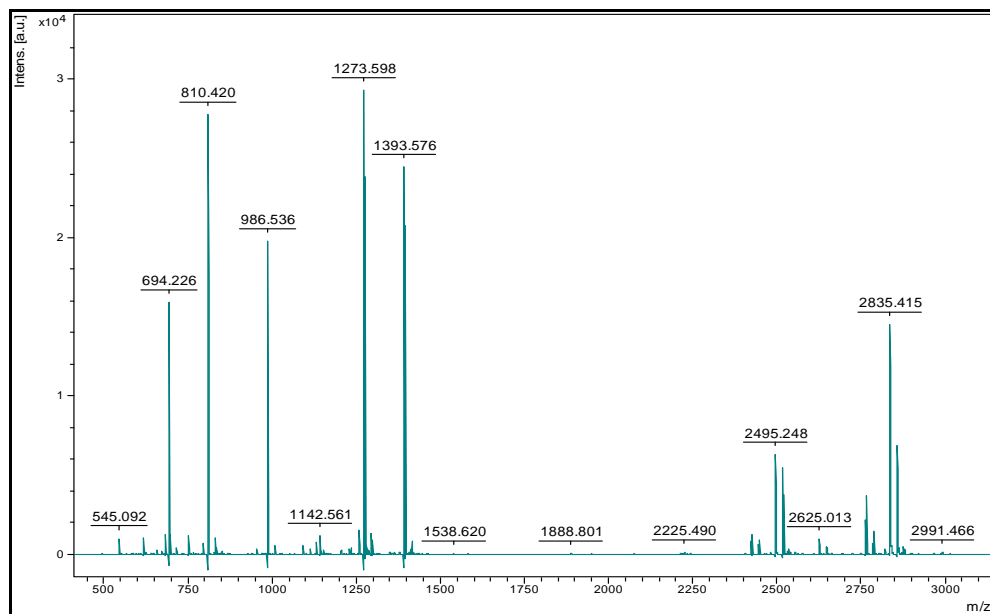


Figura 14. Espectrometría de masa (MALDI-TOF) del FGF-2. A) Espectro del FGF-2 intacto, la banda de mayor peso molecular corresponde al FGF-2 con una ionización +1(m/z), la banda menor es exactamente la mitad y corresponde al mismo FGF-2 con una ionización +2 (m/z). B) Espectro de los distintos fragmentos generados por digestión con tripsina.

Ensayo de actividad biológica del FGF-2

La actividad biológica del FGF-2 producido fue analizada mediante un ensayo *in vitro* sobre la proliferación de HUVEC, cuantificada como incorporación de metil-[³H]-timidina. En el mismo se realizó una curva de proliferación comparando la actividad del

FGF-2 obtenido, con dos FGF-2 comerciales. Utilizando el programa *GraphPad Prism* 5, se determinaron las concentraciones que inducen un 50% de estimulación (EC_{50}), estas fueron comparadas estadísticamente (*Tukey*), determinándose que la actividad biológica del FGF-2 producido, no difería significativamente del FGF-2 de Invitrogen, pero ambos poseen una actividad superior al de Prospec (Figura 15).

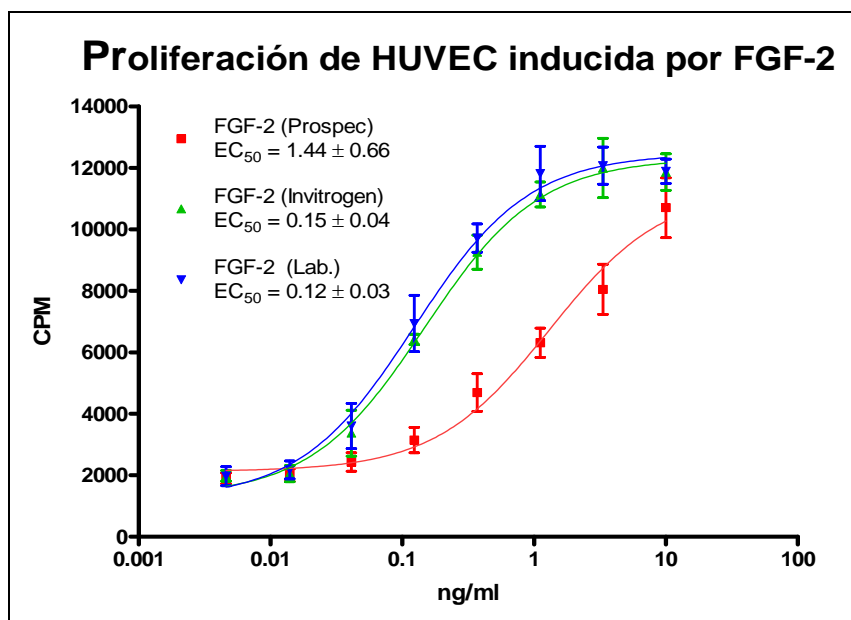


Figura 15. Actividad biológica del FGF-2 sobre la proliferación de HUVEC cuantificada por la incorporación de metil- 3 H]-timidina. Se evaluaron distintas diluciones del FGF-2 producido en el laboratorio (azul) y dos comerciales; Invitrogen (verde) y Prospec (rojo). Utilizando el programa *GraphPad Prism* 5 se realizó una regresión no lineal y se calculó las $EC_{50} \pm$ Error Estándar ($n=4$).

Conclusiones del capítulo 1

En resumen, expresamos y purificamos VEGF humano recombinante con una pureza del 90 %, un rendimiento de 10 mg por litro de LB y con una actividad biológica similar a los comerciales. También logramos clonar y expresar FGF-2 humano en *E. Coli* con un rendimiento final de 90 mg por litro de cultivo, el rendimiento más alto descrito en la bibliografía para un crecimiento en “batch”, con una pureza mayor al 95% y una actividad biológica similar o incluso superior a FGF-2 comerciales.

Capítulo 2: Desarrollo y selección de AMs anti-VEGF

Generación de los hibridomas

Luego de inmunizar a un grupo de ratones Balb/c, los bazos de los dos de ellos, cuyos sueros mostraron mayor título de anticuerpos específicos contra el VEGF determinados por ELISA, fueron extraídos y sus esplenocitos fusionados con las células NS0. A los 25 días post-fusión, los sobrenadantes de 150 pocillos, donde se detectó crecimiento celular, fueron evaluados por ELISA específico contra VEGF (ver Materiales y Métodos 2.2.6), observándose 60 pocillos que mostraron anticuerpos contra el VEGF (datos no mostrados).

Los sobrenadantes de los pocillos positivos fueron evaluados en cuanto a su capacidad de interferir sobre la proliferación de HUVEC estimulada con VEGF o FGF-2, un ejemplo de este tipo de ensayos se muestra en la Figura 16, donde se utilizaron sobrenadantes, que en un ensayo preliminares, habían resultado inhibitorios. De acuerdo con estos datos, se seleccionaron inicialmente 7 hibridomas que mostraban una inhibición de la proliferación mediada por VEGF (denominados P1E10, P1G4, P2H3, P4A7, P4F7, P4G2 y P5D9) y a su vez no inhibían la proliferación mediada por FGF-2, los cuales fueron clonados, expandidos y criopreservados.

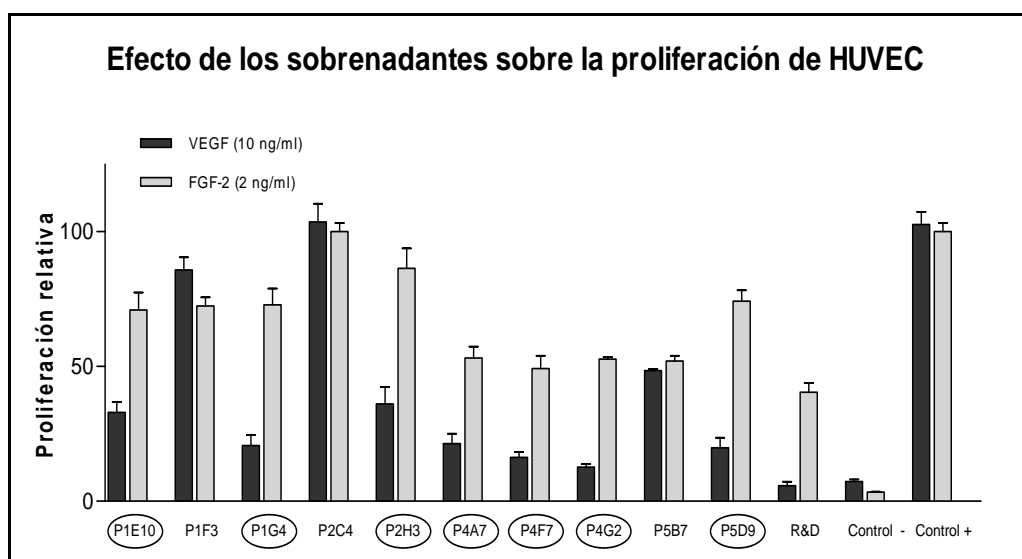


Figura 16. Efecto de sobrenadantes de hibridomas sobre la proliferación de HUVEC estimuladas con FGF-2 (2 ng/ml) o VEGF (10 ng/ml). Como control de inhibición se utilizó un anticuerpo policlonal neutralizante del VEGF (R&D System). Los hibridomas señalados con un óvalo fueron seleccionados. Cada barra corresponde al promedio \pm Error Estándar (n=4).

Una vez clonados y expandidos, se verificó la presencia de AMs específicos en los medios de cultivos de los hibridomas (datos no mostrados), desafortunadamente, 2 de los hibridomas (P4A7 y P4G2), dejaron de secretar anticuerpos. Se purificó por proteína G-Sepharosa los AMs de los 5 hibridomas secretores. Los mismos fueron fraccionados electroforéticamente (*SDS-PAGE*) en un gel 10% de poliacrilamida en condiciones reductoras (Figura 17, parte superior), para su visualización.

Caracterización bioquímica de los AMs contra VEGF

Determinación del isotipo

El estudio de los isotipos (ver Materiales y Métodos 2.3.3), determinó que los 5 AMs poseen cadena liviana del tipo κ (CL κ). La cadena pesada de los AMs P2H3 y P1E10 fueron del tipo γ 2a (CP γ 2a), mientras que P4F7, P5D9 y P1G4 poseen isotipo γ 1 (CP γ 1) (Figura 17, parte inferior).

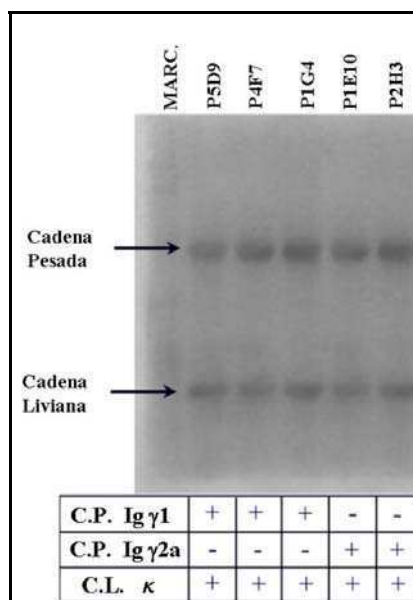


Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) en condiciones reductoras de los AMs purificados (arriba). Resultado del análisis de isotipos mediante ELISA (abajo).

Determinación de la especificidad de los AMs

Ensayo de *Western blot*

La Figura 18 muestra un análisis de los sobrenadantes de cultivo de células HEK-293, transfectadas con el vector pEE14-VEGF₁₆₅ (cedido por el Dr. E. Mesri) que expresa VEGF₁₆₅ (VEGF⁺), o con un vector control (VEGF⁻), fraccionados mediante *SDS-PAGE*, seguido por un ensayo de *Western blot*. Se verificó que todos los AMs purificados reconocen al VEGF₁₆₅ humano en forma específica y a ninguna otra proteína secretada por dichas células, ni presentes en el medio de cultivo. Como control negativo se utilizó un anticuerpo no relacionado.

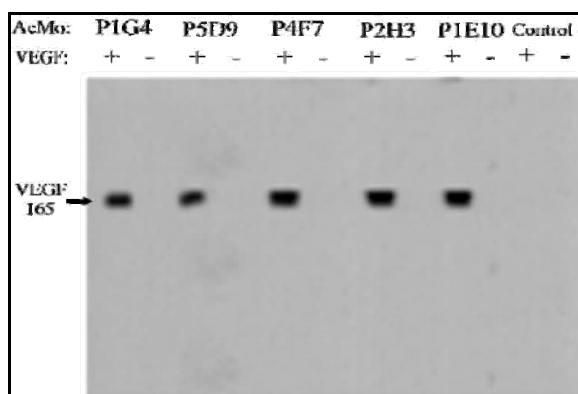


Figura 18. *Western blot* del VEGF₁₆₅ expresado en células HEK-293. Revelado con los 5 AMs anti-VEGF preseleccionados y un AM no relacionado como control negativo.

Asimismo, todos los AMs en estudio, fueron capaces de reconocer con igual eficiencia en ensayos de *Western blot* al VEGF₁₆₃ producido en bacterias en nuestro laboratorio, al VEGF₁₂₁ (PreProTech) y ninguno fue capaz de reconocer el VEGF₁₆₄ murino (datos no mostrados).

Titulación por ELISA

Para determinar la capacidad de los distintos AMs en reconocer el VEGF, se realizó un ensayo de titulación por ELISA. En la Figura 19 se aprecia que todos los AMs exhiben una respuesta dosis-dependiente en el reconocimiento de VEGF₁₆₃. Esta respuesta es similar en todos los casos excepto cuando se la compara con un anticuerpo

contra VEGF comercial (R&D Systems), del cual se requieren concentraciones más altas para obtener la misma señal.

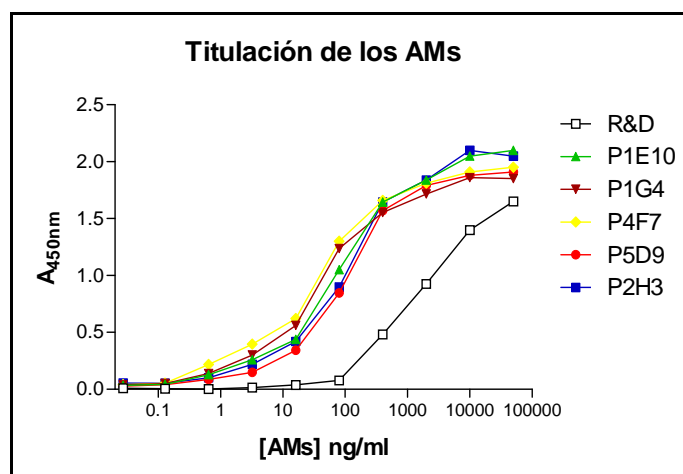


Figura 19. Titulación por ELISA de los AMs purificados y un anticuerpo policlonal anti-VEGF (R&D Systems).

Afinidad de los AMs

Afinidad por ELISA de competencia

Con el fin de establecer si los AMs en estudio poseen características cinéticas que los indiquen como un mejor candidato como anti-angiogénico, se diseñó un procedimiento para analizar la afinidad relativa de los mismos por medio de un ELISA de competencia.

La Figura 20 muestra un ensayo representativo donde se grafica la concentración de anticuerpo unido en función de la concentración de antígeno competidor y sus correspondientes regresiones no lineales. Esta función permitió calcular la concentración de antígeno que indujo el 50% de unión de los AMs con la molécula de interés (C_{50}), valor que posibilita el mínimo error en el cálculo de la afinidad (ver Materiales y Métodos 2.3.4).

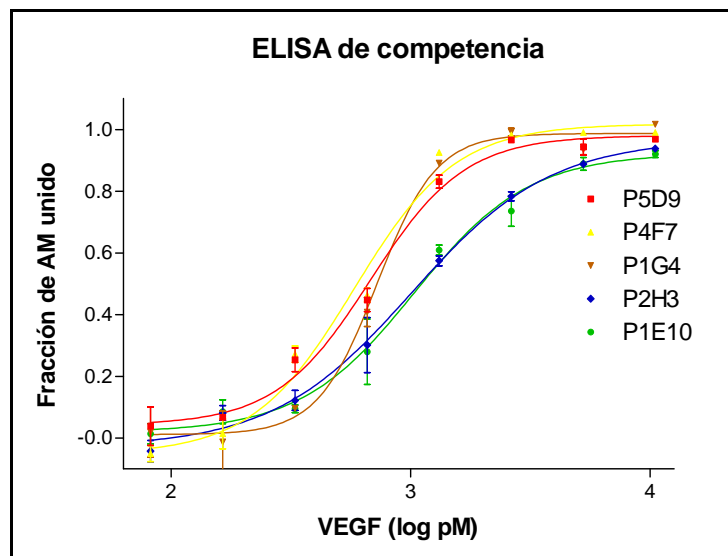


Figura 20. ELISA de competencia de los AMs contra VEGF. Cada valor corresponde al promedio de la fracción de anticuerpo unido \pm Error Estándar ($n=2$) de un solo experimento.

Para el cálculo de la afinidad se utilizó una fórmula que contempla la cantidad de antígeno unido. Este se puede despreciar cuando la concentración de AM utilizada es menor al 10 % de la concentración del antígeno inicial en el valor C_{50} . Estas condiciones suelen satisfacerse cuando se emplean AMs con constantes de disociación en equilibrio (K_D) mayores a 10^{-8} M. En ensayos preliminares observamos que los AMs estudiados no cumplían dichas condiciones, por lo que se utilizó un análisis que tiene en cuenta la concentración de antígeno unido (ver Materiales y Métodos 2.3.4b).

Asimismo, el carácter bivalente de los AMs fue considerado utilizando una corrección para el cálculo del anticuerpo unido, necesaria cuando este se estima por ELISA de competencia revelando el AM libre. Esta corrección consiste en remplazar la fracción de anticuerpo libre (f) de 0.5, en el C_{50} por 0.707 (raíz de 0.5) y se basa en que al revelar el AM libre también se incluye a los anticuerpos unidos al antígeno por uno sólo de sus dos sitios posibles. La Tabla 3 muestra los valores de las constantes de disociación (K_D) y el Desvío Estándar (SD) expresado en pM. Estas constantes fueron obtenidas a partir de 3 experimentos independientes para cada anticuerpo.

AM	$K_D \pm SD$ (pM)
P5D9	220.1 ± 37.8
P4F7	208.3 ± 35.7
P1G4	222.3 ± 37.7
P2H3	338.2 ± 67.3
P1E10	342.4 ± 54.5

Tabla 3. Constantes de disociación en equilibrio (K_D) y su Desvío Estándar (SD), expresadas en pM obtenidas a partir de 3 experimentos independientes (N=3) para cada anticuerpo.

A partir de estos valores, se aplicó el análisis estadístico Prueba de *Tukey*, que indicó la ausencia de diferencias significativas entre los tres anticuerpos de isotipo IgG1a (P5D9, P4F7 y P1G4), de igual manera para los de isotipo IgG2a (P2H3 y P1E10). La diferencia fue significativa ($p < 0.05$), entre los 2 grupos de distintos isotipos.

Debido a que las K_D se encontraban por debajo del límite de confiabilidad de la técnica, las K_D obtenidas solo tienen un valor relativo que serviría para compararlos, pero para determinar los verdaderos valores de afinidad debe utilizarse una técnica más sensible.

Afinidad por sistema BIAcore

Para determinar con mayor precisión la afinidad de nuestros AMs, se analizaron por un sistema que monitorea la interacción entre el antígeno y el anticuerpo en tiempo real (BIAcore). Esta tecnología permite analizar los parámetros cinéticos de velocidad de asociación y disociación para determinar las constantes de afinidad.

Los sensogramas obtenidos por el sistema BIAcore mostraron un comportamiento atípico para la interacción antígeno-anticuerpo para los 5 AMs ensayados (Figura 21). En la pendiente de asociación se observó una desviación de las curvas estándar que estaría relacionado con un efecto de cooperativismo positivo en la unión de estos AMs con el VEGF. A pesar de esto, se pudo calcular una constante de asociación cinética denominada k_{ON} (Tabla 4), pero no así la constante de disociación cinética (k_{OF}), dado que el antígeno no se disoció de los AMs en las condiciones ensayadas. Esto sucede muy raramente y solo cuando las afinidades son extremadamente altas con K_D inferiores a 10^{-11} M, por lo que si bien no logramos

obtener el valor exacto de afinidad, nos confirmó que estos anticuerpos poseen una muy alta afinidad, que serían mejores incluso que las determinadas por ELISA.

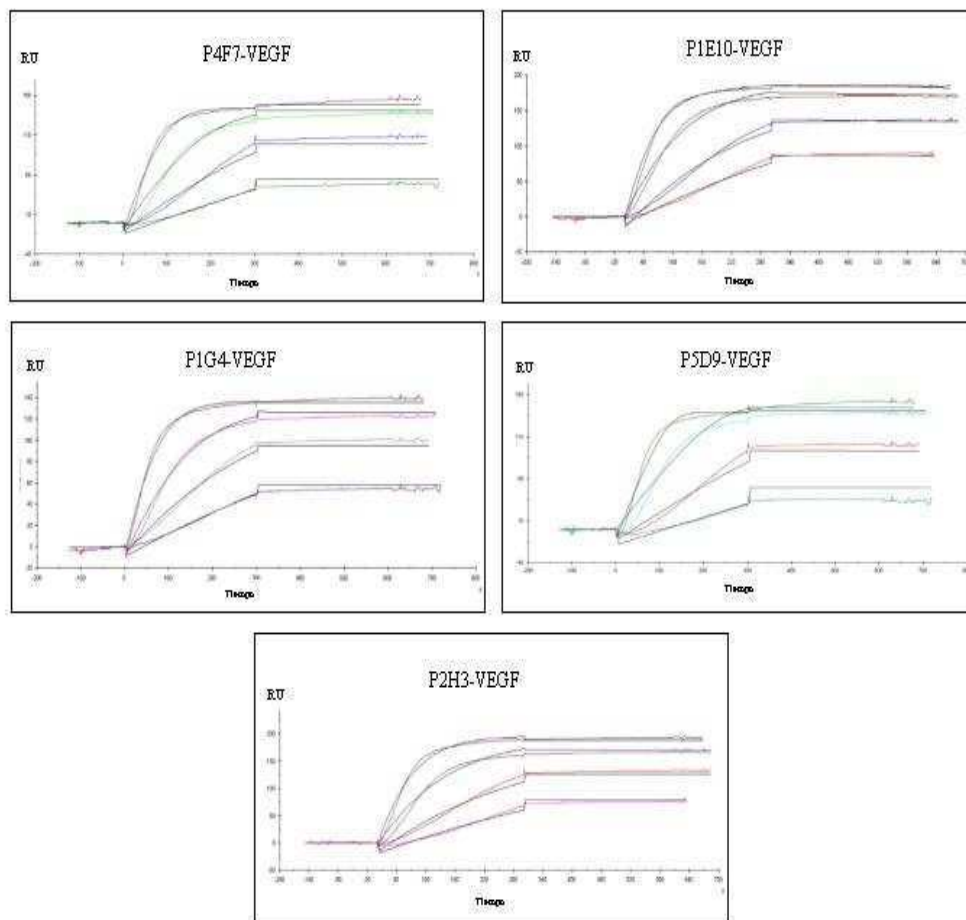


Figura 21. Sensogramas de la interacción entre los distintos AMs seleccionados y el VEGF por el sistema Biacore. Las diferentes curvas dentro cada gráfico corresponden a distintas concentraciones del VEGF evaluadas sobre la superficie del sensor.

AcM	k_{ON} (10^5)
P5D9	2,80
P4F7	1,64
P1G4	1,12
P2H3	0,83
P1E10	1,06

Tabla 4. Constantes de asociación cinética (k_{ON}) de los AMs estimadas por el sistema Biacore.

Efectos sobre la proliferación de HUVEC

Si bien los AMs utilizados fueron inicialmente seleccionados por su capacidad de inhibir parcialmente la acción biológica del VEGF, estos ensayos preliminares fueron realizados con sobrenadantes de cultivo de hibridomas en los que no se conocía la concentración de los AMs utilizados además de contener impurezas que podrían interferir con el ensayo de proliferación.

Especificidad del efecto neutralizante de los AMs

Para verificar si el efecto inhibitorio sobre la proliferación de HUVEC era debido a una acción neutralizante sobre el VEGF o a un resultado inespecífico de los AMs, se realizó un ensayo de proliferación similar al de los sobrenadantes, pero con los AMs purificados (ver Materiales y Métodos 2.2.8), en presencia de VEGF o FGF-2, este último como control de especificidad. En ambos casos, se utilizaron concentraciones de factores que promueven el máximo efecto proliferativo. Se comprobó que dosis de 500 ng/ml de los AMs resultaron capaces de inhibir la acción del VEGF, pero no del FGF-2, demostrando así, la especificidad de la acción inhibitoria de los mismos (Figura 22).

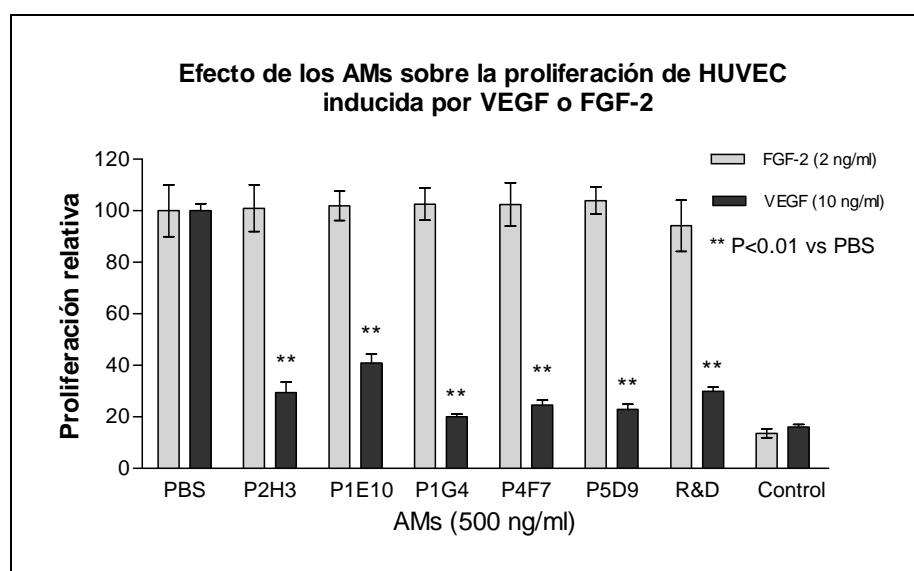


Figura 22. Especificidad del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación de HUVEC. Los valores se expresan relativos a la proliferación de las células en presencia de FGF-2 (2 ng/ml) o VEGF (10 ng/ml) y en ausencia de AMs. Como control de inhibición se utilizó un anticuerpo policlonal neutralizante del VEGF (R&D). Los valores corresponden al promedio \pm Error Estándar (n=4).

Titulación del efecto neutralizante de los AMs.

Con el fin de conocer la potencia neutralizante de estos AMs, se titularon las concentraciones de los AMs purificados necesarias para inhibir la acción mitogénica del VEGF sobre células endoteliales humanas en un ensayo de proliferación *in vitro* analizando la incorporación de metil- ^3H -timidina en células estimuladas con VEGF.

En la Figura 23 se observa que todos los AMs seleccionados fueron capaces de neutralizar la acción biológica del VEGF en forma dosis-dependiente. A través de un análisis de regresión no lineal se calculó la concentración de AM que causa un 50 % de inhibición de la proliferación de HUVEC (IC_{50}), obteniéndose los resultados que se muestran insertos en la Figura 23. En las curvas graficadas en la misma figura se observa una similitud en el comportamiento entre P4F7 y P1G4 como así también entre P1E10 y P2H3, mientras que P5D9 mostró un comportamiento intermedio. Por otro lado, todos los anticuerpos mostraron valores de IC_{50} significativamente menores que el anticuerpo policlonal bloqueante de VEGF (R&D Systems).

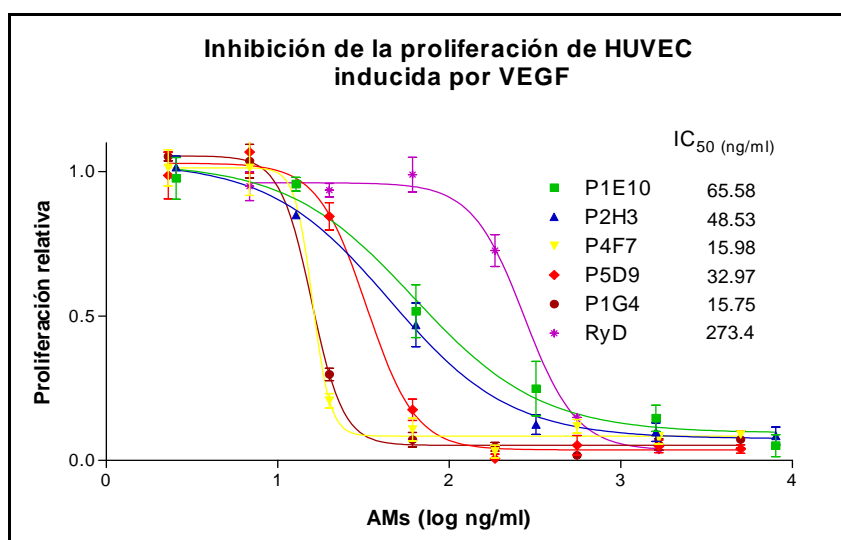


Figura 23. Titulación del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación mediada por VEGF (10 ng/ml) en células HUVEC. Los valores se expresan relativos a la proliferación de estas células en presencia de VEGF y ausencia de AMs inhibitorios. Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar ($n=4$). Las IC_{50} se calcularon utilizando el programa *GraphPad Prism 5*.

Efecto *in vivo* de los AMs sobre la angiogénesis tumoral

Con el objetivo de estudiar el efecto anti-angiogénico agudo *in vivo* de los AMs, se cuantificó la angiogénesis peritumoral inducida por las células neoplásicas IIB-Mel-J, derivada de un melanoma humano y capaz de formar tumores muy vascularizados en ratones atímicos. Los 5 AMs ensayados redujeron en forma significativa ($p < 0,01$) la angiogénesis inducida por esta línea celular (Figura 24). La Figura 25 ejemplifica la imagen macroscópica de la irrigación sanguínea provocada por la inoculación de células neoplásicas humanas del tejido subcutáneo visto desde su interior, en ratones atímicos control y tratados con uno de los AMs anti-VEGF (P2H3).

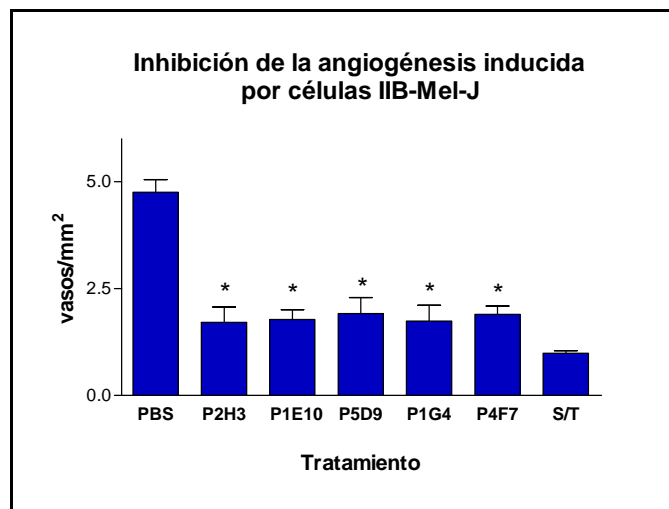


Figura 24. Cuantificación de la angiogénesis peritumoral. Ratones atímicos fueron inoculados con 4×10^5 células IIB-Mel-J y tratados con los distintos AMs (dosis total: 120 μ g/ratón) o PBS como control, además de un grupo sin inocular con células tumorales (S/T). Los valores corresponden al promedio de vasos/mm² \pm Error Estándar ($n=6$). * Diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control con PBS ($P < 0.01$).

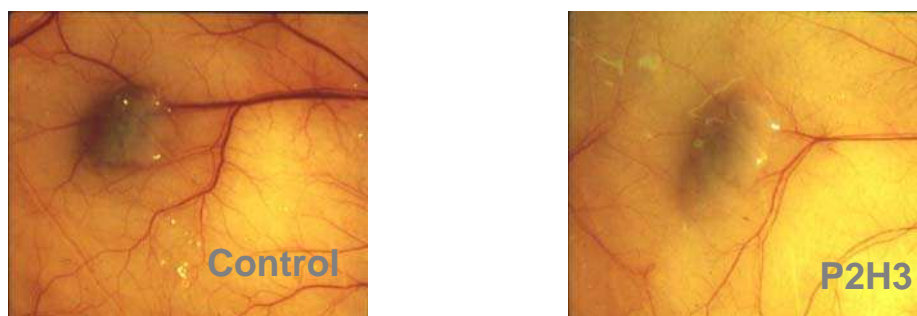


Figura 25. Ejemplo de la vista de la angiogénesis peritumoral. Imagen del tejido subcutáneo, (vista interna), de ratones inoculados con IIB-Mel-J. Animal control (izquierda) y tratado con el AM P2H3 (derecha).

En la Figura 24 se observa que todos los AMs anti-VEGF fueron capaces de inhibir notablemente el proceso de angiogénesis tumoral inducido por las células IIB-Mel-J en ratones atímicos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los AMs analizados.

Producción del AMs (P4F7) a partir de ascitis

A pesar de no detectar diferencias significativas entre los AMs en el ensayo de angiogénesis, en función de los estudios de afinidad por ELISA de competencia (Tabla 3), comparación de IC_{50} en los ensayos inhibición de la proliferación de HUVEC (Figura 23) y que el hibridoma denominado P4F7 expresaba *in vitro* mayor título de AM que el denominado P1G4 (datos no mostrados), se seleccionó al AM denominado P4F7, como el de mayor actividad bloqueante del VEGF para continuar con los ensayos.

El hibridoma productor de dicho AM fue inyectado en la cavidad peritoneal de ratones Balb/C dando lugar a una ascitis a partir de la cual se obtuvo un alto título del AMs que fue empleado en ensayos futuros. A partir del fluido ascítico obtenido, el AM fue purificado mediante una columna de afinidad (ver Materiales y Métodos 5.3) con un alto rendimiento y pureza. El líquido ascítico contiene gran cantidad de AMs, junto con otras proteínas, principalmente albúmina, que luego del fraccionamiento con la columna de afinidad, se eluyen en el percolado, reteniendo al AM que es posteriormente eluido con alta pureza. La concentración del AM fue valorada por absorbancia a 280 nm (A_{280}), con un rendimiento aproximado de 7 mg del AM por ml de ascitis. El producto de purificación fue analizado en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras, siendo su pureza del 90% aproximadamente (Figura 26).

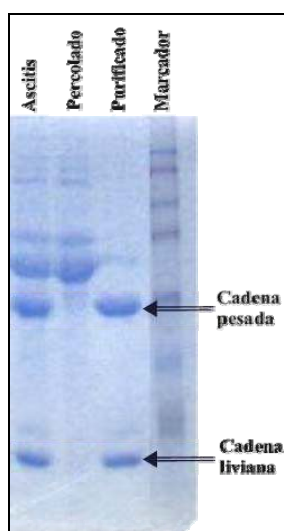


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) en condiciones reductoras del AM P4F7 purificado a partir del líquido ascítico. La primer calle corresponde a 5 μ l del líquido ascítico, la segunda calle a 10 μ l del percolado y en la tercer calle se sembraron 5 μ l del eluido conteniendo el AM P4F7 purificado, todos en condiciones reductoras, la última calle corresponde al marcador de peso molecular (12-225 KDa, *Full-Range Rainbow*, GE).

Efecto del AM P4F7 sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral

Una vez obtenido un apropiado título de AM P4F7 a partir del líquido ascítico se repitió el ensayo *in vivo* sobre la angiogénesis aguda inducida por las células IIB-Mel-J y una línea tumoral derivada de un carcinoma de colon (HT-29), estirpe celular en donde esta demostrado que el bloqueo del VEGF produce beneficios terapéuticos [206].

Realizando un ensayo de angiogénesis similar al descrito previamente, utilizando las líneas HT-29 e IIB-Mel-J. En este ensayo los ratones fueron tratados con el AM P4F7 o con PBS como control (Figura 27). En ambas líneas tumorales encontramos una reducción significativa de la angiogénesis tumoral, pero el tratamiento con P4F7 en los ratones inoculados con células IIB-Mel-J mostró mayor eficacia que en los ratones inoculados con células HT-29.

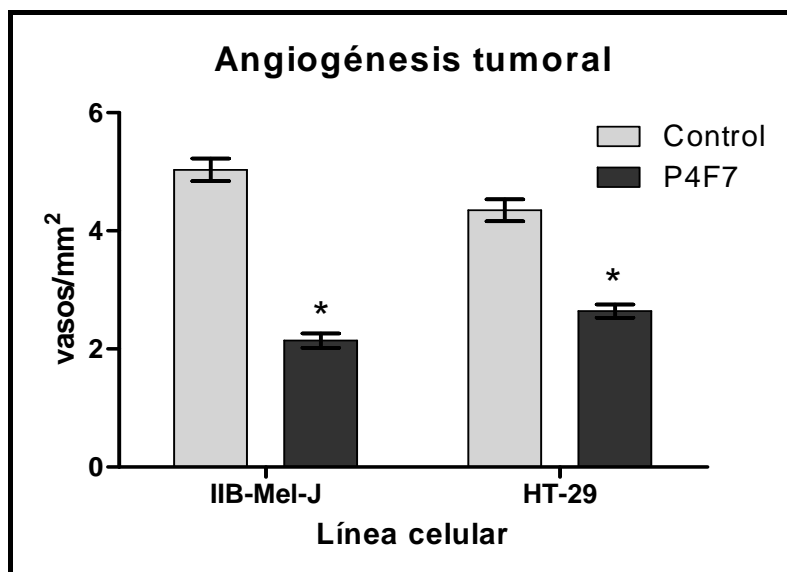


Figura 27. Cuantificación de la angiogénesis peritumoral generada por las líneas IIB-Mel-J y HT-29 en ratones atímicos, tratados con el AM P4F7 (dosis total: 120 $\mu\text{g}/\text{animal}$) o con PBS como control. Los valores corresponden al promedio de vasos/ $\text{mm}^2 \pm$ Error Estándar ($n=6$). * Diferencia significativa ($p < 0,01$) con respecto al control.

Posteriormente realizamos ensayos de crecimiento tumoral inducido por la inoculación de ambas líneas celulares en ratones atímicos, en los mismos verificamos que los tratamientos con P4F7, ya sea con 10 o 100 $\mu\text{g}/\text{dosis}$, resultan efectivos para reducir el crecimiento tumoral inducido por las células HT-29 (Figura 28), del mismo modo demostramos que este tratamiento también resulta eficaz en los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (Figura 29). El estudio estadístico (ANOVA-*Tukey*), se realizó sobre los pesos tumorales una vez finalizado el tratamiento, obteniéndose diferencias significativas para los tumores generados por ambas líneas celulares al ser tratados con las 2 dosis del AM-P4F7 (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{dosis}$). Observamos nuevamente una tendencia de estos tratamientos a ser más efectivo sobre los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (Figura 29) que en la línea HT-29 (Figura 28).

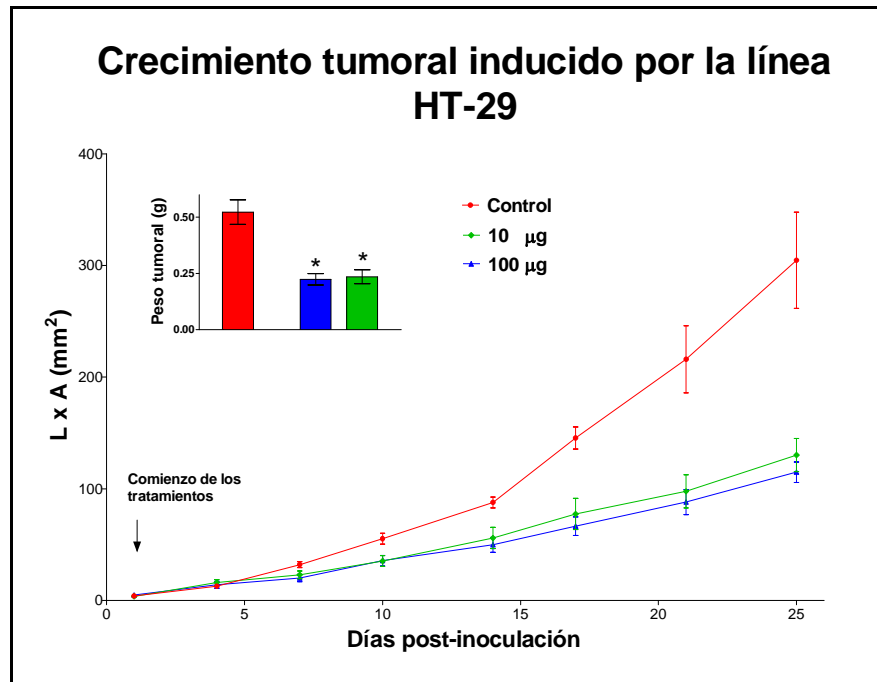


Figura 28. Crecimiento tumoral inducido por células de carcinoma de colon humano (HT-29). En el gráfico principal se observa el crecimiento tumoral en donde cada valor corresponde al promedio del (LxA) para cada tratamiento. Las barras representan el Error Estándar (n=7). El inserto superior izquierdo, corresponde al promedio de los pesos de los tumores una vez finalizado el ensayo. Barras = Error Estándar. * Diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

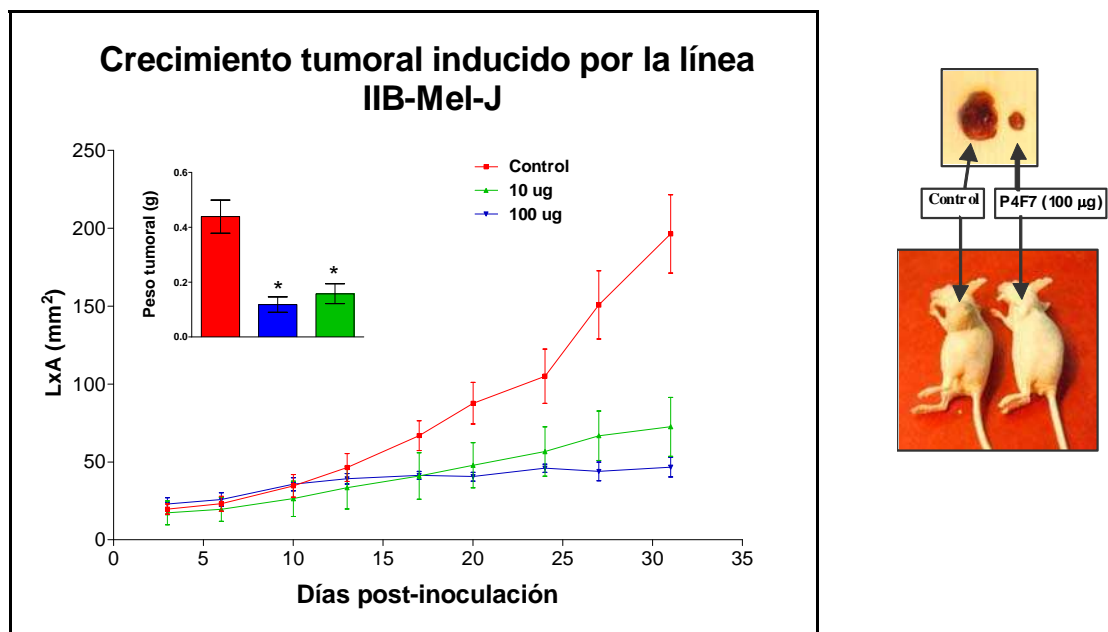


Figura 29. Crecimiento tumoral inducido por células de melanoma humano (IIB-Mel-J). En el gráfico principal se observa el crecimiento tumoral en donde cada valor corresponde al promedio del (LxA) \pm Error Estándar (n=7). El inserto superior izquierdo, corresponde al promedio de los pesos de los tumores, una vez finalizado el ensayo. Barras = Error Estándar (n=7). * Diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al control. Derecha: un ejemplo de la vista del tumor de un ratón control y uno tratado con P4F7 (100 µg/dosis) (abajo) y sus imágenes una vez extirpados (arriba).

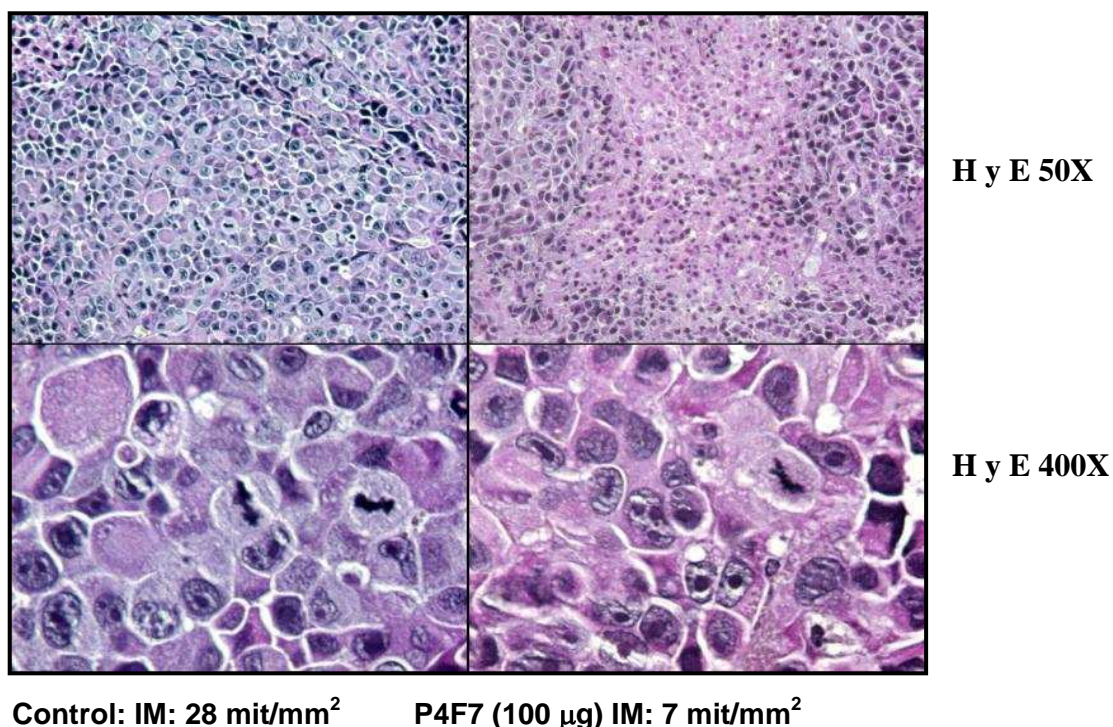


Figura 30. Anatomía patológica. Cortes de tejido fijado de un melanoma control (izquierda) y uno tratado con P4F7 (Derecha), tinción Hematoxilina-Eosina. Magnificación 50X (arriba) y 400X (abajo).

El estudio histopatológico de cortes del tumor teñidos con hematoxilina-eosina mostró que los tumores tratados con el AM P4F7 poseían un índice mitótico menor, con mayor cantidad de zonas necróticas. Como ejemplo, en la Figura 30 se muestran dos cortes de tumores generado por la línea celular IIB-Mel-J, uno control y otro tratado con el AM P4F7.

Comparación de la acción inhibitoria (P4F7 vs.. Bevacizumab)

Como se menciona anteriormente (ver Introducción: Terapias anti-angiogénicas), existe un anticuerpo bloqueante del VEGF denominado Bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche) aprobado por la FDA, para el tratamiento de carcinoma colorectal metastásico, entre otros tumores. Decidimos compararlo con el AM P4F7, en cuanto a la inhibición de la proliferación de HUVEC. Como se observa en la Figura 31, la IC_{50} del AM P4F7 (11 ± 2 ng/ml), resultó significativamente inferior a la del AM Avastin (54 ± 12 ng/ml), lo que indicaría que nuestro AM (P4F7), posee 5 veces mayor potencia inhibitoria que el Bevacizumab.

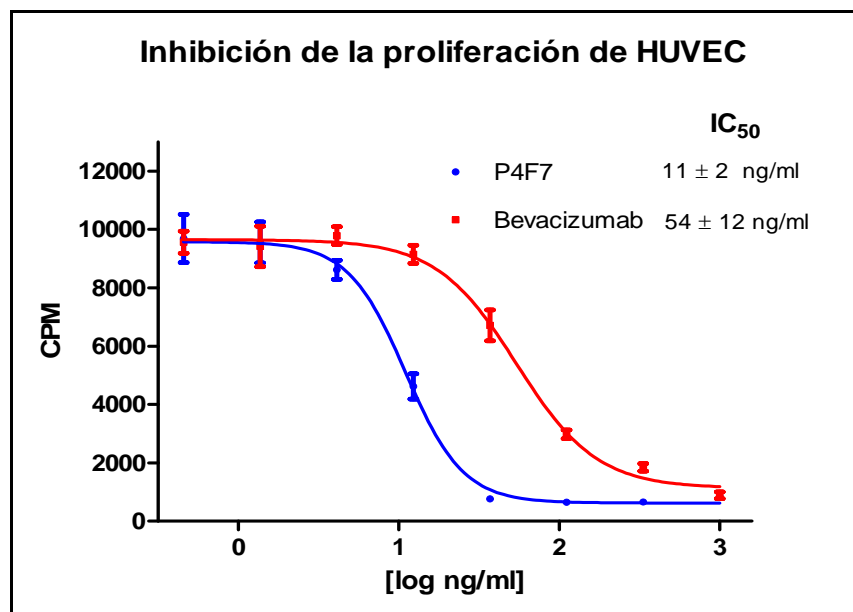


Figura 31. Titulación del efecto neutralizante de los AMs P4F7 (azul) y Bevacizumab (Rojo) sobre la proliferación mediada por VEGF (5 ng/ml) en HUVEC. Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar (n=6). Las IC₅₀ se calcularon utilizando el programa *GraphPad Prism 5*.

Conclusiones del capítulo 2

Desarrollamos y caracterizamos una serie de AMs anti-VEGF humano: P1G4, P4F7 y P5D9 (isotipo IgG1) y P1E10 y P2H3 (isotipo IgG2a), que exhibieron muy altas afinidades por los dos métodos ensayados (ELISA de competencia y Biacore). Aunque no se pudo determinar con exactitud los valores de afinidad, estas serían superiores a 10^{11} M. La capacidad neutralizante de los mismos resultó específica y dosis-dependiente sobre la acción mitogénica del VEGF sobre células endoteliales.

Los AMs inhibieron significativamente el desarrollo angiogénico y también el AM seleccionado (P4F7), disminuyó significativamente el crecimiento tumoral inducido por células neoplásicas humanas derivadas de melanoma (IIB-Mel-J) y carcinoma de colon (HT-29), xenotransplantadas en ratones atímicos. El AM P4F7, mostró una potencia inhibitoria 5 veces mayor que el AM comercial Bevacizumab, en cuanto a la inhibición de la proliferación de HUVEC.

El efecto supresor sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral de este tratamiento, resultó más marcado en esta línea de melanoma (IIB-Mel-J), que en la línea HT-29 derivada de un carcinoma de colon.

Está descrito que la línea tumoral HT-29 también expresa el factor angiogénico FGF-2 y como la diferencia observada podría deberse a la acción angiogénica provocada por este factor, decidimos por un lado desarrollar AMs bloqueantes de la acción angiogénica del FGF-2, de forma similar a los AMs contra el VEGF (Resultados: Capítulo 3). Por otro lado, caracterizar la expresión de FGF-2 y VEGF y evaluar el efecto de los tratamientos anti-angiogénico en la línea IIB-Mel-J y otras de la misma estirpe, pero mejor caracterizadas como las A375 y 1205Lu (Resultados “Capítulo 4”).

Capítulo 3: Desarrollo y selección de AMs anti-FGF-2

Generación de los hibridomas

De forma similar a la descrita en el capítulo 2, luego de inmunizar los ratones (Balb/c) con el FGF-2 conjugado a SABc, los bazos de los dos animales, cuyos sueros mostraron mayor título de anticuerpos contra el FGF-2 determinado por ELISA, fueron extraídos y sus esplenocitos fusionados con las células NS0. A los 30 días post-fusión, los sobrenadantes de aproximadamente 80 pocillos, donde se detectó crecimiento celular, fueron evaluados por ELISA obteniéndose aproximadamente 20 pocillos que mostraban anticuerpos específicos contra el FGF-2 (datos no mostrados).

Se decidió evaluar el efecto de dichos sobrenadantes sobre la proliferación de HUVEC mediada por FGF-2 utilizando como control al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y no al VEGF ya que como se mencionó en la introducción (ver Introducción “Relación entre el VEGF y FGF-2 en la Angiogénesis”), el bloqueo de la señalización mediada por FGF-2 endógeno provoca en las células endoteliales una disminución en la expresión de receptores de VEGF (principalmente el VEGFR2 o KDR) y así los AMs contra FGF-2 podrían interferir indirectamente con la proliferación mediada por VEGF.

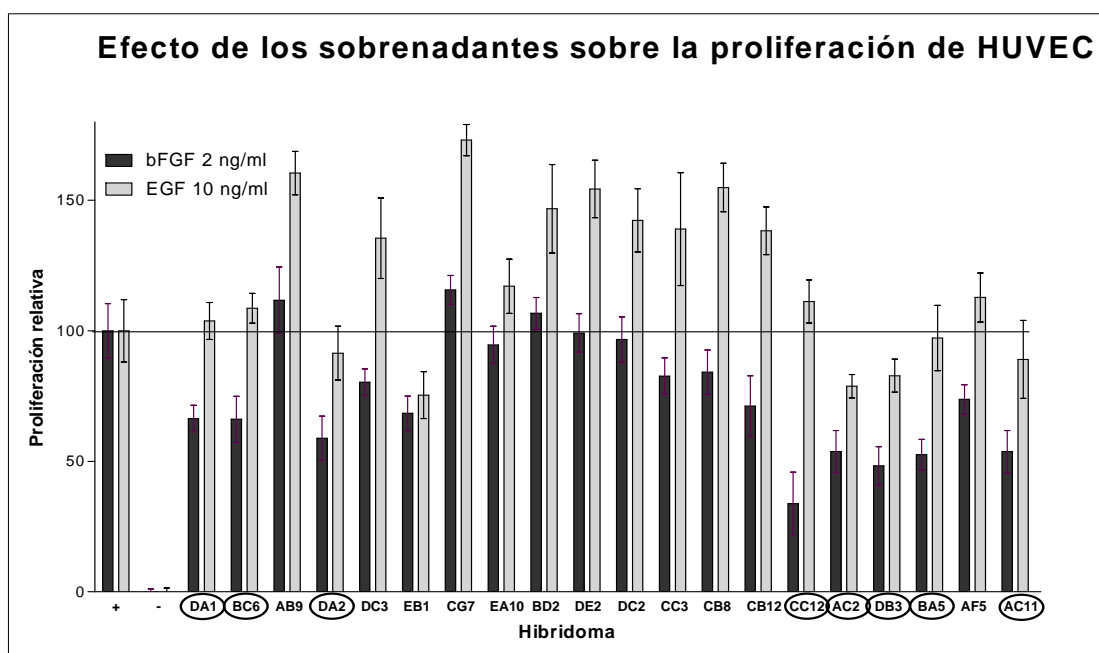


Figura 32. Efecto del sobrenadante de los hibridomas sobre la proliferación de HUVEC estimuladas con FGF-2 (2 ng/ml) o EGF (10 ng/ml). Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar ($n=4$). Los hibridomas señalados con un óvalo fueron seleccionados.

La Figura 32 muestra un ensayo en donde los sobrenadantes de los pocillos positivos fueron evaluados en cuanto a su capacidad de interferir sobre la proliferación de HUVEC estimulada con FGF-2 (2 ng/ml) o EGF (10 ng/ml).

Inicialmente se obtuvieron ocho hibridomas que mostraron una actividad bloqueante específica de la proliferación de células HUVEC al ser estimulada por FGF-2, a la vez que no bloqueaban la estimulación causada por EGF. Pero debido a que tres de los hibridomas dejaron de expresar los AMs con los sucesivos repiques, se purificaron los AMs, a partir de los sobrenadantes de los cinco hibridomas restantes, utilizando una columna de Sepharosa conjugada a proteína G.

Ensayo de inhibición de la proliferación en presencia de heparina

Una vez purificados los AMs a partir de 5 de los hibridomas (DB3, DA2, DA1, CC12 y AC11) preseleccionados, se evaluó el efecto inhibitorio de la proliferación de dichos AMs en presencia de heparina. Este ensayo se realizó para distinguir si los AMs ejercen un efecto inhibitorio debido a que interferían con el dominio de unión al receptor (FGFR1, que se expresa en las HUVEC) como era deseado, o porque los AMs interferían con el dominio de unión a heparán-sulfato. Este es necesario para su correcta dimerización, paso obligatorio previo a la activación de su receptor (ver Introducción "Receptores del FGF"). De comprobar la veracidad del segundo caso, estos AMs no exhibirían una inhibición adecuada *in vivo* donde el heparán-sulfato se encuentra en exceso.

Este ensayo de inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por FGF-2 (5 ng/ml), se llevó a cabo en forma similar a los ya mencionados pero con el agregado de distintas concentraciones de heparina de bajo peso molecular (Sigma). Como resultado del experimento, dos hibridomas fueron descartados (DA1 y AC11), debido a que en presencia de heparina, disminuían su actividad bloqueante *in vitro* (Figura 33), esto sería causado porque su capacidad inhibitoria es producto de su interferencia con el dominio de unión a la heparina, que sería fundamental para la correcta dimerización del factor y no con el dominio de unión al FGFR.

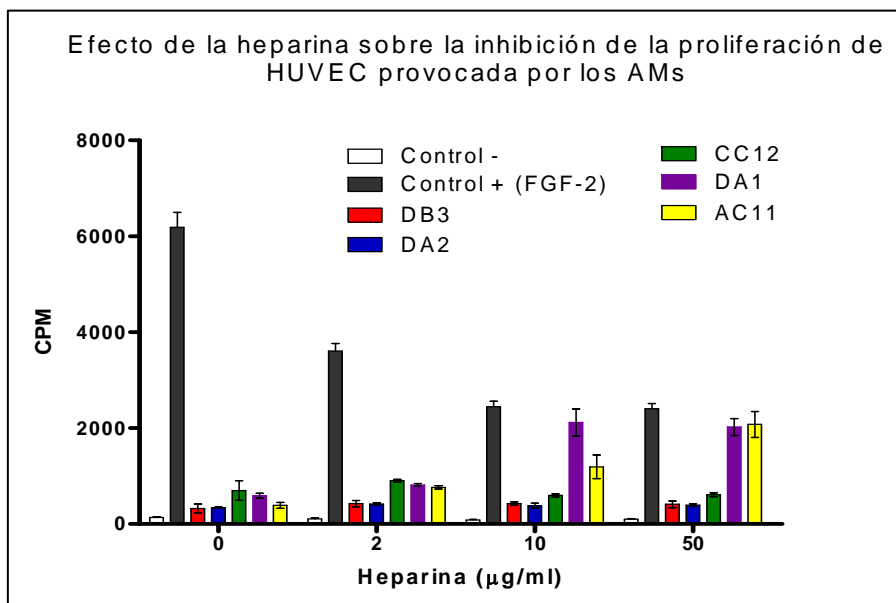


Figura 33. Efecto de la heparina sobre el efecto neutralizante de los AMs (500 ng/ml) en la proliferación de HUVEC estimulada por FGF-2 (5 ng/ml). Los valores corresponden al promedio \pm Error Estándar (n=4).

Caracterización bioquímica de los AMs contra FGF-2

Los hibridomas seleccionados produjeron AMs que si bien eran muy eficientes en el reconocimiento específico del FGF-2 por ELISA, no lo eran por la técnica de *Western-blot* (datos no mostrados), por lo que especulamos que estos 3 AMs estarían reconociendo epítopos conformacionales sobre el FGF-2 que se alterarían durante el desarrollo de dicha técnica.

Determinación del isotipo

Se determinaron los isotipos de los 3 AMs preseleccionados con el mismo ensayo realizado para los AMs anti-VEGF, obteniéndose en los 3 casos (DB3, DA2 y CC12) isotipos similares con una cadena pesada (CP) del tipo Ig γ 1 y una cadena liviana (CL) κ .

Afinidad por ELISA de competencia

La afinidad de los 3 AMs preseleccionados (DB3, DA2 y CC12) fue determinada por ELISA de competencia (ver Materiales y Métodos 2.3.4) en forma similar a la descrita en el capítulo anterior con AMs anti-VEGF. La Figura 34 muestra un ensayo representativo donde se grafica la concentración de anticuerpo unido en función de la concentración de antígeno competidor y sus correspondientes regresiones no lineales. Para el cálculo de afinidad en esta ocasión, se despreció en la ecuación la cantidad de antígeno unido. Esto es válido cuando la concentración de AM utilizada es menor al 10 % de la concentración del antígeno competidor en el valor C_{50} . Estas condiciones suelen satisfacerse cuando se emplean AMs con K_D mayores a 10^{-9} M. En ensayos preliminares observamos que los AMs estudiados cumplían dichas condiciones.

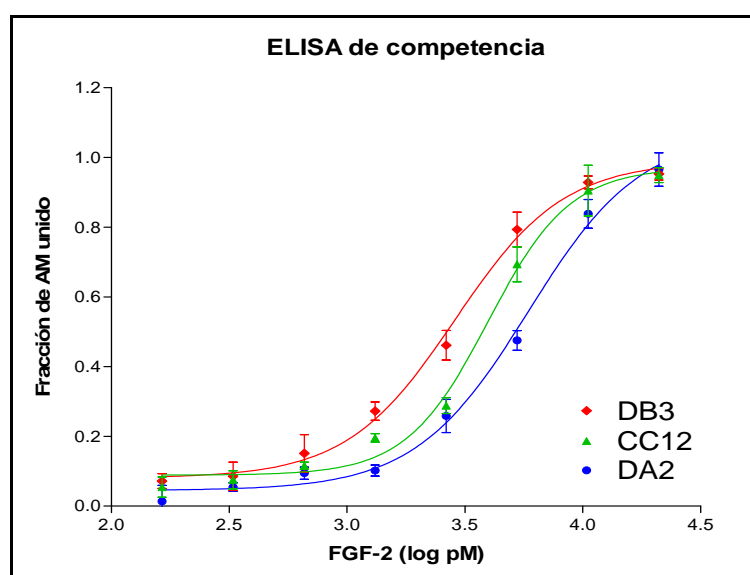


Figura 34. ELISA de competencia de los AMs contra FGF-2. Cada valor corresponde al promedio de la fracción de anticuerpo unido \pm Error Estándar ($n=2$) de un solo experimento.

AM	$K_D \pm SE$ (nM)
DB3	1.2 ± 0.15
DA2	2.5 ± 0.27
CC12	1.8 ± 0.16

Tabla 5. Afinidades. Constantes de disociación (K_D) y Error Estándar (SE) en nM obtenidas a partir de 3 experimentos independientes ($N=3$) para cada anticuerpo.

La Tabla 5 muestra los valores de las constantes de disociación (K_d) y el Error Estándar (SE) expresado en nM. Estas constantes fueron obtenidas a partir de 3 experimentos independientes para cada anticuerpo. A partir de estos valores, se aplicó el análisis estadístico con un test de ANOVA seguido de una prueba de *Tukey*. La diferencia fue significativa ($p < 0.05$) entre los AMs denominados DB3 y DA2. El AM (CC12), con un valor de afinidad intermedio, no mostró diferencias significativas con los otros dos (DB3 y DA2).

Efectos sobre la proliferación de HUVEC

Especificidad del efecto neutralizante de los AMs

Para verificar si el efecto inhibitorio sobre la proliferación de HUVEC era debido a una acción neutralizante específica sobre el FGF-2, se realizó un ensayo de proliferación similar al realizado preliminarmente con los sobrenadantes de hibridomas, pero con los AMs purificados, en presencia de FGF-2, EGF o VEGF (Figura 35). En todos los casos se utilizaron concentraciones de dichos factores que promueven un máximo efecto proliferativo en estas células. Se comprobó que una dosis de 500 ng/ml de estos AMs, fue capaz de inhibir la acción del FGF-2, pero no la del EGF o la del VEGF, demostrando así la especificidad de la acción inhibitoria de los mismos.

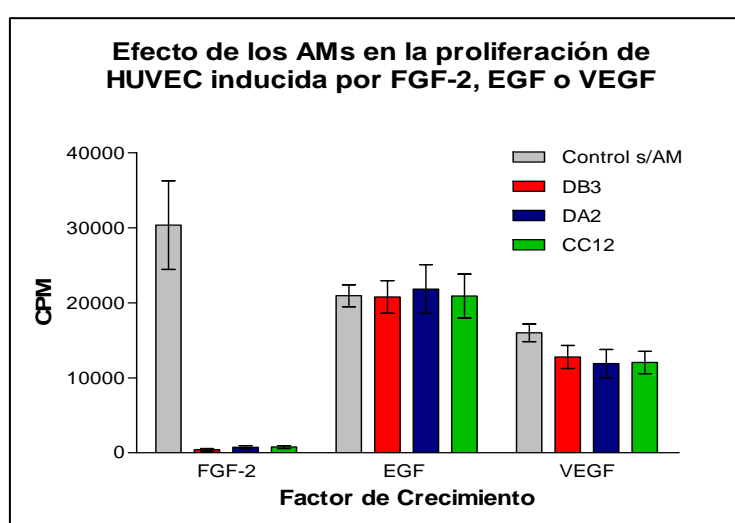


Figura 35. Especificidad del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación de HUVEC. Los valores se expresan en CPM. Las células fueron tratadas con FGF-2 (2 ng/ml), EGF (10 ng/ml) o VEGF (10 ng/ml) en presencia de cada AM (500 ng/ml) y en ausencia de AMs grupo control. Barras corresponden al promedio \pm Error Estándar ($n=4$).

Si bien los tres AMs ensayados indujeron, como está descrito en la bibliografía, una leve disminución en proliferación mediada por VEGF, dado que como se mencionó anteriormente el FGF-2 endógeno de las HUVEC, es necesario para la expresión del VEGFR2, este efecto no resulto significativo en este modelo.

Titulación del efecto neutralizante de los AMs.

Con el objetivo de comparar la potencia neutralizante de estos AMs, se realizó una titulación de las concentraciones de los AMs purificados necesaria para inhibir la acción mitogénica del FGF-2 sobre las HUVEC. En la Figura 36 se observa que todos los AMs seleccionados fueron capaces de neutralizar la acción biológica del FGF-2 en forma dosis-dependiente. A través de un análisis de regresión no lineal se calculó la concentración de AM que causó un 50 % de inhibición de la proliferación de HUVEC (IC_{50}). Se obtuvieron valores de IC_{50} de 33 ng/ml (DB3), 76 ng/ml (DA2) y 186 ng/ml (CC12) como muestra la Figura 36.

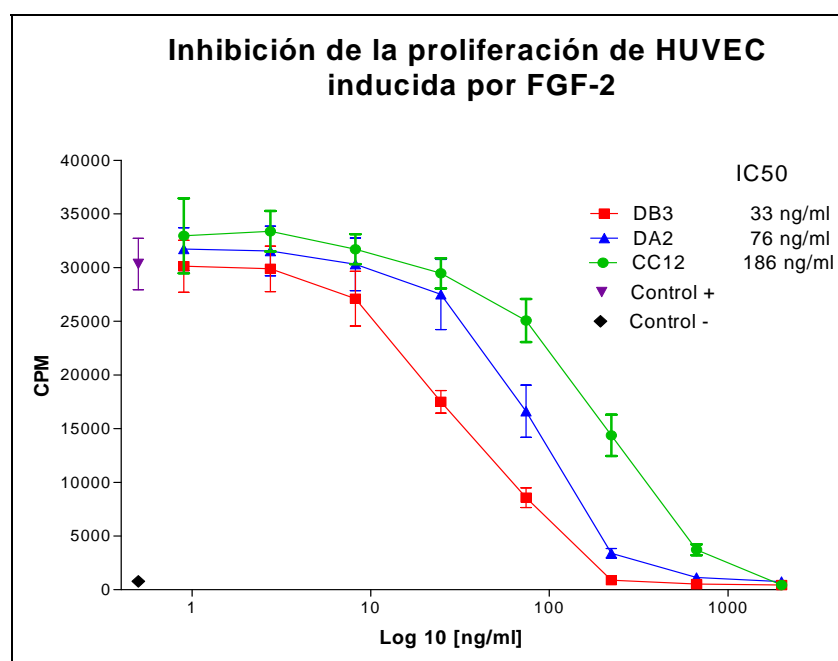


Figura 36. Titulación del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación mediada por FGF-2 (2 ng/ml) en células HUVEC. Los valores se expresan en CPM. Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar (n=4). Las IC_{50} se calcularon utilizando el programa *GraphPad Prism 5*.

En función de este resultado de IC_{50} y en concordancia con su mejor afinidad (ver Afinidad por ELISA de competencia), se seleccionó al AM denominado DB3 como el de mayor eficacia bloqueante de la acción biológica del FGF-2 sobre las células endoteliales. Posteriormente, en forma similar al AM anti-VEGF (P4F7), el hibridoma DB3 fue crecido en la cavidad peritoneal de ratones Balb/C para la producción de ascítis y el AM anti-FGF2 fue purificado para ser utilizado en ensayos posteriores (ver Materiales y Métodos 5.3).

Conclusiones del capítulo 3

Desarrollamos y caracterizamos una serie de AMs anti-FGF-2 humano: DB3, DA2 y CC12, todos de isotipo IgG1, que exhibieron afinidades del orden nM de acuerdo a los valores obtenidos por ELISA de competencia. La capacidad neutralizante de los mismos resultó específica y dosis-dependiente sobre la acción mitogénica del FGF-2 humano sobre células endoteliales.

Se seleccionó al AM denominado DB3 como el de mejor acción bloqueante de la actividad del FGF-2 sobre las células endoteliales. El mismo fue producido en alta concentración en el líquido ascítico.

En la próxima etapa del trabajo, y ya habiendo desarrollado previamente el AM anti-VEGF P4F7, se decidió continuar evaluando el efecto de ambos AMs en ensayos *in vitro* sobre la proliferación celular e *in vivo* sobre crecimiento tumoral inducido por distintas líneas de melanoma humanos xenotransplantadas en ratones atímicos (ver “Capítulo 4”).

Capítulo 4: Estudios en líneas de melanoma humanos

Estudios *in vitro*

Efecto del VEGF y el FGF-2 sobre la proliferación celular

Las líneas de melanoma humano estudiadas fueron IIB-Mel-J, altamente angiogénica pero no caracterizada en cuanto a la expresión de factores angiogénicos, A375, caracterizada por expresar FGF-2 [207] y 1205Lu con una alta expresión de ambos factores (FGF-2 y VEGF) [208]. Estas líneas también fueron seleccionadas por exhibir mayor capacidad tumorigénica, comprobada en ratones atímicos en un estudio previo utilizando las líneas celulares de melanoma humano que disponíamos (datos no mostrados).

Evaluamos el efecto sobre la proliferación de dichas células tratadas con VEGF (10 ng/ml), o FGF-2 (5 ng/ml), en un ensayo de incorporación de proliferación similar al descrito para las HUVEC. Como se observa en la Figura 37, la proliferación de las células IIB-Mel-J fue estimulada significativamente por FGF-2 y mostró una tendencia a estimularse con el VEGF en repetidos ensayos aunque no resultó significativa.

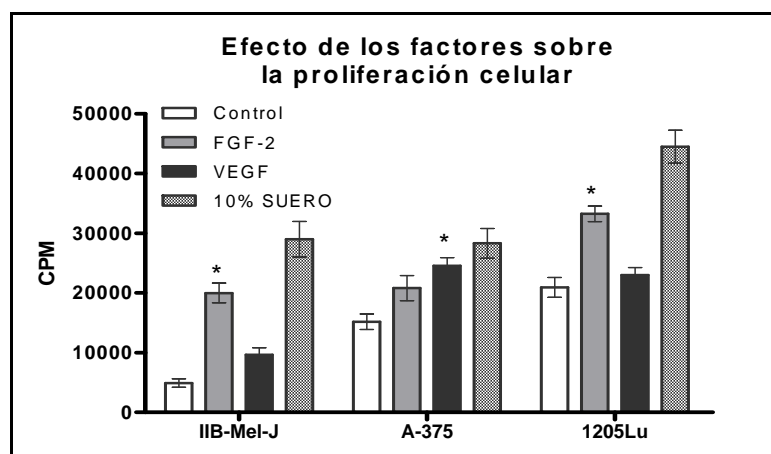


Figura 37. Proliferación de células de melanoma, cuantificada mediante la incorporación de metil-³H-timidina, estimuladas con VEGF (10 ng/ml), FGF (5 ng/ml) o 10% suero. Barras corresponden al valor promedio \pm Error Estándar (N=3). * Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control.

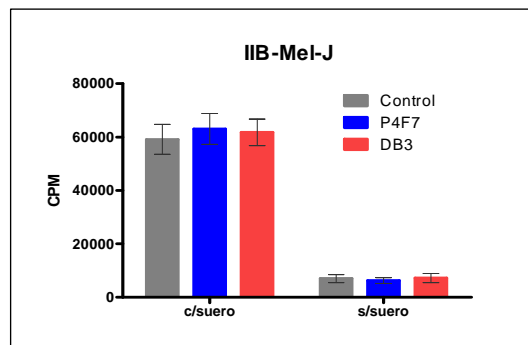
Las células A375 incrementaron significativamente su proliferación al ser tratadas con VEGF y aunque en este caso la estimulación con FGF-2 no resultó

significativa, mostró nuevamente una tendencia positiva. Por otro lado, las células 1205Lu incrementaron su proliferación con el agregado de FGF-2, pero no con VEGF.

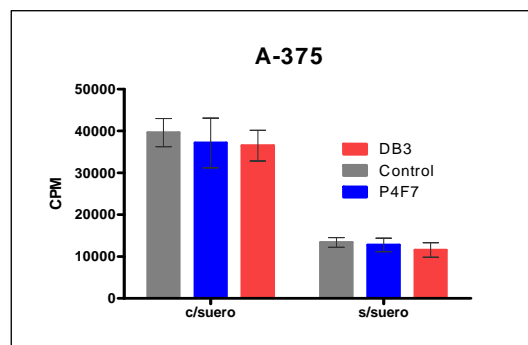
Efecto de los AMs P4F7 y DB3 sobre la proliferación

Evaluamos si los AMs bloqueantes, anti-VEGF (P4F7) y anti-FGF-2 (DB3), ejercían algún efecto directo sobre la proliferación de las células de melanoma *in vitro*, sin el agregado de factores exógenos, en presencia o ausencia de SFB (Figura 38).

a)



b)



c)

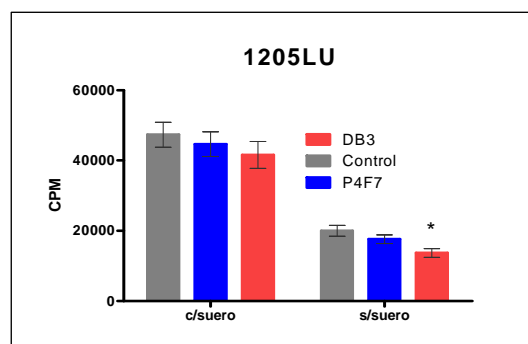


Figura 38. Proliferación de células de melanoma, valorada mediante la incorporación de metil ^3H -timidina, tratadas con los AMs P4F7 y DB3 ($1\mu\text{g/ml}$), en ausencia o en presencia de 10% de SFB. a) Células IIB-Mel-J. b) Células A375. c) Células 1205Lu. Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar ($N=3$). * Diferencias significativas ($p<0,05$) respecto a su control.

Ambos AMs no mostraron un efecto sobre la proliferación de las líneas de melanoma con la excepción del DB3, que mostró una leve aunque significativa disminución en la proliferación de las células 1205Lu en ausencia de SFB.

Expresión de VEGF y FGF-2 por ELISA

Se cuantificó la expresión de VEGF y FGF-2 en las líneas celulares de melanoma humano utilizando un ELISA sándwich (ver Materiales y Métodos 3.3). En este procedimiento utilizamos los AMs P4F7 y DB3, junto con anticuerpos policlonales desarrollados en conejos, específicos contra VEGF o FGF-2 respectivamente, que fueron purificados mediante columnas de afinidad (ver Materiales y Métodos 2.1.3). La sensibilidad de la técnica permitió detectar el VEGF secretado al medio de cultivo. El FGF-2 fue cuantificado a partir de extractos celulares, dado que la sensibilidad del ensayo resultó insuficiente para su detección en el medio de cultivo. Debe considerarse también, que dicho factor es secretado en concentraciones mínimas.

Los niveles basales de expresión del VEGF fueron significativamente mayores en las líneas IIB-MEL-J y 1205Lu comparadas con A375 y no se detectó expresión basal en las HUVEC (Figura 39).

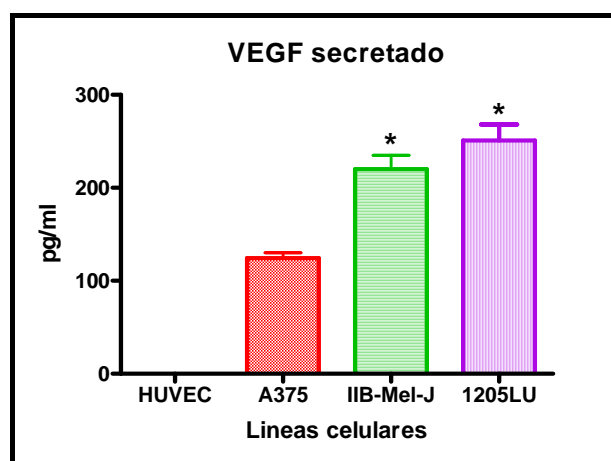


Figura 39. Expresión de VEGF secretado al medio de cultivo, cuantificado por ELISA sándwich. Los valores corresponden al promedio \pm Error Estándar (N=4). * Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre IIB-Mel-J y 1205Lu (alta expresión) y A375 (baja expresión).

En el caso del FGF-2, encontramos que dos de las líneas (A375 y 1205Lu), sobre-expresan este factor en comparación con las HUVEC e IIB-Mel-J que presentaron niveles de expresión muy inferiores (Figura 40).

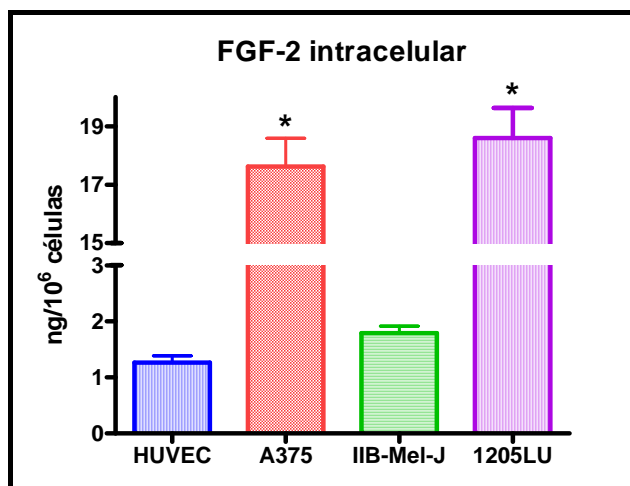


Figura 40. Expresión de FGF-2 cuantificado por ELISA sándwich en extractos celulares. Los valores corresponden al promedio \pm Error Estándar (N=4). * Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre A375 y 1205Lu (alta expresión) en comparación con IIB-Mel-J y HUVEC (baja expresión).

En conclusión, tres líneas de melanoma exhiben distintos niveles de expresión de estos factores, mientras IIB-Mel-J expresa altos niveles de VEGF y bajos de FGF-2, A375, expresa altos niveles de FGF-2 y bajos de VEGF, mientras que las células 1205Lu expresan altos niveles de ambos factores. En las HUVEC no se detectó expresión de VEGF, mientras que mostraron una baja expresión de FGF-2 en el mismo orden que las IIB-Mel-J.

Expresión del FGF-2 por inmunofluorescencia

Como se mencionó en la introducción (ver “Estructura del FGF-2”), existen distintas isoformas del FGF-2 que poseen diferentes localizaciones celulares. La cuantificación por ELISA sándwich a partir de extractos celulares, no discrimina entre estas isoformas, debido a que ambos anticuerpos están dirigidos contra la isoforma de menor peso molecular, cuya secuencia aminoacídica se incluye dentro de las de mayor peso molecular. Por tal motivo, decidimos estudiar la localización del FGF-2 por técnicas de inmunofluorescencia. Para esto utilizamos el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando al anticuerpo policlonal anti-FGF-2 desarrollado en el laboratorio, que fue revelado con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy-3. Como se observa en la Figura 41 y en correlación con lo observado por ELISA, las células de la línea IIB-Mel-J, exhibieron una tinción general para FGF-2, marcadamente inferior a la observada en las líneas celulares A375 y

1205Lu. Esta diferencia se observó principalmente a nivel nuclear, por lo que inferimos que las isoformas de alto peso molecular del FGF-2, de localización nuclear, serían las responsables de la diferencia observada en la expresión general de FGF-2 por ELISA a partir de extractos celulares.

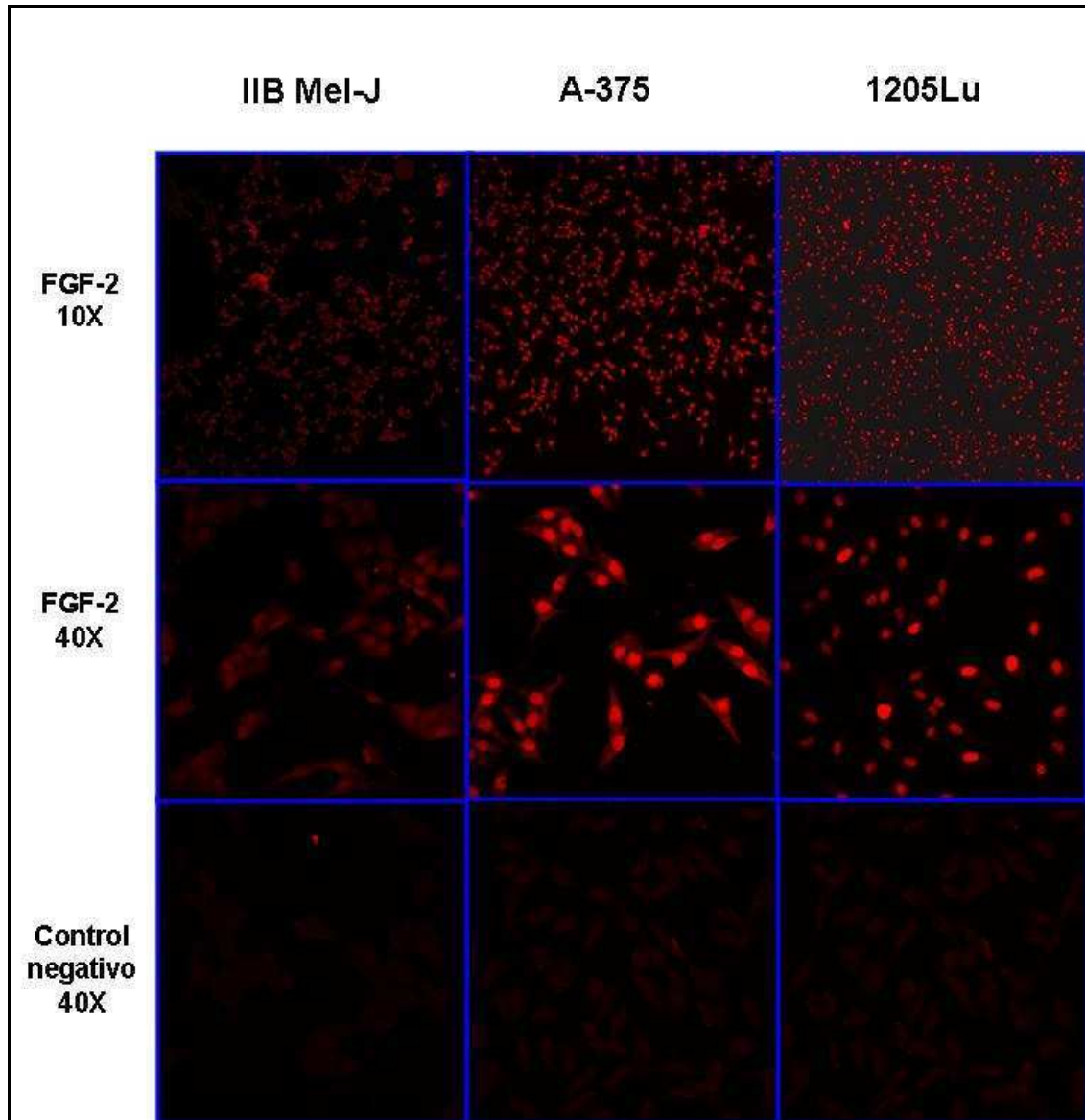


Figura 41. Inmunofluorescencia del FGF-2 en las líneas de melanoma estudiadas. Las células fueron crecidas en cámaras de 8 pocillos (*Labtek*, Nunc), fijadas, permeabilizadas y tratadas o no (Control negativo) con el anticuerpo policlonal anti-FGF-2 desarrollado en el laboratorio y revelado con un anti-conejo conjugado con el fluoróforo Cy-3.

Estudios sobre el efecto de los AMs sobre el crecimiento tumoral

Una vez caracterizada la expresión de estos factores en las líneas de melanoma humano en estudio, nos enfocamos en el objetivo principal de este trabajo, que consistió en evaluar el posible efecto terapéutico de estos AMs, solos y combinados, sobre el crecimiento de melanoma humanos en ratones atómicos. También evaluamos si este efecto mostraba alguna relación con los niveles de expresión de estos factores previamente caracterizados *in vitro*. Ensayos previos, en ratones atómicos inoculados con células tumorales, habían demostrado que dosis de 10 µg/ratón del AM P4F7, dos veces por semana, reducían significativamente el crecimiento tumoral inducido por las líneas IIB-Mel-J (Figura 29), HT-29 (Figura 28) y A375 (datos no mostrados). Aunque dosis mayores (100 µg) produjeron un efecto levemente mayor en las IIB-Mel-J, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa respecto al tratamiento con 10 µg/ratón. También habíamos observado que la eficacia de este tratamiento, fue mayor en el los tumores generado por la inoculación de la línea IIB-Mel-J, que con las otras dos líneas evaluadas.

En ensayos subsiguientes utilizamos ratones atómicos inoculados con las líneas de melanoma (IIB-Mel-J, A375 y 1205Lu), que cuando desarrollaron tumores palpables (de aproximadamente 2 mm²), fueron separados al azar en 4 grupos de 6 animales. Los animales, fueron tratados 2 veces por semana, con 10 µg del AM anti-VEGF (P4F7) denominado tratamiento V; o con 200 µg del AM anti-FGF-2 (DB3), tratamiento F; o con la combinación de ambos, tratamiento FV; o inyectados con PBS como control (ver Materiales y Métodos 3.5). Las Figuras 42, 43 y 44, muestran el crecimiento tumoral generado por las células IIB-Mel-J, A375 y 1205Lu, respectivamente. El tratamiento con el AM anti-VEGF (P4F7), ejerció un efecto inhibitorio en todas las líneas ensayadas, y nuevamente, mostró una tendencia a ser más efectivo en los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (Figura 42).

Por otro lado, el bloqueo del FGF-2, tratamiento (F), no mostró efectos significativos sobre el crecimiento tumoral de ninguna de las líneas ensayadas, ni mejoró el efecto del bloqueo de VEGF cuando se ensayaron en forma combinada, tratamiento (FV), este último tratamiento solo mostró una tendencia a ser más efectivo que el tratamiento (V), en los tumores originados por la línea 1205Lu, aunque estas diferencias no resultaron significativas (Figura 43).

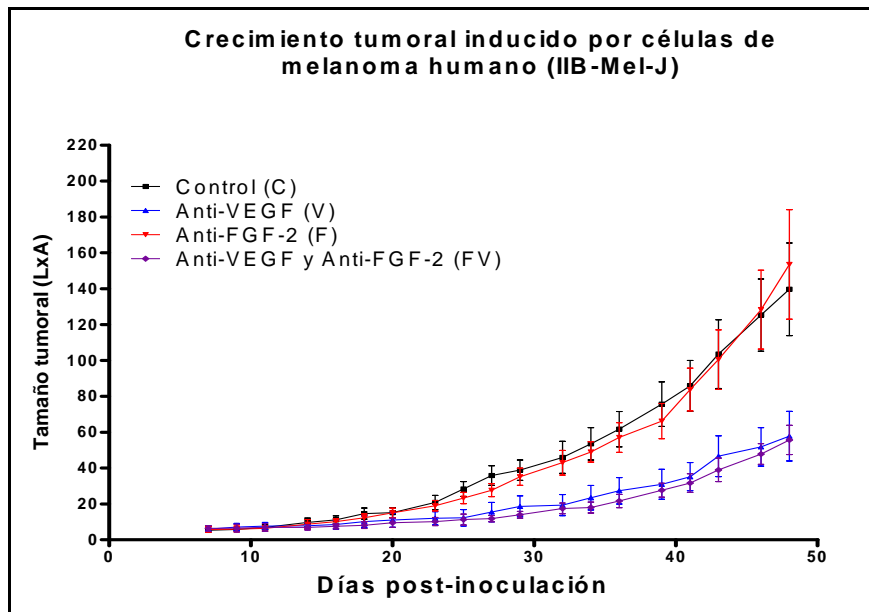


Figura 42. Crecimiento tumoral inducido por células de melanoma humano (IIB-Mel-J). Las determinaciones del tamaño tumoral, fueron realizadas 3 veces por semana. Los tratamientos consistieron en dosis de 10 μ g de P4F7 (anti-VEGF, tratamiento V, azul), 200 μ g del AM DB3 (anti-FGF-2 tratamiento F, rojo), combinado (tratamiento VF, violeta) o solo PBS (control, gris). Cada valor corresponde a la media del LxA \pm Error Estándar (n=6).

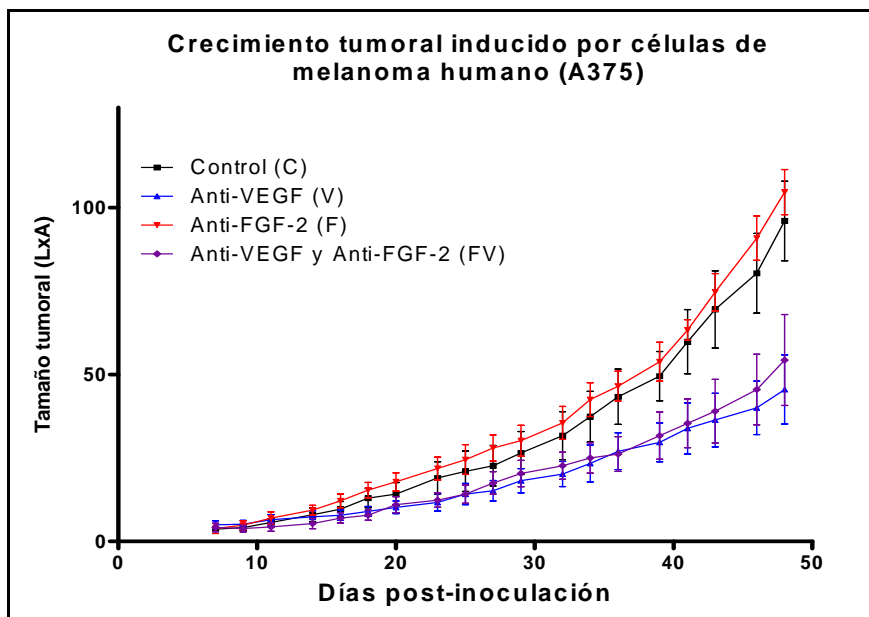


Figura 43. Crecimiento tumoral inducido por células de melanoma humano (A375). Las determinaciones del tamaño tumoral, fueron realizadas 3 veces por semana. Los tratamientos consistieron en dosis de 10 μ g de P4F7 (anti-VEGF, tratamiento V, azul), 200 μ g del AM DB3 (anti-FGF-2 tratamiento F, rojo), combinado (tratamiento VF, violeta) o solo PBS (control, gris). Cada valor corresponde a la media del LxA \pm Error Estándar (n=6).

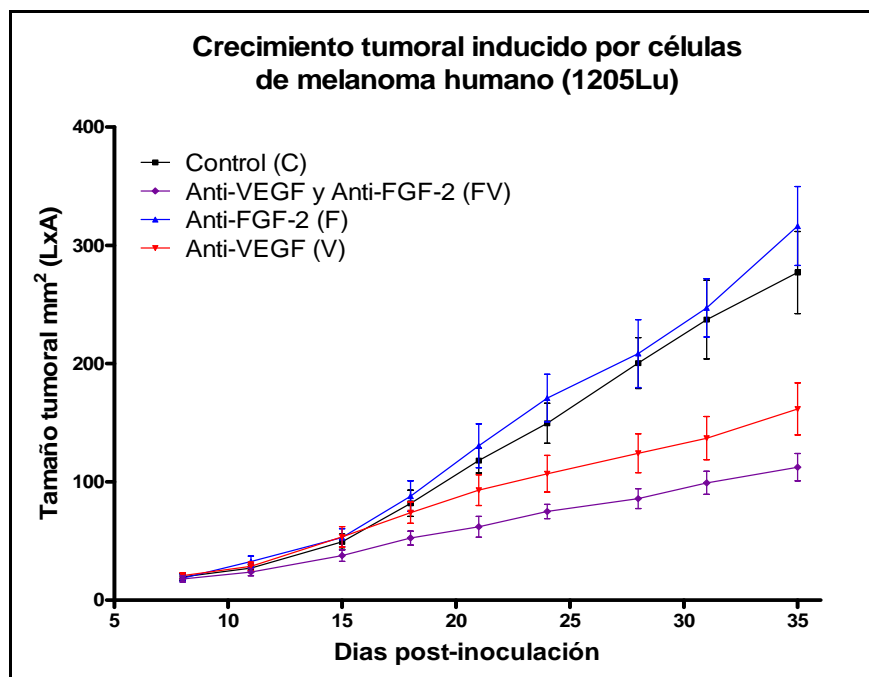


Figura 44. Crecimiento tumoral inducido por células de melanoma humano (1205Lu). Las determinaciones del tamaño tumoral, fueron realizadas 2 veces por semana. Los tratamientos consistieron en dosis de 10 μ g de P4F7 (anti-VEGF, tratamiento V, azul), 200 μ g del AM DB3 (anti-FGF-2 tratamiento F, rojo), combinado (tratamiento VF, violeta) o solo PBS (control, gris). Cada valor corresponde a la media del $Lx \pm$ Error Estándar ($n=6$).

El análisis estadístico se realizó sobre los pesos de los tumores una vez finalizado el ensayo y consistió de un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni. Como se puede observar en la Figura 45, solo los tratamientos V y el FV produjeron una disminución significativa del crecimiento tumoral con respecto a sus controles, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos (V vs. FV), ni entre el tratamiento F y su control para ninguna de las líneas ensayadas.

De dicho gráfico se deduce, que el tratamiento V muestra una tendencia a ser más eficaz, a juzgar por la inhibición en el desarrollo tumoral con respecto a su control, sobre los tumores generados por las células IIB-Mel-J, comparado con las otras 2 líneas ensayadas, y aunque esta tendencia no resultó significativa, también fue observada en los experimentos en animales descritos en el capítulo 2 y en ensayos preliminares. Ellos fueron similares a los anteriormente descritos, pero empleando una dosis menor (50 μ g) del AM bloqueante del FGF-2, e igual dosis (10 μ g) del AM bloqueante del VEGF, observándose una tendencia similar (datos no mostrados).

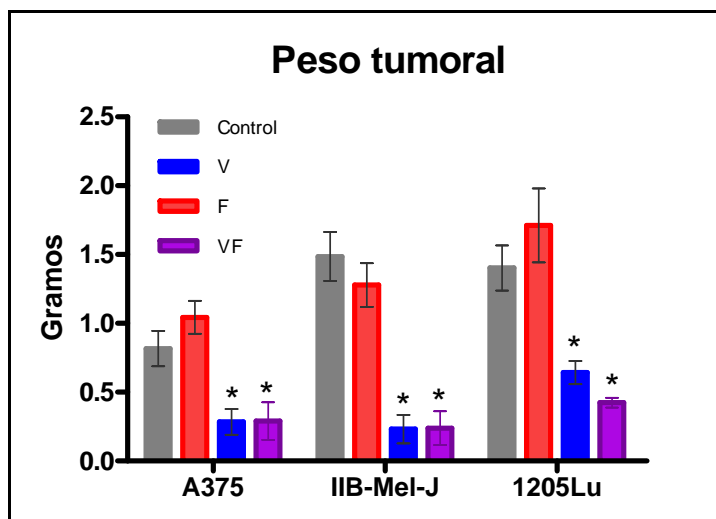


Figura 45. Peso de los tumores inducidos por células de melanoma humano (A375, IIB-Mel-J y 1205Lu), una vez finalizados los ensayos de crecimiento tumoral. Los tratamientos consistieron en dosis de 10 μ g de AM P4F7 (anti-VEGF, tratamiento V, azul), 200 μ g del AM DB3 (anti-FGF-2 tratamiento F, rojo), combinado (tratamiento VF, violeta) o solo PBS (control, gris). Los valores corresponde a la media en gramos de los pesos tumorales para cada tratamiento \pm Error Estándar (N=6). * ($p < 0,05$) respecto a su control.

Conclusiones del capítulo 4

En este capítulo, se describe la caracterización sobre el efecto del agregado exógeno de los factores estudiados, en la proliferación de las líneas de melanoma humano ensayadas y la evaluación del efecto de los dos AMs (P4F7 y DB3), desarrollados y seleccionados en el laboratorio (capítulos 2 y 3), sobre la proliferación de dichas células *in vitro*. También, utilizando un ELISA sándwich, desarrollado durante el presente trabajo, se cuantificó la expresión del VEGF y el FGF-2 en las líneas de melanoma. Además, utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observó que las grandes diferencias en la expresión de FGF-2 entre las distintas líneas, corresponderían principalmente a las isoformas de alto peso molecular de localización nuclear.

Por otro lado, se evaluó por primera vez el efecto farmacológico de ambos AMs sobre el crecimiento tumoral generado por líneas de melanoma humano, concluyendo que solo el tratamiento con el AM bloqueante del VEGF, indujo una disminución del crecimiento tumoral en todas las líneas ensayadas, sin encontrar relaciones entre los niveles de expresión del VEGF en las células tumorales y la efectividad del tratamiento.

Nuevamente, esta reducción en el crecimiento tumoral fue mayor en los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (de baja expresión de FGF-2), que en las otras dos líneas ensayadas, que a su vez mostraron sobre-expresión de las isoformas de localización nuclear del FGF-2. La relación entre la expresión de FGF-2 y una mayor resistencia al tratamiento anti-angiogénico de bloqueo del VEGF, junto a información de la bibliografía que describe al FGF-2 (principalmente a las isoformas de alto peso molecular y localización nuclear), como las responsables de la resistencia de los melanoma a ciertas quimioterapias (ver “Introducción: Funciones biológicas del FGF-2”), nos permite inferir que el FGF-2 estaría jugando un papel más importante al generar una resistencia intrínseca de las células a la muerte por la hipoxia generada por el tratamiento anti-VEGF, que a su función como factor angiogénico, motivo por el cual posiblemente el AM bloqueante del FGF-2 (DB3), no fue eficaz en modificar el curso del crecimiento tumoral.

El hallazgo de esta posible asociación, entre la expresión de FGF-2 y la mayor resistencia a las terapias anti-angiogénicas, ha abierto recientemente una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio.

Capítulo 5: Clonado y generación anticuerpos recombinantes

Clonado de la fracción Fab de los AMs

Basado en los resultados anteriores, se procedió al clonado de las regiones variables de ambos anticuerpos con el objetivo de lograr una mejor caracterización de los mismos y desarrollar anticuerpos de cadena simple que pudieran ser clonados en vectores y evaluarlos en protocolos de terapia génica.

La cadena liviana κ (L κ) y la región variable de la cadena pesada (VH, *variable heavy*) junto a su primer dominio constante (CH1, *constant heavy 1*), constituyen la estructura cuya denominación universal es Fab. Dado que no conocíamos las secuencias de estas cadenas, fueron clonadas utilizando los *primers* y la metodología de amplificación diferencial descrita en Materiales y Métodos (ver sección 4.1). Se utilizó ARNm proveniente de las células NS0 como control, ya que estas si bien no producen inmunoglobulinas, expresan un ARNm de Igs, que aunque es incapaz de traducirse, podría interferir con las secuencias específicas que se deseaban clonar. Primariamente se evaluó la combinación de *primers* y la temperatura de complementariedad (*annealing*), de la PCR que producía una amplificación diferencial de cada cadena del gen codificante del AM deseado y no de una inmunoglobulina a partir del ADNc proveniente de células NS0. Un ejemplo de este tipo de ensayos de amplificación diferencial para el clonado de la cadena pesada (VH + CH1) del AM P4F7, se muestra en la Figura 46, donde se visualiza, en una electroforesis en gel de agarosa, que a una determinada temperatura de complementariedad, en este caso 56°C, en la reacción de PCR, se encontró una combinación de *primers* que amplifican en forma diferencial un fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb, para el ADNc proveniente del hibridoma P4F7 y no para el ADNc de las células NS0 (ver círculos rojos en la Figura 46). De esta forma, fue ensayada la amplificación de todas las cadenas de inmunoglobulinas deseadas, seleccionándose para la amplificación específica de la cadena pesada y la cadena liviana los *primers* CPVup-3 y CLVup-4 respectivamente para el AM P4F7, mientras que de igual forma, se seleccionaron los primer CPVup-2 y CLVup-5, para la amplificación de las cadenas del AM DB3 (datos no mostrados).

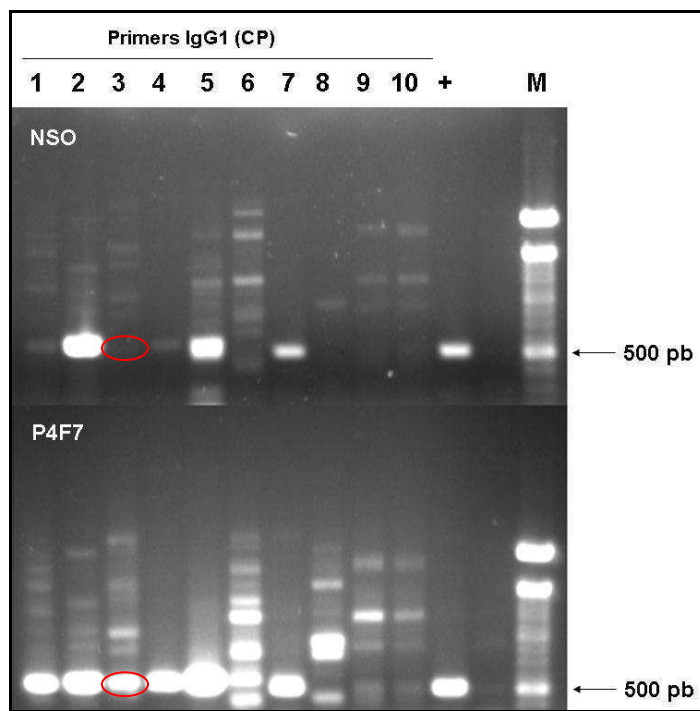


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %), del producto de amplificación por PCR de la cadena pesada (HL + CH1) a partir de ADNc proveniente de las células NS0 (Arriba) y del hibridoma P4F7 (abajo). Se evaluaron distintos *primers*, hacia el extremo 5', denominados CPVup 1-10 junto con un único *primer*, hacia el extremo 3', denominado MHdwFd (calles 1-10). La calle 11, corresponde a un estándar de peso molecular esperado (aproximadamente 600 pb). M: indica al marcador de peso molecular (*100 pb ladder*, Invitrogen).

Una vez obtenidas ambas cadenas para los dos AMs, fueron clonadas en el vector pComb3 y expresadas en forma de Fab en *E. Coli* para ser ensayadas por ELISA contra el antígeno correspondiente y de esta forma verificar la especificidad de los genes clonados. Los resultados indicaron que la mayoría de los clones estudiados, provenientes del AM DB3 y del P4F7, expresaban un Fab que reconocían específicamente solo al antígeno de interés (datos no mostrados). Verificando de esta manera la especificidad de los genes clonados.

Posteriormente, ambas cadenas de varios clones positivos, fueron secuenciados y sus estructuras analizadas con programas del IMGT (*The international immunogenetics information system*, www.imgt.org), para definir las distintas regiones de los dominios variables de los AMs. En la Tabla 6 se exhiben las secuencias aminoacídicas de los Fab correspondientes a ambos AMs y se remarcan las regiones de interés.

Anticuerpo Monoclonal contra FGF-2 (DB3)

Cadena Pesada (VH+CH1):

QVKLLESGAELMKPGTSVKISCKAT**GYTVSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGELPGSNNTKFNERFK**
GKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARELGRGHYVMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYP
 LAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWP
 SETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCTS

Cadena liviana *k* (VL+CL):

ELVMTQTPKFLLSAGDRATITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVPARFTGS
GYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPRTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV
 VCFLNFPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH
 KTSTSPIVKSFNNEC

Anticuerpo Monoclonal contra VEGF (P4F7)

Cadena Pesada (VH+CH1):

QVKLLESGPELKKPGETVKISCKAS**XXXXXXXXXXWVKQAPGKGLKWMGXXXXXXXXXXXXXXXXXX**
XRFAFSLETSASSAYLQISNLNNEDTATYFCARXXXXXXXXXXWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPL
 APGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPS
 ETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCTS

Cadena liviana *k* (VL+CL):

ELVMTQPSSLSASLGDRVTITC**XXXXXXXXXXWYQQKPDGPIKLLIYXXXXXSGVPSRFSGSGS**
GTDYSLTISNLDREDIATYFC**XXXXXXXXXFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC**
 LNNFPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS
 TSPIVKSFNNEC

Tabla 6. Secuencias aminoacídicas de las regiones clonadas correspondientes al AM DB3 (arriba) y P4F7 (abajo). Los aminoácidos en negrita corresponden a las regiones variables y dentro de estas, los subrayados representan a los CDRs (*complementarity determining regions*) según la nomenclatura de *Kabat* (www.imgt.org). Los primeros 8 aa del extremo NH₃-terminal son generados por el vector pComb3 por lo que no se conoce la secuencias originales de estos extremo. Los CDRs correspondientes al AM P4F7 están ocultos por razones propietarias.

Desarrollo de Anticuerpos de cadena simple

Con el objetivo de transformar dichos anticuerpos en una versión de cadena simple (scFv), para evaluar futuras aplicaciones en terapia génica, diseñamos *primers* para transformar las dos cadenas clonadas de cada AM en una cadena simple. Para esto, se realizaron varios pasos secuenciales de PCR que llevaron a la formación de un único “gen” cuya expresión genera una proteína en donde las dos regiones variables liviana y pesada, se encuentran unidas por una secuencia conectora de 18 aminoácidos que le confiere a la construcción una conformación paralela de las dos regiones variables (Materiales y Métodos 4.4).

Por otro lado, diseñamos sobre la base del plásmido pCEFL un nuevo plásmido en el que el sitio de clonado (Sfi 1), se encuentra entre una señal de exportación de proteínas y los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana. Este nuevo plásmido fue denominado pCEFL-Fc. En este plásmido fueron clonados los scFv anti-VEGF y anti-FGF-2, obteniéndose una construcción génica cuyo producto exhibe las mismas regiones variables que las del anticuerpo original, además del agregado de una secuencia Fc humana (Fc=CH2+CH3). A estas construcciones las denominamos anticuerpos quiméricos recombinantes (AQR) scVEGF-Fc para el derivado del AM P4F7 (Figura 47) y AQR scFGF-2-Fc para el derivado del AM DB3. Varios clones de cada anticuerpo fueron secuenciados y los plásmidos que contenían la secuencia esperada, fueron transfectados en células HEK-293. A partir del sobrenadante de estas transfecciones se evaluó la capacidad de estos nuevos AQRs para reconocer al VEGF mediante ELISA.

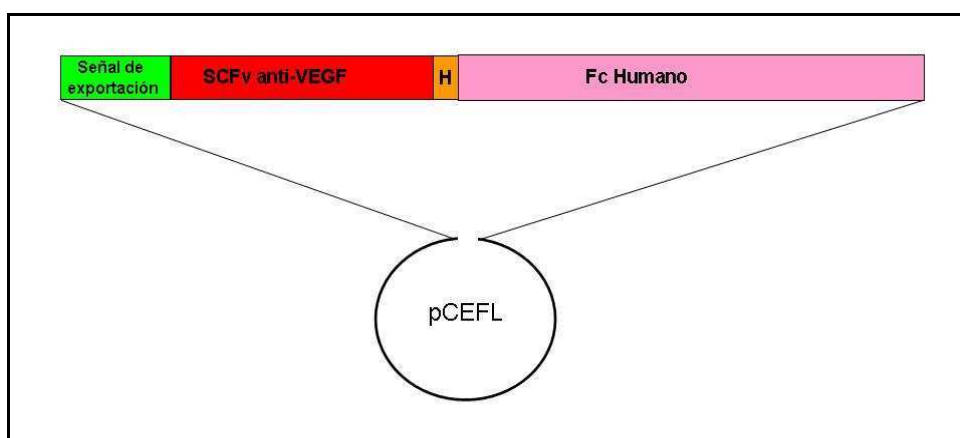


Figura 47. Esquema de la construcción del AQR scVEGF-Fc clonada el plásmido pCEFL-Fc y sus diferentes regiones de interés. H corresponde a la región bisagra o *Hinge*.

Se obtuvo de esta manera, el anticuerpo recombinante scVEGF-Fc que fue expresado exitosamente manteniendo su capacidad de reconocer al VEGF, verificada por ELISA (datos no mostrados). Su secuencia aminoacídica resultó idéntica a la esperada (Tabla 7).

Secuencia del scVEGF-Fc	
atggggttggtgtggaacctcctgttcctcatggctgccgctcaatcggcccaggcggccgagctcgtg	
M G W L W N L L F L M A A A Q S A Q A A E L V	
atgaccagctcctccatcctcctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcacttgcccccccc	
M T Q S P S S L S A S L G D R V T I T C X X X	
xx	
xx	
XXXXXXXXXXN W Y Q Q K P D G P I K L L I Y	
xx	
XXXXXXXXXXS G V P S R F S G S G S G T D Y S	
ctcaccattagcaacctcgaccgagaagatattgccacttacttttgcccccccccccccccccccc	
L T I S N L D R E D I A T Y F C X X X X X X X	
xxxxxxxctcggtggaggcacaaagctggaaatcaaaggctccacctctggatccggcaagcccgatct	
X X F G G G T K L E I K G S T S G S G K P G S	
ggcgaggggaccadcaagggccaggtgaagctgctcgagtcaggacctgagctgaagaagcctggagag	
G E G S T K G Q V K L L E S G P E L K K P G E	
acagtcaagatctcctgcaaggcttctxxx	
T V K I S C K A S X X X X X X X X X X X X X	
gctccaggaaagggattaaagtggatgggcccccccccccccccccccccccccccccccccccc	
A P G K G L K W M G X X X X X X X X X X X X	
xx	
XXXXXXXXXR F A F S L E T S A S S A Y L Q I S N	
ctcaacaatgaggacacgggtacatatttctgtgcaagggxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	
L N N E D T A T Y F C A R X X X X X X X X X	
xxxxxxxxtgggcgacggacctgctcctcctcaggccaggccggcctcgaaccctcaaatccct	
X X W G A G T S V T V S S G Q A G L E P K S P	
gacaagactcacacatgcccaccgtgccagcactgaaactcctggggggaccgtcagcttctcctctc	
D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F	
cccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg	
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V	
agccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca	
S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T	
aagccgcggggaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggac	
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D	
tggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcctcccagccccctcgagaaacc	
W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T	
atctccaaagccaaagggccagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctg	
I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L	
accaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg	
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W	
gagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttc	
E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F	
ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg	
F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V	
atgcatgaggtctgcacaaccactacagcagaagcctctcctgtctccgggtaataa	
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K -	

Tabla 7. Secuencia aminoacídica del pCEFL-scVEGF-Fc. Los aminoácidos en negrita corresponden a la versión de cadena simple del anti-VEGF, donde se remarcan la región variable de la cadena liviana (amarillo), el péptido conector (verde) y la región variable de la cadena pesada (celeste). El extremo amino terminal corresponde al péptido señal de exportación y la segunda mitad de la secuencia codifica para la región Fc de una IgG1 humana. Los CDRs correspondientes al AM P4F7 están ocultos por razones propietarias.

El mismo procedimiento se realizó con el AQR scFGF-2-Fc que fue expresado en células HEK-293, pero esta versión recombinante de cadena simple del AM DB3 mostró una pérdida muy significativa de la afinidad por su antígeno, ensayado por ELISA. Este hecho, sumado a la falta de efecto farmacológico del AM original denominado DB3 (ver Resultados “Capítulo 4”), provocó la suspensión transitoria de posteriores ensayos con dicha versión.

Efecto neutralizante sobre la proliferación de HUVEC

El scVEGF-Fc fue producido en células HEK-293 de forma similar a la descrita previamente. A partir del sobrenadante de estas células transfectadas con el pCEFL-scVEGF-Fc, el AQR scVEGF-Fc, fue purificado por columna de proteína G y ensayado a distintas concentraciones, sobre la proliferación de HUVEC en forma similar a los ensayos previamente descritos.

Como se observa en la Figura 48, se verificó que esta versión recombinante del AM (P4F7), mantiene su característica neutralizante, dosis-dependiente, sobre el efecto proliferativo del VEGF en las HUVEC.

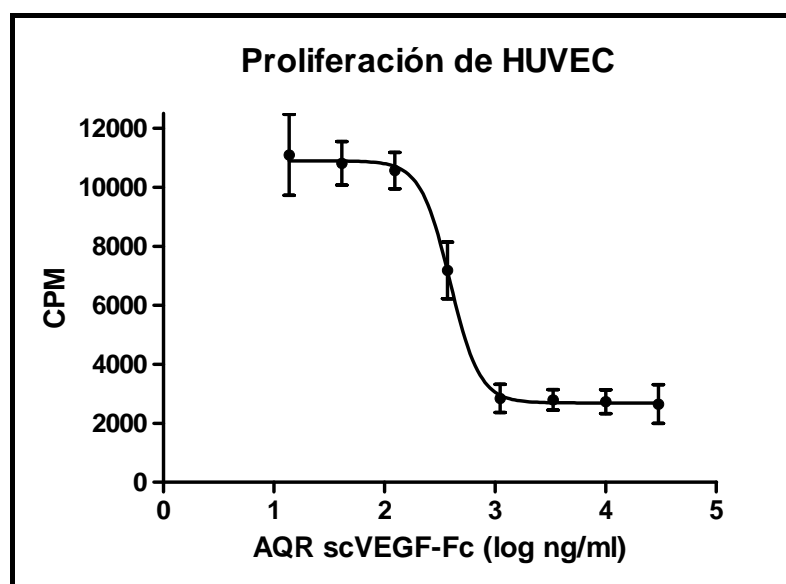


Figura 48. Titulación del efecto neutralizante del AQR-anti-VEGF sobre la proliferación mediada por 5 ng/ml VEGF en HUVEC. Cada valor corresponde al promedio \pm Error Estándar (n=4). La curva es un ajuste por regresión no lineal utilizando el programa *GraphPad Prism 5*.

Estudio sobre el efecto del scVEGF-Fc en el crecimiento tumoral

Como un posible acercamiento a una eventual terapia génica, diseñada para que las células tumorales expresen esta construcción, decidimos evaluar el efecto de la transfección del plásmido pCEFL-scVEGF-Fc en una baja proporción de células de melanoma (IIB-Mel-J), sobre el crecimiento tumoral inducido por estas células en ratones atímicos, en ensayos similares a los descritos en el capítulo anterior.

El protocolo se describe en (Materiales y Métodos 4.7), que brevemente consistió en la inoculación de 3×10^6 células IIB-Mel-J en 4 grupos de 10 ratones cada uno. Los 4 tratamientos se realizaron *in vitro* sobre las células antes de ser inoculadas en los animales y consistieron en: un control con células sin transfectar (control s/transf.); un segundo control en donde 4% de las células fueron transfectadas con el plásmido pCEFL-Fc, que induce la expresión de la porción Fc (control 4% Fc); 4% de células transfectadas con pCEFL-scVEGF-Fc (4% scVEGF-Fc), ó 2% de células transfectadas con el mismo plásmido (2% scVEGF-Fc). En la Figura 49 se observa como la transfección con el pCEFL-scVEGF-Fc, provoca una disminución del crecimiento tumoral con respecto al control transfectado con pCEFL-Fc (4% Fc), incluso cuando el scVEGF-Fc, fue expresado inicialmente por solo el 4% (4% scVEGF-Fc) o el 2 % (2% scVEGF-Fc), en las células de melanoma inoculadas.

El estudio estadístico se realizó sobre los pesos tumorales una vez finalizado el ensayo (Figura 50), concluyendo que la expresión del scVEGF-Fc en solo el 2 o el 4 % de las células reduce significativamente el crecimiento tumoral. En un examen de la zona tumoral interna, antes de extirpar los tumores, se aprecia que los tumores presentaron una marcada disminución en su vasculatura intra y peritumoral (Figura 51).

En la Figura 52 se presentan imágenes fotográficas de todos los tumores del grupo control (control 4% Fc) y del grupo 4% scVEGF-Fc (rotulados como 4% SCV-Fc), donde se aprecia que a pesar de la alta variabilidad en los tamaños tumorales dentro de un mismo grupo, existen notables diferencias de tamaños entre grupos. Incluso, mientras que en ambos controles todos los ratones generaron tumores (10 ratones por grupo), dos de los animales correspondientes al grupo 4% scVEGF-Fc nunca desarrollaron tumores, en adición a esto, en el grupo 2% scVEGF-Fc 3 animales no generaron tumores.

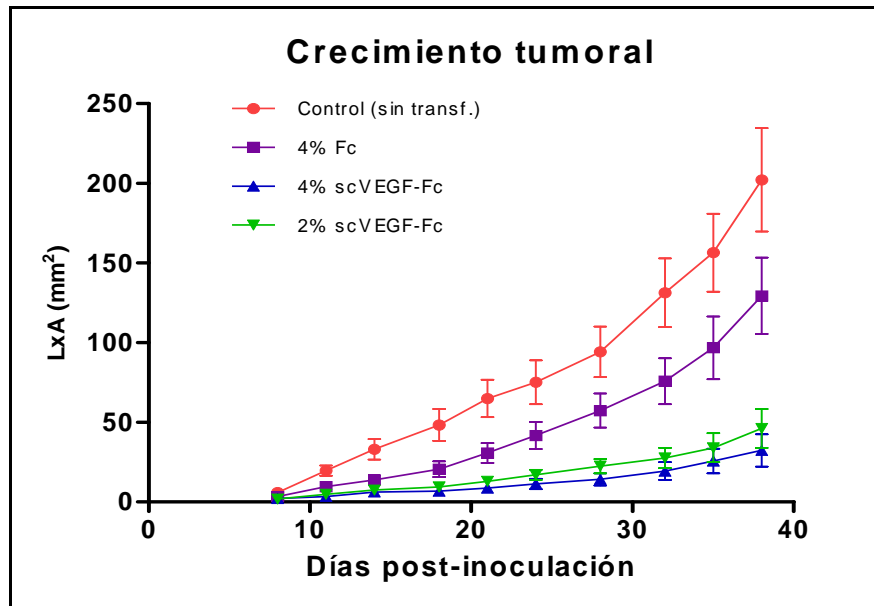


Figura 49. Crecimiento tumoral inducido por células de melanoma IIB-Mel-J. Las determinaciones del tamaño tumoral, fueron realizadas 2 veces por semana. Cada valor corresponde a la media del LxA ± Error Estándar (n=10).

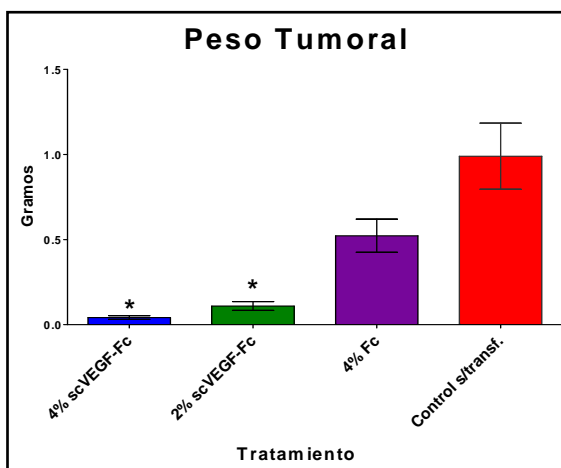


Figura 50. El histograma corresponde al promedio de los pesos de los mismos tumores ± Error Estándar una vez finalizado el ensayo. * Diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al control (4% Fc).

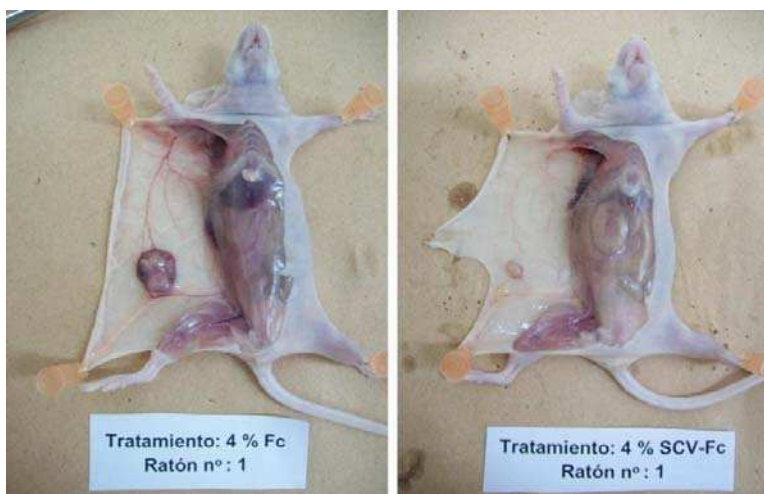
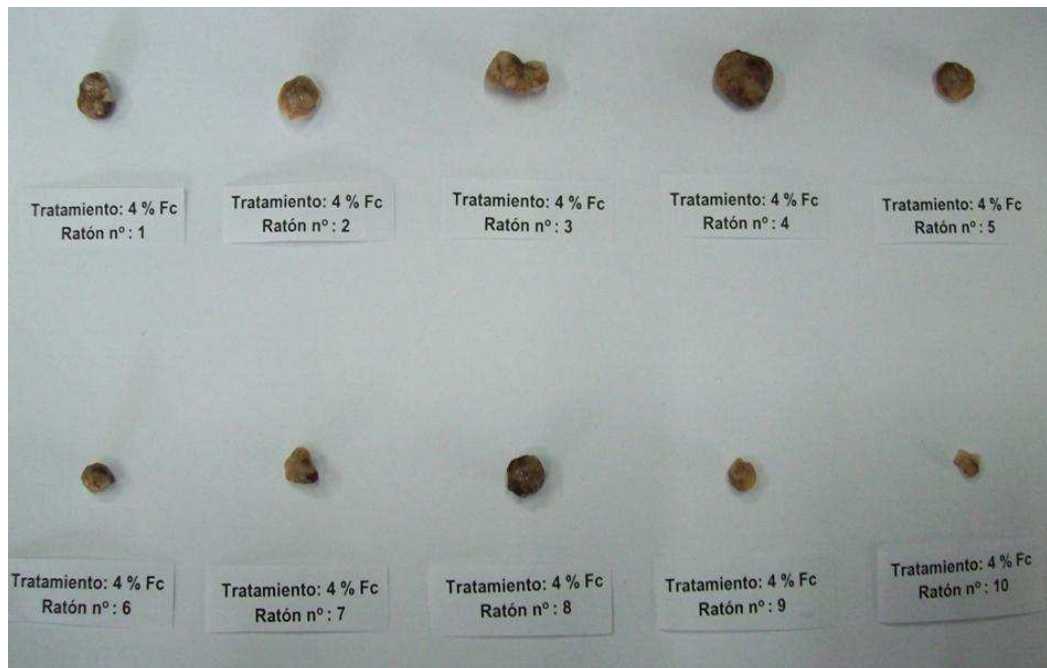


Figura 51. Imagen interna del tumor de un animal control (4% Fc, izquierda) y uno tratado (4% scVEGF-Fc = SCV-Fc, derecha) antes de su extirpación. Nótese la disminución en la arquitectura vascular en el ratón tratado con la versión recombinante, comparado con el control.

a)



b)

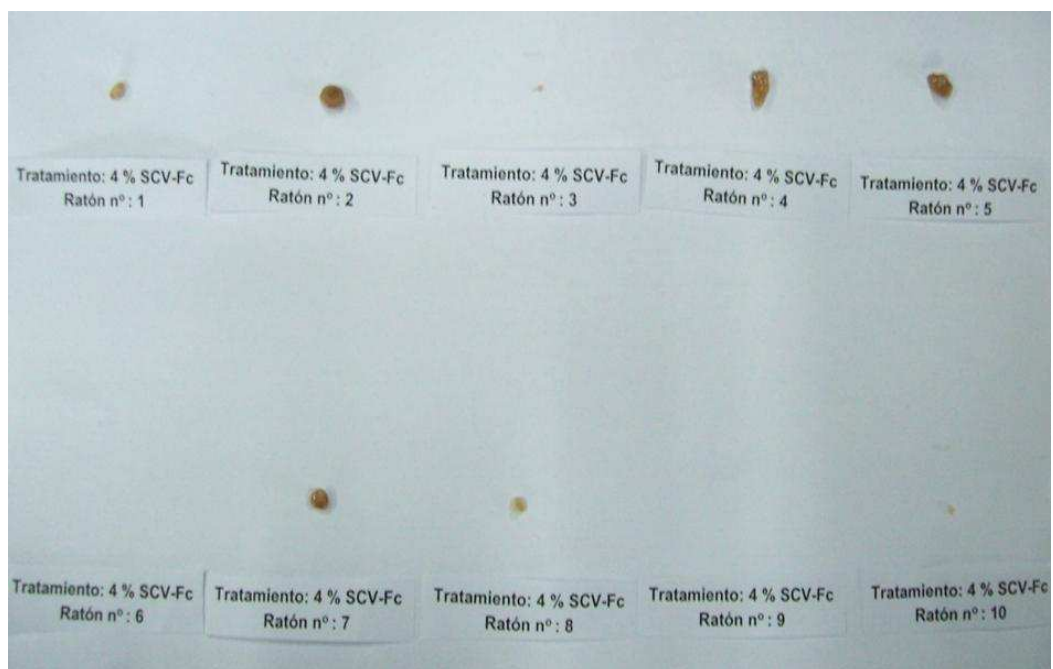


Figura 52. Foto general de los tumores generados por las células de melanoma IIB-Mel-J, extraídos una vez finalizado el ensayo a la quinta semana (n=10). A) Tumores del grupo Control (4% Fc) donde el 4% de las células fueron transfectadas con un plásmido control (pCEFL-Fc). B) Tumores tratados (4% scVEGF-Fc, rotulado en la foto como 4% SCV-Fc), donde el 4% de las células fueron transfectadas con el plásmido pCEFL- scVEGF-Fc, en este ultimo grupo no se detectó la presencia de tumores en los ratones 6 y 9, por lo que los espacios correspondientes están vacíos.

Conclusiones del capítulo 5

Logramos clonar las regiones variables de las cadenas liviana y pesadas de los dos anticuerpos monoclonales (P4F7 y DB3), en las versiones Fab e identificamos sus *CDRs*. Conociendo sus secuencias, diseñamos *primers* que nos permitieron obtener AMs en versiones de cadena simple (un solo gen).

La construcción de cadena simple derivada del AM DB3 (anti-FGF-2), mostró una pérdida de su afinidad por el antígeno. Sin embargo, el AQR scVEGF-Fc, derivado del AM P4F7 (anti-VEGF), mantuvo sus características bloqueantes de la acción proliferativa del VEGF sobre las HUVEC.

Además, en el ensayo *in vivo*, demostramos que dicha construcción (scVEGF-Fc), al ser expresada en un bajo porcentaje de células tumorales inyectadas en ratones atímicos, exhibió un efecto anti-angiogénico y redujo significativamente el crecimiento tumoral. Por lo que comprobamos que sería factible instaurar una terapia génica de bloqueo del VEGF, en donde aún cuando un bajo porcentaje de células tumorales expresaran esta construcción (scVEGF-Fc), resultaría suficiente para ejercer un significativo efecto antitumoral.

DISCUSIÓN

Como parte de un proyecto general del laboratorio tendiente a diseñar una terapéutica antiangiogénica combinada para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, en este trabajo nos centramos en el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AMs) neutralizantes de la actividad pro-angiogénica del VEGF y el FGF-2 humanos, sobre las células endoteliales y la evaluación de su posible efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral inducido por distintas líneas de melanoma.

Para desarrollar los AMs neutralizantes para cada factor, el primer objetivo fue producir el VEGF y el FGF-2 en el laboratorio para obtener la masa y pureza necesarias para ser empleados como antígenos para las inmunizaciones efectuadas en ratones Balb/C, ambos factores también se utilizaron para diversos ensayos de ELISA y proliferación de células endoteliales (HUVEC), entre otros.

El VEGF humano fue expresado en bacterias (*E. Coli*), a partir del plásmido pET-15b-VEGF₁₆₃ cedido por el Dr. E. Mesri, el factor fue expresado y purificado de cuerpos de inclusión y renaturalizado (*refolding*). De esta manera, se obtuvo el VEGF con un rendimiento en “*batch*” de 10 mg por litro de cultivo, la pureza estimada fue del 90% y su actividad biológica sobre las células endoteliales fue similar al VEGF recombinante comercial.

El FGF-2 en cambio, fue obtenido por un procedimiento realizado íntegramente en nuestro laboratorio, con técnicas que involucraron su clonado en el vector pET-20, a partir del ARNm proveniente de las células HT-29, su expresión en forma recombinante en *E. Coli* y su purificación, de manera que conserve su actividad biológica. La metodología desarrollada permitió la obtención de FGF-2 humano con un rendimiento en “*batch*” de 90 mg por litro de LB, superior a cualquier otro descrito en la bibliografía. Su pureza fue mayor al 95% y su actividad biológica similar o incluso superior a FGF-2 recombinantes comerciales.

Continuando con los objetivos de este trabajo, ambos factores fueron utilizados como antígenos para las inmunizaciones de ratones y los hibridomas productores de AMs fueron generados siguiendo la metodología tradicional descrita por G. Kohler y C. Milstein en 1975 [163]. Es importante aclarar, que si bien se utilizó la misma metodología para ambas series de hibridomas (Materiales y Métodos 2.2), los AMs anti-VEGF se desarrollaron y comenzaron a evaluar *in vivo* cronológicamente antes que los

AMs anti-FGF-2. Para ambas series de AMs, la selección de los hibridomas se basó no sólo en la propiedad de sus sobrenadantes para reconocer al VEGF o el FGF-2 por ELISA, sino también, por su capacidad para inhibir la proliferación de células endoteliales HUVEC inducida por cada factor.

De los diversos hibridomas secretores de AMs anti-VEGF originalmente analizados, cinco fueron finalmente seleccionados por su capacidad neutralizante, su estabilidad en cultivo y su capacidad secretora.

A través de ensayos específicos en formato de ELISA, se determinó el isotipo de los AMs obtenidos. Este análisis reveló la presencia de dos clases de inmunoglobulinas distintas secretadas por los hibridomas seleccionados, P1G4, P5D9 y P4F7 que producen AMs de isotipo IgG1, mientras que P2H3 y P1E10 generan AMs de isotipo IgG2a. Asimismo, todos los AMs poseen cadena liviana κ que es la más común entre las inmunoglobulinas de ratón, representada por el 90% de las inmunoglobulinas totales.

En los ensayos de *Western blot* se observó que el reconocimiento del VEGF por parte de los AMs es específico, no observándose reacción cruzada al menos con los componentes mayoritarios del suero fetal bovino. Por su parte, el ensayo de titulación por ELISA mostró que este reconocimiento es dosis-dependiente y altamente similar para los 5 AMs estudiados.

Al estudiar los parámetros cinéticos de estos AMs, con el objetivo de seleccionar aquellos con mejores características para una eventual terapia inhibitoria de la angiogénesis, se optimizó un procedimiento simple para el análisis de las constantes de afinidad, basado en un ensayo de competencia por el antígeno, en un formato de ELISA de competencia. Las K_D calculadas por dicho ensayo, son de utilidad para comparar los AMs entre sí, pero deben ser interpretadas como afinidades relativas porque en principio, se despreció el carácter dimérico del antígeno. Estos estudios demostraron que la serie de AMs obtenidos poseen una afinidad por el VEGF, del orden subnanomolar. En particular no se observaron diferencias significativas entre el grupo de las IgG1 ($K_d \sim 0,20$ nM), ni entre el grupo de las IgG2a ($K_d \sim 0,35$ nM). Sin embargo, los cálculos estadísticos indican que las constantes de disociación de las IgG2a, son levemente superiores a las de cualquiera del grupo de las IgG1. Por otro lado, el método utilizado no es adecuado para $K_d < 1$ nM, por lo que solo serviría a nivel comparativo. Para obtener la afinidad real decidimos emplear procedimientos más sensibles, es así que los AMs fueron analizadas por el sistema BIAcore en colaboración con el Dr. Johan Hoebeke (Immunologie et Chimie Thérapeutiques, UPR9021, du

C.N.R.S. I.B.M.C., Estrasburgo, Francia). Este método pondera la velocidad de asociación (k_{ON}) y de disociación (k_{OFF}) del AM con su antígeno, en tiempo real permitiendo calcular la constante de afinidad de un anticuerpo ($K_a = k_{ON} / k_{OFF}$). Se obtuvieron valores de k_{ON} del orden de $1-2 \cdot 10^6$ M, pero no se pudo determinar la k_{OFF} debido a que los AMs no se disociaron del VEGF en las condiciones estudiadas, ello indica que los anticuerpos poseen constantes de afinidad muy altas. Por otro lado, los sensogramas de los AMs también mostraron curvas de asociación atípicas, características de afinidades con cooperativismo positivo que podrían estar relacionadas con el carácter dimerico del antígeno. En tal sentido, la unión de un AM a una de las subunidades del VEGF podría estar produciendo un cambio conformacional en la otra, que favorecería la unión de un segundo anticuerpo o del mismo AM a través de su otro sitio. El ensayo de afinidad por BIAcore fue repetido recientemente por el Dr. E. Malchiodi (FFyB, UBA), para el AM seleccionado (P4F7) inmovilizando sobre el sensor al VEGF, en lugar de inmovilizar al AM a través de otro anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón como se había realizado previamente en Francia, metodología que en teoría permite calcular afinidades mayores. Nuevamente fue imposible calcular una k_{OFF} ya que no se halló una condición en la que el AM se disocie de su antígeno, confirmando la muy alta afinidad del AM P4F7, por su antígeno. Aunque la afinidad del AM (P4F7) hasta el momento no se ha podido determinar con precisión ambos especialistas coinciden en que ésta sería superior a 10^{11} M, confiriéndole a nuestro AM una propiedad singular.

Estos estudios de afinidades determinaron que todos los AMs reconocen al VEGF con afinidades muy altas y similares, aunque no idénticas, dado que detectamos diferencias significativas entre los AMs de distinto isotipo. Tomados en conjunto, estos resultados nos llevan a pensar que las células activadas que originaron estos hibridomas podrían provenir *in vivo* de un mismo clon de pre-linfocito B que luego sufrió un cambio (*switch*) de clase, distinto hacia los dos isotipos encontrados, acompañado de una maduración diferente de la afinidad por mutaciones somáticas de las zonas hipervariables.

Cuando se estudió la especificidad del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación de células HUVEC, se corroboró que todos los anticuerpos estudiados causan inhibición del crecimiento de células HUVEC, específicamente cuando su proliferación fue estimulada con el VEGF. Sin embargo, cuando el cultivo fue

suplementado con FGF-2, no se observaron diferencias en la proliferación por el agregado de los AMs. Ello confirma que la acción de los AMs fue específica neutralizando la actividad del VEGF.

Con el ensayo de titulación del efecto neutralizante de los AMs sobre la proliferación mediada por VEGF en células endoteliales y un análisis de regresión no lineal, se calculó la concentración de AM que causa el 50 % de inhibición de la proliferación de las HUVEC (IC_{50}). Se deduce de las regresiones graficadas, una similitud en el comportamiento entre P4F7, P1G4 y P5D9, como así también, entre las Igs de isotipo IgG2a (P2H3 y P1E10). Asimismo, estas similitudes se repiten cuando se calculan las concentraciones IC_{50} , en las que se obtuvieron valores del orden de 10-30 ng/ml para las IgG1 y del orden de 40-70 ng/ml para las IgG2a. Estos resultados nos sugerirían que una mejor afinidad podría correlacionarse con una mayor potencia inhibitoria del AM anti-VEGF, suponiendo que los AM están dirigidos contra un mismo epítipo. Por otro lado, todos los anticuerpos mostraron valores de IC_{50} aproximadamente un orden menor que el anticuerpo comercial bloqueante de VEGF (R&D Systems).

Una vez determinada la capacidad neutralizante de todos los AMs anti-VEGF procedimos a establecer si los resultados *in vitro*, podrían proyectarse a modelos de angiogénesis *in vivo*. Debido a que ensayos por *Western blot* y ELISA determinaron que ninguno de los anticuerpos fueron capaces de reconocer al VEGF murino, decidimos utilizar un modelo *in vivo* con líneas celulares neoplásicas humanas xenotransplantadas en ratones atímicos.

Continuando con el objetivo de seleccionar el mejor AM bloqueante del VEGF, el primer ensayo de inhibición de angiogénesis se realizó inoculando células IIB-Mel-J en ratones atímicos y evaluando el efecto de los cinco AMs anti-VEGF. Los resultados mostraron que todos los AMs redujeron en forma significativa ($p < 0,01$) la angiogénesis inducida por dicha línea celular (Figura 24 y 25), con respecto al control donde los animales fueron inyectados solo con PBS. No se encontraron diferencias significativas entre los AMs analizados. A pesar de esto, en función de los estudios de afinidad por ELISA de competencia (Tabla 3), las determinaciones de los valores IC_{50} en cuanto a la inhibición de la proliferación de HUVEC (Figura 23), y que el hibridoma P4F7 resultó *in vitro* productor de un mayor título de AMs que el P1G4 (datos no mostrados), nos permitió seleccionar al AM P4F7 como el de mejor actividad bloqueante del VEGF para continuar con los ensayos.

El AM P4F7 utilizado en estudios subsiguientes, fue producido por la administración por vía ip del hibridoma en ratones Balb/C, generándose líquido ascítico con elevado título del AM. El mismo fue purificado y evaluado sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral inducido por las células IIB-Mel-J y HT-29, ésta última derivada de un adenocarcinoma de colon, patología sobre la cual el AM Bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche), había mostrado un efecto terapéutico [206]. Tanto los ensayos de angiogénesis (Figura 27), como los de crecimiento tumoral (Figura 28 y 29), mostraron un efecto significativo del AM sobre la disminución de la angiogénesis y del crecimiento tumoral, que en ambos ensayos fue más marcado para los tumores inducidos por las células IIB-Mel-J que para los inducidos por las células HT-29. Ello podría deberse a que las primeras estimularían la angiogénesis a través de otros factores además del VEGF. En este sentido, fue descrito que las células HT-29 también expresan FGF-2 [191, 192], datos complementarios describen al FGF-2 como el segundo factor pro-angiogénico en importancia, después del VEGF (ver Introducción). Dado que son dos líneas celulares de estirpes diferentes (melanoma y adenocarcinoma de colon), podrían ser muchas las variables que justificarían las diferencias observadas con el tratamiento anti-VEGF. Debido a ello, los ensayos posteriores *in vivo* se realizaron con las células IIB-Mel-J y otras líneas de melanoma humano mejor caracterizadas como: A375 y 1205Lu, las cuales también se sabe que expresan FGF-2 [207, 208].

Existen en la literatura varios AMs bloqueantes de la actividad biológica del VEGF, entre estos se destacan el A.4.4.1 previamente descrito [209] que una vez humanizado dio origen al Bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche) y el MV833 [210]. Ambos presentan capacidad de inhibir la proliferación dependiente del VEGF en células endoteliales y el crecimiento tumoral en ratones atómicos. En particular, el A.4.6.1 posee un IC₅₀ de 50 ng/ml para inhibir 2 ng/ml de VEGF en células endoteliales derivadas de capilares de la corteza adrenal bovina [211], mientras que MV833 exhibe una IC₅₀ de 440 ng/ml en células HUVEC estimuladas con 50 ng/ml de VEGF [210]. La potencia inhibitoria *in vitro* del AM P4F7 a juzgar por su IC₅₀ de 15 ng/ml para inhibir 10 ng/ml de VEGF, indicaría que podría ser más eficiente en cuanto a su capacidad bloqueante que los anticuerpos previamente mencionados.

Como los ensayos no son estrictamente comparables, recientemente hemos comparado la potencia inhibitoria del Avastin con la del AM P4F7 en el modelo de proliferación de HUVEC (Figura 31), estimulada con 5 ng/ml de VEGF. La IC₅₀ del AM P4F7 (11 ± 2 ng/ml), resultó significativamente inferior a la del AM Avastin (54 ±

12 ng/ml), lo que indicaría que nuestro AM-P4F7 posee 5 veces mayor potencia inhibitoria que el Avastin aunque igual eficacia.

Nosotros pensamos que el AM P4F7 estaría reconociendo el mismo o similar epítotope que el Avastin, ya que este tampoco reconoce a la molécula murina [212]. A través del uso de mutantes de VEGF, generados por “*scanning*” de alaninas, estos autores determinaron que el epítotope reconocido por el Avastin se encuentra en la misma región involucrada en activar al VEGFR2 y comprende la secuencia R₈₂IKPHQGHIGE₉₃ [213]. Al comparar esta secuencia con su homóloga murina, sólo se observa una diferencia en la glicina 88 que es remplazada por una serina en la versión murina. De esta forma, el cambio de un solo aminoácido, el cual no influye en la actividad biológica de esta molécula, es suficiente para que el AM no sea capaz de reconocerlo. Dado que reconocerían el mismo epítotope, la diferencia en la potencia inhibitoria (IC₅₀), entre ambos anticuerpos podría atribuirse a la mayor afinidad exhibida por este AM (P4F7), con una K_D del orden pM o menor, que contrasta con los valores de K_D de 1,8 nM reportada para el Bevacizumab [211] y refuerza la idea que nuestro AM podría exhibir una performance superior en tratamientos antiangiogénicos. Por otra parte, tanto A.4.6.1 como MV833, han sido capaces de inhibir la proliferación de un gran número tumores inducidos por células neoplásicas humanas, empleando generalmente dosis de 100 a 300 µg semanales por ratón. En tal sentido, nuestros trabajos indican que el AM-P4F7, es capaz de inhibir significativamente la proliferación de melanoma humano xenotransplantado en ratones atímicos, en activo crecimiento, con dosis de 20 µg/semanales por ratón (repartida en 2 dosis semanales de 10 µg).

Siguiendo con los objetivos de este trabajo y utilizando la misma metodología empleada para la generación de los AMs anti-VEGF, se inmunizaron ratones con el FGF-2, clonado y purificado como se indicó, generándose hibridomas productores de AMs capaces de inhibir la acción mitogénica del FGF-2 sobre las células endoteliales.

Inicialmente, se obtuvieron ocho hibridomas que mostraron una actividad bloqueante específica de la proliferación de células HUVEC al ser estimulada por FGF-2, pero no por EGF. Dado que tres de estos hibridomas dejaron de expresar los AMs con los sucesivos repiques, proseguimos los ensayos con los cinco hibridomas restantes (DB3, DA2, DA1, CC12 y AC11). A diferencia del VEGF, que es un dímero y activa directamente a su receptor (VEGFR2 o KDR), al provocar su dimerización con la consecuente activación de sus dominios tirosina-quinasa, el FGF-2 es un monómero con dos dominios de unión a heparán-sulfato y requiere de la presencia del heparán-sulfato

de proteoglicanos de la membrana celular para dimerizarse para así activar a su receptor (FGFR). Por esto, un AM que bloquee la interacción del FGF-2 con el heparán-sulfato, podría inhibir la activación del FGFR *in vitro*, donde se considera que el heparán-sulfato es limitante, pero no *in vivo* donde se encontrarían en exceso. Para dilucidar esta incógnita, realizamos un ensayo de inhibición de la proliferación de HUVEC en presencia de heparina (Figura 33), en donde se verificó por un lado que el agregado de heparina disminuyó parcialmente la proliferación de HUVEC estimulada por FGF-2, y por otro parte, revirtió el efecto neutralizante de dos de los AMs preseleccionados (CC12 y AC11), que fueron descartados como agentes antineoplásicos por los motivos ya mencionados. Sin embargo, como se menciona en la introducción, el FGF-2 se une en condiciones naturales a una extensa y creciente lista de otras proteínas y glucanos [67, 100] lo que hace imposible inferir el efecto *in vivo* de los AMs seleccionados como neutralizantes de la proliferación de células endoteliales *in vitro*.

Continuando con la caracterización bioquímica de los tres AMs anti-FGF-2 restantes (DB3, DA2 y CC12), se determinaron los isotipos, que resultaron similares, con una cadena pesada del tipo IgG1 y una cadena liviana κ . Por ser el FGF-2 un monómero y porque los AMs mostraron afinidades “normales” en ensayos preliminares, se determinó la afinidad de estos AMs por ELISA de competencia, obteniéndose valores de K_D del orden nM para los 3 AMs: 1.2 ± 0.15 nM (DB3), 2.5 ± 0.27 nM (DA2) y 1.8 ± 0.16 nM (CC12).

La titulación de las concentraciones de los AMs necesaria para inhibir la acción mitogénica del FGF-2 sobre las HUVEC, mostró que todos los AMs seleccionados fueron capaces de neutralizar la acción del FGF-2 en forma dosis-dependiente (Figura 36). A través de un análisis de regresión no lineal se calculó la concentración de AM que causa un 50 % de inhibición de la proliferación de HUVEC (IC_{50}). Se obtuvieron valores de IC_{50} de 33 ng/ml (DB3), 76 ng/ml (DA2) y 186 ng/ml (CC12). En función de este resultado y considerando el valor de afinidad, se seleccionó al AM DB3 como el de mayor eficacia bloqueante de la acción biológica del FGF-2 sobre las células endoteliales. Cabe destacar que a diferencia de la serie de AMs anti-VEGF, que posiblemente están dirigidos contra un mismo o similar epítipo por lo que su mayor afinidad se correlacionaba con su potencia inhibitoria (IC_{50}), en los AMs anti-FGF-2, si bien el denominado CC12 mostró una mayor afinidad que el DA2, este último exhibió una mayor potencia inhibitoria (IC_{50}), datos que indicarían que ambos AMs, reconocerían distintos epítopos.

Finalmente, los AMs seleccionados; anti-VEGF (P4F7) y anti-FGF-2 (DB3), fueron purificados con una columna de proteína G a partir del fluido ascítico de ratones inyectados con células de ambos hibridomas con un buen rendimiento, obteniéndose productos de adecuada pureza que conservaron su capacidad para reconocer a su correspondiente antígeno en ensayos por ELISA. Los AMs fueron conservados en una concentración de 1mg/ml, evitando así la adición de BSA. Asimismo, los AMs fueron mantenidos en condiciones estériles a 4°C sin el agregado de agentes bactericidas que pudieran eventualmente influir en los posteriores ensayos *in vitro* o *in vivo*. A través de ensayos controles periódicos (ELISA, A₂₈₀, SDS-PAGE, etc.), esta forma de almacenamiento resultó adecuada para la estabilidad de nuestros AMs durante este trabajo.

Una vez alcanzado el principal objetivo de este trabajo, que consistió en desarrollar y seleccionar los AMs neutralizantes para ambos factores angiogénicos, comenzamos con la caracterización *in vitro* de tres líneas de melanoma humana (IIB-MEL-J, 1205Lu y A375), como paso previo a la evaluación del efecto terapéutico de los AMs sobre el crecimiento tumoral inducido por dichas células. Tales líneas celulares fueron capaces de formar tumores en ratones atómicos en ensayos preliminares y se conoce que expresan múltiples factores pro-angiogénicos entre los que se destaca el FGF-2 [207, 208].

Primero evaluamos si la proliferación de estas células resultaba afectada en cultivo por el tratamiento con VEGF o FGF-2 exógeno. Como muestra la Figura 37, la proliferación de las células IIB-Mel-J fue estimulada significativamente por FGF-2 y exhibió una tendencia similar con el agregado de VEGF, aunque no significativa. Las células A375 tratadas con VEGF, incrementaron su proliferación como fuera descrito [155], aunque la estimulación con FGF-2 no fue significativa. Por otro lado, las células 1205Lu fueron estimuladas con FGF-2, pero no con VEGF.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, decidimos evaluar si la estimulación con los factores endógenos actuando autocrínamente ejercían algún efecto sobre su proliferación. Para ello, utilizamos los AMs neutralizantes anti-VEGF P4F7 y anti-FGF-2 DB3, en un ensayo de proliferación de células de melanoma *in vitro*, sin el agregado de factores exógenos, en presencia o ausencia de SFB (Figura 38). Ambos AMs, no mostraron efecto sobre la proliferación de las líneas de melanoma con la excepción del anti-FGF-2 DB3, que indujo una leve aunque significativa disminución, en la proliferación de las células 1205Lu en ausencia de SFB.

En forma paralela, decidimos evaluar la expresión de VEGF y FGF-2 en las líneas celulares mencionadas a partir de los sobrenadantes de cultivo empleando un ELISA sándwich desarrollado durante el presente trabajo, este ensayo emplea dos anticuerpos específicos contra cada factor. El FGF-2 no pudo ser detectado a partir del sobrenadante de cultivo debido a su ausencia o que se encontraría por debajo del límite de sensibilidad de la técnica (200 pg/ml). Por otro lado, el VEGF pudo ser cuantificado en el sobrenadante. Los niveles de expresión basales del VEGF fueron significativamente mayores en las líneas IIB-MEL-J y 1205Lu comparadas con A375 y no se detectó expresión basal en las HUVEC (Figura 39). En el caso del FGF-2, se cuantificó en extractos celulares, encontrando que dos de las líneas: A375 y 1205Lu, sobre-expresan este factor en comparación con las HUVEC e IIB-Mel-J (Figura 40). En conclusión, las tres líneas de melanoma exhiben distintos niveles de expresión de los factores pro-angiogénicos de interés, mientras IIB-Mel-J, expresa altos niveles de VEGF y bajos de FGF-2, A375, como fuera descrito, expresa altos niveles de FGF-2 y bajos de VEGF y las células 1205Lu, expresan altos niveles de ambos factores. Tal como se mencionó en la introducción (ver “Estructura del FGF-2”), existen distintas isoformas del FGF-2 que poseen diferente localización celular. La cuantificación por ELISA sándwich a partir de extractos celulares, no discrimina entre estas isoformas, debido a que ambos anticuerpos están dirigidos contra la isoforma de menor peso molecular, cuya secuencia aminoacídica se incluye dentro de las de mayor peso molecular. Por tal motivo, decidimos estudiar la localización del FGF-2 por técnicas de inmunofluorescencia. Para ello utilizamos el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando el anticuerpo policlonal anti-FGF-2 desarrollado en el laboratorio, que fue revelado con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy-3. En correlación con lo observado por ELISA, las células de la línea IIB-Mel-J, exhibieron una tinción uniforme para FGF-2, marcadamente inferior a la observada en las líneas celulares A375 y 1205Lu. En forma inesperada, esta diferencia se observó principalmente a nivel nuclear, por lo que inferimos que las isoformas de alto peso molecular del FGF-2 y de localización nuclear, serían las responsables de la diferencia observada en la expresión de FGF-2 por ELISA a partir de extractos celulares. Además, ello podría explicar la ausencia o baja expresión de FGF-2 en los sobrenadantes de cultivo incluso en las líneas que lo sobre-expresaban (A375 y 1205Lu). Cabe destacar que se evaluaron sobrenadantes de cultivo de varias líneas neoplásicas humanas como:

HT-29 y MDA MB 231 entre otras, no detectándose FGF-2 en el sobrenadante de cultivo en ninguno de los casos.

A pesar de no poder detectar el FGF-2 secretado en ninguna de las líneas neoplásicas evaluadas, consideramos que éste se secretaría por mecanismos aún no esclarecidos, independientes del aparato de Golgi, en niveles por debajo del límite de detección de la técnica empleada, aunque igualmente podría estar ejerciendo funciones angiogénicas paracrinas sobre las células endoteliales que serían bloqueadas por el AM anti-FGF-2.

Debido a ello, comenzamos a evaluar la hipótesis central de este trabajo basada en que el bloqueo de ambos factores podría resultar en una mayor inhibición de la angiogénesis y por consiguiente del crecimiento tumoral. Para esto, realizamos ensayos *in vivo* en ratones atímicos inoculados con las tres líneas de melanoma humano (IIB-Mel-J, A375 y 1205Lu). Una vez que los tumores fueron palpables, los animales portadores de cada línea de melanoma fueron separados en 4 grupos de 6 animales. Cada grupo fue tratado con cada uno de los AMs por separado (10 µg de P4F7 o 200 µg de DB3), la combinación de ambos AMs o PBS como control. El tratamiento con el AM anti-VEGF P4F7 ejerció un efecto inhibitorio de la progresión tumoral inducida por todas las líneas ensayadas, pero nuevamente, mostró una efectividad mayor en los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (Figura 42), que en los inducidos por las restantes líneas celulares (A375 y 1205Lu). Por otro lado, el bloqueo del FGF-2 no mostró efectos significativos sobre el crecimiento tumoral inducido por las líneas empleadas, ni mejoró el efecto terapéutico del bloqueo de VEGF al ser ensayados en forma combinada. Este último tratamiento solo mostró una tendencia a disminuir el crecimiento tumoral, comparando con la aplicación del anti-VEGF en forma individual, en los tumores generados por la línea 1205Lu. Aunque las diferencias no resultaron significativas (Figura 43) este resultado se podría correlacionar con la disminución que mostró el anti-FGF-2 sobre la proliferación *in vitro* de la misma línea celular en ausencia de suero (Figura 38 c).

El análisis estadístico se realizó valorando los pesos de los tumores una vez finalizado el ensayo (Figura 45). De dicho gráfico se deduce que el tratamiento anti-VEGF muestra una tendencia a ser más eficaz en los tumores generados por las células IIB-Mel-J, a juzgar por el porcentaje de inhibición en los pesos tumorales. Mientras que el tratamiento con el AM P4F7 produjo una inhibición de aproximadamente el 90% en el peso de los tumores generados por la línea IIB-Mel-J, el porcentaje de inhibición para

los tumores generados por las otras líneas fue de aproximadamente el 50% cuando se aplicó el mismo tratamiento. Y aunque esta diferencia en la eficacia del tratamiento no resultó estadísticamente significativa, presumiblemente porque se necesitaría un mayor número (n) de ratones, también fue observada en ensayos *in vivo* previamente descritos (ver Resultados “Capítulo 2”) y en ensayos preliminares que se realizaron en forma similar a los aquí descritos, aunque empleando dosis menores (50 µg) del AM anti-FGF-2, e igual dosis (10 µg) del AM anti-VEGF, en donde se observó la misma tendencia (datos no mostrados).

La falta de efecto terapéutico *in vivo* del AM anti-FGF-2 sobre el crecimiento tumoral en ratones portadores de melanoma, tanto en su uso como monoterapia o en combinación con el AM anti-VEGF, sugeriría una aparente discrepancia entre los resultados obtenidos y la hipótesis de este trabajo al menos en el caso de melanoma, donde el FGF-2 no parece tener un papel importante en la angiogénesis y por ende en el crecimiento tumoral.

Sin embargo, numerosas variables podrían afectar la actividad del AM anti-FGF *in vivo*, por lo que consideramos que la hipótesis aún no puede ser rechazada. Como se mencionó en la introducción, el FGF-2 proviene de varias fuentes, no solo de las células tumorales, es así que se considera que la matriz extracelular es el principal reservorio de este factor estimándose entre 10 y 500 ng de FGF-2 por ml de tejido [214]. Dado que el AM DB3 también neutralizaría el FGF-2 murino, aunque con menor afinidad, de acuerdo con los ensayos de ELISA (datos no mostrados), una posible explicación de la falta de actividad *in vivo* del AM anti-FGF-2, podría estar relacionada con la gran cantidad de FGF-2 extracelular que retendría a la mayoría del AM, no alcanzando a neutralizar la angiogénesis tumoral. Sin embargo, ésto fue descartado cuando comprobamos que una semana después de inyectar 200 µg del AM DB3 en un animal, el nivel sérico del AM pudo detectarse por ELISA (datos no mostrados). Otra posibilidad no evaluada y dado que el AM se encuentra soluble en el suero después de una semana de ser administrado, es que este AM este reconociendo un epítipo del FGF-2 que se encuentre de alguna forma “protegido” *in vivo* por su asociación con un glucósido distinto a la heparina o a una proteína, como la FGFBP (FGF *binding protein*), extensamente estudiada en la actualidad [67].

Si bien no hay dudas de que las funciones angiogénicas del FGF-2 son ejercidas en forma autocrina y paracrina sobre receptores de membrana de las células

endoteliales, por lo que debería ser pausable de ser neutralizadas por el AM, la alta complejidad del sistema FGF-2/FGFRs y la creciente cantidad de moléculas que intervienen, podrían entorpecer la obtención de estos anticuerpos neutralizante efectivos *in vivo*. Por tal motivo pensamos organizar la búsqueda o *screening* de nuevos AMs neutralizantes del FGF-2 en un modelo *in vivo*.

A pesar de que los AMs anti-FGF-2 aún no hayan tenido el efecto terapéutico esperado, fueron de utilidad para la cuantificación de este factor, encontrando una asociación entre la expresión de las isoformas de localización nuclear y la mayor resistencia a la terapia antiangiogénica por el efecto bloqueante del VEGF. Si bien el efecto neutralizante del VEGF con nuestro AM (P4F7) fue observado en todas las líneas ensayadas, marcó una gran diferencia en la respuesta dependiendo si las líneas de melanoma sobre-expresaban o no FGF-2. Es así que las líneas que sobre-expresaban FGF-2 (A375 y 1205Lu) mostraron una mayor resistencia a la terapia anti-angiogénica (anti-VEGF). En este sentido, la creciente bibliografía sobre el tema, sugiere que el FGF-2, en particular las isoformas de alto peso molecular, tendrían un papel fundamental sobre la proliferación y supervivencia de los melanoma actuando de una forma intracrina, no pudiendo ser bloqueada con AMs [71]. En particular, las isoformas de FGF-2 de alto peso molecular, tienen una señal de localización nuclear, y se ha comenzando a relacionar a estas isoformas con la resistencia a distintas terapias antineoplásicas [72, 89].

Al comienzo de esta Tesis se hipotetizaba que la sobre-expresión de FGF-2 en los melanoma podría otorgarle mayor resistencia a las terapias anti-angiogénicas, por ser también otro factor pro-angiogénico y que debería ser bloqueado junto con el VEGF. Actualmente, concebimos una nueva hipótesis en la que el FGF-2 podría ser responsable de la mayor resistencia a estos tratamientos y posiblemente a otros, pero generando una mayor resistencia intrínseca de estas células a la hipoxia generada *in vivo* por el tratamiento anti-VEGF. Estos efectos del FGF-2 en los melanoma no solo serían autocrinos o paracrinos, sino principalmente intracrinos, lo que explicaría que no se pueda revertir la resistencia con el bloqueo del FGF-2 con AMs. Por otro lado, se ha relacionado a p53 en la apoptosis inducida por hipoxia [215, 216] y otro miembro de la familia del FGF, el FGF-1 ha sido identificado como inactivador de p53 por una vía intracrina [217]. A diferencia del resto de los tumores, la mayoría de los melanoma humanos no tiene mutaciones en p53 y sobre-expresan FGF-2, lo que nos lleva a pensar que la posible mayor resistencia a la hipoxia, podría estar relacionada con una

inactivación de p53 causada por el FGF-2, actuando de una manera intracrina. A ello se suman los conocidos efectos de sobrevida del FGF-2 al inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 [218].

Por otro lado, continuando con la caracterización de los AMs, logramos clonar las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de los dos anticuerpos monoclonales P4F7 y DB3 en las versiones Fab e identificamos sus *CDRs*. Conociendo sus secuencias, diseñamos *primers* que nos permitieron obtener versiones de cadena simple (un solo gen). Y si bien la construcción de cadena simple derivada del AM DB3 (anti-FGF-2), perdió su afinidad por su antígeno, la versión de cadena simple scVEGF-Fc derivado del AM P4F7 (anti-VEGF), mantuvo sus características bloqueantes de la acción proliferativa del VEGF sobre las HUVEC. En ensayos preliminares *in vivo* demostramos que esta construcción (scVEGF-Fc), al ser transfectada y expresada por un bajo porcentaje (4 o 2 %) de las células tumorales inyectadas sc en ratones atímicos, exhibió un efecto anti-angiogénico y redujo significativamente el crecimiento de estos tumores de melanoma. Por lo que comprobamos por primera vez, que sería factible instaurar una terapia génica de bloqueo del VEGF, en donde aún cuando un bajo porcentaje de células tumorales expresaran esta construcción, serían suficientes para ejercer un significativo efecto antitumoral. En este sentido, hemos procedido a clonar dicha secuencia en un vector adenoviral para evaluar su efecto sobre tumores ya establecidos.

Hipotetizamos que una terapia génica localizada bloqueante del VEGF, incluso cuando un muy bajo porcentaje de células tumorales que expresen el AM, podría aportar beneficios, como un aumento de la concentración local del AM que causaría una menor permeabilidad vascular en el área de influencia impidiendo que el mismo anticuerpo se diluya en la circulación sistémica y así disminuyendo los conocidos efectos secundarios del bloqueo del VEGF (ver Introducción “Efectos secundarios y resistencia a las terapias de bloqueo del VEGF”), además de disminuir el escape de células tumorales que podrían generar metástasis a distancia.

Igualmente, cabe aclarar que los ratones no servirían como modelo para estudiar los efectos secundarios producto de este tratamiento o cualquier otro con este AM debido a que el mismo, como se menciono anteriormente, no reconoce el VEGF murino por lo que no tendría efectos secundarios producto del bloqueo del VEGF fisiológico en ratones. En este sentido, y al igual que ocurrió con el Avastin [219], los estudios preclínicos deberían realizarse en monos ya que los mismos expresan un VEGF 100 %

homologo al humano a nivel de la proteína. Pero por otro lado, en el modelo de tumores humanos implantados en ratones atímicos, aunque la principal fuente de VEGF proviene de las células neoplásicas humanas, parte del VEGF, que promueve la angiogénesis tumoral, proviene de las células estromales murinas, que no esta siendo bloqueado, por lo que el AM P4F7 podría ejercer aún un mayor efecto antineoplásico en melanoma de monos o humanos. Apoyando esta teoría otros autores han demostrado que el bloqueo del VEGF murino en forma conjunta con el humano incrementa significativamente el efecto terapéutico sobre el crecimiento de tumores humanos xenotrasplantados con respecto al bloqueo del VEGF humano en forma individual [220].

Conclusión general

Durante este trabajo expresamos y purificamos VEGF humano recombinante de forma que mantuvo su actividad biológica sobre las células endoteliales. También se logró clonar y producir FGF-2 humano en *E. Coli* con una pureza mayor al 95% y una actividad biológica similar o incluso superior a FGF-2 comerciales.

Desarrollamos y caracterizamos una serie de AMs anti-VEGF humano: P1G4, P4F7 y P5D9 (isotipo IgG1) y P1E10 y P2H3 (isotipo IgG2a), que exhibieron muy altas afinidades por los dos métodos ensayados (ELISA de competencia y Biacore). La capacidad neutralizante de los mismos resultó específica y dosis-dependiente sobre la acción mitogénica del VEGF sobre células endoteliales. El AM anti-VEGF seleccionado (P4F7), disminuyó significativamente el crecimiento tumoral inducido por células neoplásicas humanas derivadas de melanoma (IIB-Mel-J) y carcinoma de colon (HT-29), xenotrasplantadas en ratones atímicos. Este AM mostró una potencia inhibitoria 5 veces mayor que el AM Bevacizumab (Avastin), en cuanto a la inhibición de la proliferación de HUVEC.

También se desarrolló y caracterizó una serie de AMs anti-FGF-2 humano: DB3, DA2 y CC12, todos de isotipo IgG1, que exhibieron afinidades del orden nM de acuerdo a los valores obtenidos por ELISA de competencia. La capacidad neutralizante de los mismos resultó específica y dosis-dependiente sobre la acción mitogénica del FGF-2 humano sobre células endoteliales. Se seleccionó al AM denominado DB3 como el de mejor acción bloqueante de la actividad del FGF-2 sobre las células endoteliales.

Se caracterizó *in vitro* a 3 líneas de melanoma humano en cuanto a su respuesta proliferativa al agregado exógeno de los factores estudiados (VEGF y FGF-2), el efecto de los dos AMs (P4F7 y DB3) bloqueantes seleccionados sobre la proliferación de dichas células. También, utilizando un ELISA sándwich, desarrollado durante el presente trabajo, se cuantificó la expresión del VEGF y el FGF-2 en las líneas de melanoma y utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observó que las grandes diferencias en la expresión de FGF-2 entre las distintas líneas, corresponderían principalmente a las isoformas de alto peso molecular de localización nuclear. Además, se evaluó por primera vez el efecto terapéutico del bloqueo de ambos factores sobre el crecimiento tumoral generado por estas líneas de melanoma humano, concluyendo que solo el tratamiento con el AM bloqueante del VEGF, indujo una disminución del crecimiento tumoral en todas las líneas ensayadas, sin encontrar relaciones entre los niveles de expresión del VEGF en las células tumorales y la efectividad del tratamiento. Esta reducción en el crecimiento tumoral fue mayor en los tumores generados por la línea IIB-Mel-J (de baja expresión de FGF-2), que en las otras dos líneas ensayadas, que a su vez mostraron sobre-expresión de las isoformas de localización nuclear del FGF-2. La relación entre la expresión de FGF-2 y una mayor resistencia al tratamiento anti-angiogénico de bloqueo del VEGF, junto a información de la bibliografía que describe al FGF-2 (principalmente a las isoformas de alto peso molecular y localización nuclear), como las responsables de la resistencia de los melanoma a ciertas quimioterapias, nos permite inferir que el FGF-2 estaría jugando un papel más importante al generar una resistencia intrínseca de las células a la muerte por la hipoxia generada por el tratamiento anti-VEGF, que a su función como factor angiogénico, motivo por el cual posiblemente el AM DB3, bloqueante del FGF-2, no fue eficaz en modificar el curso del crecimiento tumoral.

Por otro lado, se clonaron las regiones variables de las cadenas liviana y pesadas de los dos anticuerpos monoclonales (P4F7 y DB3), en las versiones Fab e identificamos sus *CDRs*. Conociendo sus secuencias, diseñamos *primers* que nos permitieron obtener AMs en versiones de cadena simple.

La construcción de cadena simple derivada del AM DB3 (anti-FGF-2), mostró una pérdida de su afinidad por el antígeno. Sin embargo, el AQR scVEGF-Fc, derivado del AM P4F7 (anti-VEGF), mantuvo sus características bloqueantes de la acción proliferativa del VEGF sobre las HUVEC. Y en un ensayo preliminar *in vivo*, demostramos que dicha construcción (scVEGF-Fc), al ser expresada en un bajo

porcentaje de células tumorales inyectadas en ratones atímicos, exhibió un efecto anti-angiogénico y redujo significativamente el crecimiento tumoral. Por lo que comprobamos que sería factible instaurar una terapia génica de bloqueo del VEGF, en donde aún cuando un bajo porcentaje de células tumorales expresaran esta construcción (scVEGF-Fc), resultaría suficiente para ejercer un significativo efecto antitumoral.

ABREVIATURAS Y CONVENCIONES

2-MeOH: 2-mercapto etanol

8-Aza: 8-azaguanina

A₂₈₀: absorbancia a 280 nm

A₄₅₀: absorbancia a 450 nm

A₆₀₀: absorbancia a 600 nm

aa: aminoácido(s)

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN codificante

AM(s): anticuerpo(s) monoclonal(es)

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato

Ang: angiopoyetina(s)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: *Bovine Serum Albumin* o sero-albúmina bovina

CBP: *CREB-binding protein*

CE: Célula(s) Endotelial(es)

CH1-3: *Constant region of Heavy chain 1-3*, dominio constante de la cadena pesada 1-3

CL: Cadena Liviana de una inmunoglobulina

COX-2: *Cyclooxygenase-2* o ciclooxigenasa-2

CP: Cadena Pesada de una inmunoglobulina

cpm: cuentas por minuto

C-TAD: (*Carboxyl-Terminal transActivation Domain*) o dominio de transactivación carboxiterminal

Da: Dalton(s)

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphate* o desoxirribonucleótidos trifosfato

EC₅₀: half maximal Effective Concentration o concentración que provoca el 50 % de la estimulación máxima

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético, sal disódica

EGF: *Epidermal Growth Factor* o Factor de Crecimiento Epidérmico

- FGF:** *Fibroblast Growth Factor* o Factor de Crecimiento Fibroblástico
- FGF-1:** *Fibroblast Growth Factor-1* o Factor de Crecimiento Fibroblástico-1, también conocido como Factor de Crecimiento Fibroblástico ácido (aFGF)
- FGF-2:** *Fibroblast Growth Factor-2* o Factor de Crecimiento Fibroblástico-2, también conocido como Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF)
- FGFBP:** *FGF Binding Protein* o Proteína de unión al FGF
- H₂O_d:** Agua destilada
- HAT:** *Hypoxanthine Aminopterin Thymidine* o hipoxantina, aminopterina y timidina
- HGF:** *Hepatocyte Growth Factor* o Factor de Crecimiento de Hepatocitos
- HIF-1:** *Hypoxia Inducible Factor-1* o Factor Inducido por Hipoxia-1
- HGPRT:** *Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl Transferase* o hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
- HMW:** *High Molecular Weight* o formas de alto peso molecular (del FGF-2)
- HRE:** *Hypoxia Response Element* o elemento de respuesta a hipoxia
- h(s):** hora(s)
- HS(s):** Heparán-Sulfato(s)
- HSPG:** *Heparán-Sulphate Proteoglycans* o Heparán-Sulfato Proteoglicanos
- HUVEC:** *Human Umbilical Vein Endotelial Cells* o células del endotelio venoso umbilical humano
- IC₅₀:** *The half maximal Inhibitory Concentration* o concentración que provoca una inhibición del 50% con respecto al máximo
- id:** intradérmica(s)
- IFN:** interferón
- Ig(s):** inmunoglobulina(s)
- IGF-I:** *Insulin-like Growth Factor-1* o Factor de Crecimiento similar a Insulina-1
- IL:** interleuquina(s)
- ip:** intraperitoneal(s)
- IP-10:** *Interferon-inducible Protein-10* o proteína-10 inducible por interferón
- IPTG:** Iso-Propil Tio-Galactósido (Sigma)
- kDa:** kilo Dalton
- KGF:** (*Keratinocyte Growth Factor*) o factor estimulante de queratinocitos
- mA:** miliamper(es)
- MAPk:** *Mitogen-Activated Protein kinases* o proteína-quinasa activada por mitógenos
- MEC:** matriz extracelular

mg: miligramo(s)

min: minuto(s)

mm: milímetro(s)

MMPs: *Matrix MetalloProteinases* o metaloproteasas de la matriz

N: Número de experimentos

n: Numero de replicas o animales

NO: *Nitric Oxide* u óxido nítrico

NOS: *Nitric Oxide Synthase* u óxido nítrico sintetasa

NP: *Neuropilin* o Neuropilina

ODD: (Oxygen-dependent Degradation Domain) o dominio de degradación dependiente de oxígeno

PBS: *Phosphate Buffered Saline* o *buffer* fosfato salino

PBS-L: PBS-Leche

PBS-T: PBS-Tween-20

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* o Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas

PF-4: *Platelet factor-4* o Factor de Plaquetas-4

pI: punto Isoeléctrico

PLGF: *Placental Growth Factor* o Factor de Crecimiento Placentario

rpm: revoluciones por minuto

RT: Transcripción Reversa

RTK: *Receptor Tyrosine Kinase* o recetores con actividad tirosina-quinasa

s: segundos

SAB: Sero-Albúmina Bovina

SABc: SAB cationizada

sc: subcutánea

SD: *Standard Deviation* o desvío estándar

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* o dodecil sulfato de sodio (laurilsulfato sódico)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

SE: *Standar Error* o Error Estándar

SFB: suero fetal bovino

TA: Temperatura Ambiente (20-25°C)

TGF: *Tumor Growth Factor* o Factor de Crecimiento derivado de Tumores

Tie2: receptor de angiopoyetinas-2

TIMP: inhibidores tisulares de MMP

TIR: *Translation Initiation Region* o región de inicio de la traducción

TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral

TSS: *Transformation & Storage Solution* o solución de transformación y almacenamiento

VEGF: *Vascular Endotelial Growth Factor* o Factor de Crecimiento Endotelial Vasculare

VEGF₁₂₁: isoforma humana de 121 aa del VEGF

VEGF₁₆₃: recombinante humano de 163 aa del VEGF expresado en *E. Coli*

VEGF₁₆₄: isoforma murina de 164 aa del VEGF (homólogo al VEGF₁₆₅ humano)

VEGF₁₆₅: isoforma humana de 165 aa del VEGF

VEGFR1: receptor 1 del VEGF (también conocido como Flt-1)

VEGFR2: receptor 2 del VEGF (también conocido como KDR o Flk-1)

BIBLIOGRAFÍA

1. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
2. Hanahan, D., *Signaling vascular morphogenesis and maintenance*. Science, 1997. **277**(5322): p. 48-50.
3. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis*. Recent Prog.Horm.Res., 2000. **55**: p. 15-35.
4. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
5. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
6. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
7. Giordano, F.J. and R.S. Johnson, *Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 35-40.
8. Levy, A.P., N.S. Levy, and M.A. Goldberg, *Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25492-7.
9. Hirota, K. and G.L. Semenza, *Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 610-6.
10. Murohara, T., et al., *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin*. Circulation, 1998. **97**(1): p. 99-107.
11. Airley, R.E. and A. Mobasher, *Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics*. Chemotherapy, 2007. **53**(4): p. 233-56.
12. Zhou, J. and B. Brune, *Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2006. **4**(3): p. 189-97.
13. Frede, S., U. Berchner-Pfannschmidt, and J. Fandrey, *Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation*. Methods Enzymol, 2007. **435**: p. 405-19.
14. Muinck, E.D., et al., *Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by the angiogenic MasterSwitch protein PR 39 gene therapy: the roles of HIF1alpha stabilization and FGFR1 signaling*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(4): p. 437-45.
15. Mizukami, Y., Y. Kohgo, and D.C. Chung, *Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5670-4.
16. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
17. Weidner, N., *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 9-19.
18. Yoshino, S., M. Kato, and K. Okada, *Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma*. Int J Urol, 1995. **2**(3): p. 156-60.
19. Graham, C.H., et al., *Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanoma*. Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 510-4.

20. Dass, C.R. and T. Su, *Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: role of vascular endothelial cells*. J Pharm Pharmacol, 2000. **52**(11): p. 1301-17.
21. Claesson-Welsh, L., et al., *Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5579-83.
22. Benjamin, L.E. and E. Keshet, *Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8761-6.
23. Takahashi, Y., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 3964-8.
24. Takahashi, Y., et al., *Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer*. Arch Surg, 1997. **132**(5): p. 541-6.
25. Talks, K.L. and A.L. Harris, *Current status of antiangiogenic factors*. Br J Haematol, 2000. **109**(3): p. 477-89.
26. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
27. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
28. Plouet, J., J. Schilling, and D. Gospodarowicz, *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3801-6.
29. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
30. Jeltsch, M., et al., *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1423-5.
31. Korpelainen, E.I. and K. Alitalo, *Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 159-64.
32. Esser, S., et al., *Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 947-59.
33. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
34. Vincenti, V., et al., *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
35. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
36. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
37. Ferrara, N., et al., *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocr.Rev., 1992. **13**(1): p. 18-32.
38. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**(1-3): p. 233-5.
39. Ku, D.D., et al., *Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H586-92.

40. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13313-6.
41. Nor, J.E., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 375-84.
42. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
43. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat.Med., 1996. **2**(10): p. 1096-1103.
44. Shalaby, F., et al., *A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis*. Cell, 1997. **89**(6): p. 981-90.
45. Claffey, K.P., et al., *Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(2): p. 469-81.
46. Pertovaara, L., et al., *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(9): p. 6271-4.
47. Werner, S., et al., *The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds*. Science, 1994. **266**(5186): p. 819-22.
48. Li, J., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 308-12.
49. Cohen, T., et al., *Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 736-41.
50. Deroanne, C.F., et al., *Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression*. Cancer Res, 1997. **57**(24): p. 5590-7.
51. Griffioen, A.W. and G. Molema, *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(2): p. 237-68.
52. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
53. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
54. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
55. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
56. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*. Angiogenesis, 2006. **9**(4): p. 225-30; discussion 231.
57. Wey, J.S., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines*. Cancer, 2005. **104**(2): p. 427-38.
58. He, Z. and M. Tessier-Lavigne, *Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III*. Cell, 1997. **90**(4): p. 739-51.

59. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
60. Soker, S., et al., *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5761-7.
61. Kendall, R.L., G. Wang, and K.A. Thomas, *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(2): p. 324-8.
62. Bikfalvi, A., et al., *Biological roles of fibroblast growth factor-2*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 26-45.
63. Gospodarowicz, D., *Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary*. J Biol Chem, 1975. **250**(7): p. 2515-20.
64. Maciag, T., et al., *An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5674-8.
65. Flaumenhaft, R., D. Moscatelli, and D.B. Rifkin, *Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor*. J Cell Biol, 1990. **111**(4): p. 1651-9.
66. Saksela, O., et al., *Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation*. J Cell Biol, 1988. **107**(2): p. 743-51.
67. Abuharbeid, S., F. Czubayko, and A. Aigner, *The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(9): p. 1463-8.
68. Mergia, A., et al., *The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **138**(2): p. 644-51.
69. Sorensen, V., T. Nilsen, and A. Wiedlocha, *Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting*. Bioessays, 2006. **28**(5): p. 504-14.
70. Arese, M., et al., *Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(5): p. 1429-44.
71. Yu, P.J., et al., *Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age*. J Cell Biochem, 2007. **100**(5): p. 1100-8.
72. Delrieu, I., *The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism*. FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 6-10.
73. Samaniego, F., et al., *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1433-43.
74. Klein, S., et al., *Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22583-90.
75. Chang, E., et al., *Successful treatment of infantile hemangiomas with interferon-alpha-2b*. J Pediatr Hematol Oncol, 1997. **19**(3): p. 237-44.
76. Dickson, C., et al., *Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(3): p. 191-6.

77. Ueba, T., et al., *Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9009-13.
78. Miglarese, M.R., R. Halaban, and N.W. Gibson, *Regulation of fibroblast growth factor 2 expression in melanoma cells by the c-MYB proto-oncoprotein*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(11): p. 1199-210.
79. Bottcher, R.T. and C. Niehrs, *Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development*. Endocr Rev, 2005. **26**(1): p. 63-77.
80. Raballo, R., et al., *Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex*. J Neurosci, 2000. **20**(13): p. 5012-23.
81. Dono, R., et al., *Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice*. EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4213-25.
82. Cutroneo, K.R., *Gene therapy for tissue regeneration*. J Cell Biochem, 2003. **88**(2): p. 418-25.
83. Nam, N.H. and K. Parang, *Current targets for anticancer drug discovery*. Curr Drug Targets, 2003. **4**(2): p. 159-79.
84. Ribatti, D., A. Vacca, and F. Dammacco, *The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review*. Neoplasia, 1999. **1**(4): p. 293-302.
85. Yamanaka, Y., et al., *Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5289-96.
86. Slaton, J.W., et al., *Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 735-43.
87. Takahashi, Y., et al., *Progressive upregulation of metastasis-related genes in human colon cancer cells implanted into the cecum of nude mice*. Oncol Res, 1996. **8**(4): p. 163-9.
88. Bikfalvi, A., et al., *Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 233-43.
89. Dini, G., et al., *Overexpression of the 18 kDa and 22/24 kDa FGF-2 isoforms results in differential drug resistance and amplification potential*. J Cell Physiol, 2002. **193**(1): p. 64-72.
90. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
91. Antoine, M., et al., *Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells*. Growth Factors, 2005. **23**(2): p. 87-95.
92. Dell'Era, P., et al., *Gene expression profile in fibroblast growth factor 2-transformed endothelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2433-40.
93. Folkman, J., *Angiogenesis: initiation and control*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 212-27.
94. D'Amore, P.A. and S.R. Smith, *Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 61-75.
95. Klagsbrun, M. and A. Baird, *A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity*. Cell, 1991. **67**(2): p. 229-31.

96. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and R. Goetz, *A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs*. *Curr Opin Struct Biol*, 2005. **15**(5): p. 506-16.
97. Kan, M., et al., *An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase*. *Science*, 1993. **259**(5103): p. 1918-21.
98. Cross, M.J., et al., *The Shb adaptor protein binds to tyrosine 766 in the FGFR-1 and regulates the Ras/MEK/MAPK pathway via FRS2 phosphorylation in endothelial cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(8): p. 2881-93.
99. Partovian, C. and M. Simons, *Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells*. *Cell Signal*, 2004. **16**(8): p. 951-7.
100. Murakami, M., A. Elfenbein, and M. Simons, *Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(2): p. 223-31.
101. Thisse, B. and C. Thisse, *Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development*. *Dev Biol*, 2005. **287**(2): p. 390-402.
102. Powers, C.J., S.W. McLeskey, and A. Wellstein, *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(3): p. 165-97.
103. Coumoul, X. and C.X. Deng, *Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003. **69**(4): p. 286-304.
104. Bastaki, M., et al., *Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(3): p. 454-64.
105. Javerzat, S., P. Auguste, and A. Bikfalvi, *The role of fibroblast growth factors in vascular development*. *Trends Mol Med*, 2002. **8**(10): p. 483-9.
106. Dell'Era, P., et al., *Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(21): p. 2655-63.
107. Colvin, J.S., et al., *Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3*. *Nat Genet*, 1996. **12**(4): p. 390-7.
108. Dvorak, P. and A. Hampl, *Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005. **43**(4): p. 203-8.
109. Rusnati, M., et al., *alpha5beta3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(12): p. 2449-61.
110. Tille, J.C., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **299**(3): p. 1073-85.
111. Auguste, P., et al., *Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1717-26.
112. Seghezzi, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis*. *J Cell Biol*, 1998. **141**(7): p. 1659-73.
113. Kanda, S., Y. Miyata, and H. Kanetake, *Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(6): p. 4007-16.

114. Gabler, C., et al., *Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol*. *Reprod Domest Anim*, 2004. **39**(5): p. 321-7.
115. Hata, Y., S.L. Rook, and L.P. Aiello, *Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. *Diabetes*, 1999. **48**(5): p. 1145-55.
116. Tomanek, R.J., et al., *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis*. *Circ Res*, 2001. **88**(11): p. 1135-41.
117. Goto, F., et al., *Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels*. *Lab Invest*, 1993. **69**(5): p. 508-17.
118. Asahara, T., et al., *Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo*. *Circulation*, 1995. **92**(9 Suppl): p. II365-71.
119. Castellon, R., et al., *Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells*. *Exp Eye Res*, 2002. **74**(4): p. 523-35.
120. Kano, M.R., et al., *VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 16): p. 3759-68.
121. Kurz, D.J., et al., *Fibroblast growth factor-2, but not vascular endothelial growth factor, upregulates telomerase activity in human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 748-54.
122. Ribatti, D., et al., *Cell-mediated delivery of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor onto the chick chorioallantoic membrane: endothelial fenestration and angiogenesis*. *J Vasc Res*, 2001. **38**(4): p. 389-97.
123. Gerritsen, M.E., et al., *Branching out: a molecular fingerprint of endothelial differentiation into tube-like structures generated by Affymetrix oligonucleotide arrays*. *Microcirculation*, 2003. **10**(1): p. 63-81.
124. Chang, L.K., et al., *Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(32): p. 11658-63.
125. Zhou, M., et al., *Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone*. *Nat Med*, 1998. **4**(2): p. 201-7.
126. Miller, D.L., et al., *Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(6): p. 2260-8.
127. Yamaguchi, T.P., et al., *fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation*. *Genes Dev*, 1994. **8**(24): p. 3032-44.
128. Deng, C.X., et al., *Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization*. *Genes Dev*, 1994. **8**(24): p. 3045-57.
129. Lee, S.H., D.J. Schloss, and J.L. Swain, *Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33679-87.
130. Poole, T.J., E.B. Finkelstein, and C.M. Cox, *The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development*. *Dev Dyn*, 2001. **220**(1): p. 1-17.

131. Kazemi, S., et al., *Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis*. Cell Physiol Biochem, 2002. **12**(2-3): p. 55-62.
132. Koh, H.K., *Cutaneous melanoma*. N Engl J Med, 1991. **325**(3): p. 171-82.
133. Newton Bishop, J.A., *Molecular pathology of melanoma*. Cancer Metastasis Rev, 1997. **16**(1-2): p. 141-54.
134. Johnson, T.M., et al., *Advances in melanoma therapy*. J Am Acad Dermatol, 1998. **38**(5 Pt 1): p. 731-41.
135. Herlyn, M., *Human melanoma: development and progression*. Cancer Metastasis Rev, 1990. **9**(2): p. 101-12.
136. Marcoval, J., et al., *Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase*. J Cutan Pathol, 1997. **24**(4): p. 212-8.
137. Straume, O., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanoma*. Int J Oncol, 1999. **15**(3): p. 595-9.
138. Erhard, H., et al., *Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis*. Melanoma Res, 1997. **7 Suppl 2**: p. S19-26.
139. Srivastava, A., et al., *The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study*. Am J Pathol, 1988. **133**(2): p. 419-23.
140. Denijn, M. and D.J. Ruiter, *The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma. Clinicopathological aspects*. Melanoma Res, 1993. **3**(1): p. 5-14.
141. Birck, A., et al., *Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients*. Melanoma Res, 1999. **9**(4): p. 375-81.
142. Westermarck, B., et al., *Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7197-200.
143. Graeven, U., et al., *Expression patterns of placenta growth factor in human melanocytic cell lines*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(1): p. 118-23.
144. Singh, R.K., et al., *Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin*. Melanoma Res, 1999. **9**(4): p. 383-7.
145. Rodeck, U., et al., *Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(1): p. 20-6.
146. Halaban, R., et al., *Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1611-9.
147. Yayon, A., et al., *Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases*. Oncogene, 1997. **14**(25): p. 2999-3009.
148. Xerri, L., et al., *Expression of FGF1 and FGFR1 in human melanoma tissues*. Melanoma Res, 1996. **6**(3): p. 223-30.
149. Albino, A.P., B.M. Davis, and D.M. Nanus, *Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4815-20.

150. Rodeck, U. and M. Herlyn, *Growth factors in melanoma*. Cancer Metastasis Rev, 1991. **10**(2): p. 89-101.
151. Wang, Y. and D. Becker, *Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanoma blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 887-93.
152. Dotto, G.P., et al., *Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3115-28.
153. Danielsen, T. and E.K. Rofstad, *The constitutive level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is more important than hypoxia-induced VEGF up-regulation in the angiogenesis of human melanoma xenografts*. Br J Cancer, 2000. **82**(9): p. 1528-34.
154. Salven, P., P. Heikkila, and H. Joensuu, *Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma*. Br J Cancer, 1997. **76**(7): p. 930-4.
155. Liu, B., et al., *Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(3): p. 721-7.
156. Graeven, U., et al., *Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(11): p. 621-9.
157. Graeven, U., et al., *Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7282-90.
158. Milstein, C. and A.C. Cuello, *Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry*. Nature, 1983. **305**(5934): p. 537-40.
159. Kearney, J.F., et al., *A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines*. J Immunol, 1979. **123**(4): p. 1548-50.
160. Cotton, R.G. and C. Milstein, *Letter: Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells*. Nature, 1973. **244**(5410): p. 42-3.
161. Galfre, G., et al., *Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines*. Nature, 1977. **266**(5602): p. 550-2.
162. Littlefield, J.W., *Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in Vitro and Their Presumed Recombinants*. Science, 1964. **145**: p. 709-10.
163. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
164. Hoffman, T., et al., *Stimulation of human monocytes by anti-CD3 monoclonal antibody: induction of inflammatory mediator release via immobilization of Fc receptor by adsorbed immunoglobulin and T-lymphocytes*. Inflammation, 1992. **16**(6): p. 571-85.
165. Adgey, A.A., *Bleeding complications with new antithrombotics used in ischaemic heart disease*. Haemostasis, 1996. **26**(5): p. 237-46.
166. Gavalondo, J.V. and J.W. Larrick, *Antibody engineering at the millennium*. Biotechniques, 2000. **29**(1): p. 128-32, 134-6, 138 passim.
167. Denekamp, J., *Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy*. Br J Radiol, 1993. **66**(783): p. 181-96.

168. Zucker, S., J. Cao, and W.T. Chen, *Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment*. *Oncogene*, 2000. **19**(56): p. 6642-50.
169. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 277-85.
170. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 315-28.
171. Harris, A.L., *Are angiostatin and endostatin cures for cancer?* *Lancet*, 1998. **351**(9116): p. 1598-9.
172. Cooney, M.M., et al., *Novel vascular targeting/disrupting agents: combretastatin A4 phosphate and related compounds*. *Curr Oncol Rep*, 2005. **7**(2): p. 90-5.
173. Mullamitha, S.A., et al., *Phase I evaluation of a fully human anti- α v integrin monoclonal antibody (CNTO 95) in patients with advanced solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(7): p. 2128-35.
174. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(4): p. 273-86.
175. Ferrara, N., K.J. Hillan, and W. Novotny, *Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(2): p. 328-35.
176. Jain, R.K., *Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts*. *Oncology (Williston Park)*, 2005. **19**(4 Suppl 3): p. 7-16.
177. Smith, J.K., N.M. Mamoon, and R.J. Duhe, *Emerging roles of targeted small molecule protein-tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. *Oncol Res*, 2004. **14**(4-5): p. 175-225.
178. Ferrara, N., et al., *Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration*. *Retina*, 2006. **26**(8): p. 859-70.
179. Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(27): p. 2805-16.
180. Apte, R.S., *Pegaptanib sodium for the treatment of age-related macular degeneration*. *Expert Opin Pharmacother*, 2008. **9**(3): p. 499-508.
181. Kabbinavar, F., et al., *Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(1): p. 60-5.
182. Stopeck, A., et al., *Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(9): p. 2798-805.
183. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
184. Crawford, Y. and N. Ferrara, *VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies*. *Cell Tissue Res*, 2009. **335**(1): p. 261-9.
185. Loges, S., et al., *Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(3): p. 167-70.
186. Dennis, P.A. and D.B. Rifkin, *Studies on the role of basic fibroblast growth factor in vivo: inability of neutralizing antibodies to block tumor growth*. *J Cell Physiol*, 1990. **144**(1): p. 84-98.
187. Matsuzaki, K., et al., *Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity:*

- invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 9911-5.
188. Takahashi, J.A., et al., *Inhibition of cell growth and tumorigenesis of human glioblastoma cells by a neutralizing antibody against human basic fibroblast growth factor.* FEBS Lett, 1991. **288**(1-2): p. 65-71.
189. Colomer, R., et al., *Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma.* Br J Cancer, 1997. **76**(9): p. 1215-20.
190. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
191. New, B.A. and L.C. Yeoman, *Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumor cell lines.* J Cell Physiol, 1992. **150**(2): p. 320-6.
192. Netzer, P., et al., *Inhibition of human colon cancer cell growth by antisense oligodeoxynucleotides targeted at basic fibroblast growth factor.* Aliment Pharmacol Ther, 2001. **15**(10): p. 1673-9.
193. Chen, X.J., et al., *Cloning and high level nonfusion expression of recombinant human basic fibroblast growth factor in Escherichia coli.* Acta Pharmacol Sin, 2002. **23**(9): p. 782-6.
194. Galfre, G. and C. Milstein, *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures.* Methods Enzymol, 1981. **73**(Pt B): p. 3-46.
195. Lefrovitz, I., *Limiting dilution analysis.* Immun. Meth, 1979. **1**(1): p. 335-370.
196. Seligman, S.J., *Influence of solid-phase antigen in competition enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on calculated antigen-antibody dissociation constants.* J Immunol Methods, 1994. **168**(1): p. 101-10.
197. Stevens, F.J., *Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody.* Mol Immunol, 1987. **24**(10): p. 1055-60.
198. Sastry, L., et al., *Cloning of the immunological repertoire in Escherichia coli for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5728-32.
199. Huse, W.D., et al., *Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1275-81.
200. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7978-82.
201. Zhou, H., R.J. Fisher, and T.S. Papas, *Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction.* Nucleic Acids Res, 1994. **22**(5): p. 888-9.
202. Doyle, A., J. Griffiths, and D. Newell, *Laboratory Procedures: Cell & Tissue Culture*, ed. J.W. Sons. 1994.
203. Guerra, L., et al., *Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line.* Pigment Cell Res, 1989. **2**(6): p. 504-9.
204. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.* J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.

205. Juhasz, I., et al., *Growth and invasion of human melanoma in human skin grafted to immunodeficient mice*. Am J Pathol, 1993. **143**(2): p. 528-37.
206. Hurwitz, H.I., *New agents in colon cancer*. Clin.Adv.Hematol.Oncol., 2003. **1**(7): p. 404-405.
207. Song, J., et al., *Influence of angiogenin on the growth of A375 human melanoma cells and the expression of basic fibroblast growth factor*. Melanoma Res, 2006. **16**(2): p. 119-26.
208. Hsu, M.Y., et al., *Aggressive melanoma cells escape from BMP7-mediated autocrine growth inhibition through coordinated Noggin upregulation*. Lab Invest, 2008. **88**(8): p. 842-55.
209. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
210. Asano, M., et al., *An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity in vivo*. Hybridoma, 1998. **17**(2): p. 185-90.
211. Presta, L.G., et al., *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. Cancer Res, 1997. **57**(20): p. 4593-9.
212. Lin, Y.S., et al., *Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(1): p. 371-8.
213. Keyt, B.A., et al., *Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5638-46.
214. Gospodarowicz, D., *Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor*. Methods Enzymol, 1987. **147**: p. 106-19.
215. Alarcon, R., et al., *Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6046-51.
216. Koumenis, C., et al., *Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1297-310.
217. Bouleau, S., et al., *FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway*. Oncogene, 2005. **24**(53): p. 7839-49.
218. Wieder, R., et al., *Low level expression of basic FGF upregulates Bcl-2 and delays apoptosis, but high intracellular levels are required to induce transformation in NIH 3T3 cells*. Growth Factors, 1997. **15**(1): p. 41-60.
219. Ryan, A.M., et al., *Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 78-86.
220. Gerber, H.P., et al., *Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6253-8.

Alberto Baldi
Director

Alejandro Mladovan
Director Asistente

Adrián Góngora
Doctorando