

**IV LECCIÓN
CONMEMORATIVA
RICARDO CASTILLO**

Angiogénesis tumoral

J. MARTÍNEZ

Cardeza Foundation. Thomas Jefferson University. Philadelphia.

Introducción. Mecanismos de la angiogénesis

El término angiogénesis se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la red vascular preexistente, y el término vasculogénesis se refiere al proceso de formación de vasos sanguíneos que se originan *de novo* a partir de los angioblastos, que se diferencian en células endoteliales y después se organizan en nuevos capilares¹⁻³. Los capilares están formados por células endoteliales adheridas a la matriz extracelular y rodeando su pared externa están los pericitos que dan solidez y estabilidad a los capilares. Los dos procesos, angiogénesis y vasculogénesis, participan en la formación de capilares durante el desarrollo y metástasis de los tumores. El crecimiento de la masa tumoral depende, como en otros tejidos, de la difusión de oxígeno y nutrientes desde la red vascular, y por ello las células están localizadas alrededor de 100-200 μ de los vasos sanguíneos, distancia límite para la difusión de estos elementos². La vasculogénesis tiene un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, mientras que la angiogénesis participa esencialmente en los procesos de reparación y remodelación de tejidos durante los procesos inflamatorios, en la formación de la cicatriz y en el desarrollo y metástasis de los tumores²⁻⁴. Sin embargo, ambos procesos, angiogénesis y vasculogénesis, están presentes en distintas proporciones tanto en la embriogénesis como en la formación tumoral y en la reparación de los tejidos²⁻⁴.

En la vasculogénesis las células endoteliales proceden de una célula primitiva, denominada hemangioblasto, precursor de la célula endotelial, el angioblasto, y de la célula pluripotencial hematopoyética que expresa los marcadores CD34 y el receptor Flk-1, entre otros²⁻⁵. Esta célula cuando se diferencia en endotelial expresa moléculas como la VE-cadherina que son específicas del endotelio. Los factores que inducen la maduración del hemangioblasto a célula endotelial no están bien definidos, aunque algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), angiopoyetinas y algunas citocinas desempeñan un importante papel. Algunas de las células que proceden del mesénquima de la médula ósea (progenitores de células endoteliales) son capaces de diferenciarse en células endoteliales, como se verá más tarde (fig. 1).

Angiogénesis

En este proceso biológico los capilares se forman a partir de células endoteliales presentes en vasos sanguíneos y los nuevos capilares se pueden formar por brote (*sprouting*) o intususcepción². La formación de nuevos capilares es un proceso complejo que se puede dividir conceptualmente en cuatro fases: *a*) estímulo angiogénico sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos y proteólisis de la membrana basal; *b*) migración de estas células activadas hacia la matriz extracelular circundante; *c*) proliferación de estas células endoteliales, y *d*) ensamblaje de las células endoteliales en capilares. Finalmente los pericitos migran hacia los nuevos capilares y envuelven la pared externa de los nuevos vasos, dándoles mayor resistencia y madurez funcional^{1,2}. Estos procesos están basados en interacciones específicas de las células endoteliales con factores de crecimiento, con interacciones específicas con la matriz extracelular y en la última fase de diferenciación, las células endoteliales se asocian entre sí para formar los vasos sanguíneos (fig. 2). Vamos a describir someramente algunas de estas asociaciones, ya que forman la base de la angiogénesis tumoral y pueden ser susceptibles de intervención terapéutica.

Factores de crecimiento (fig. 3)

La angiogénesis está regulada por factores de crecimiento que son específicos para la proliferación y diferenciación de las células endoteliales. Entre éstos, el factor de crecimiento más importante es el VEGF, las angiopoyetinas y también otros factores como el bFGF, PDGF y TGF- β que modifican y completan la respuesta angiogénica.

VEGF

El VEGF, también conocido como el factor de permeabilidad vascular, está formado por una familia de cuatro moléculas estructuralmente muy relacionadas que forman homodímeros para ligar a sus receptores. Estas distintas moléculas de la familia del VEGF y las asociaciones con sus receptores se presentan en la figura 2⁴⁻⁸. Algunas de estas variantes moleculares se

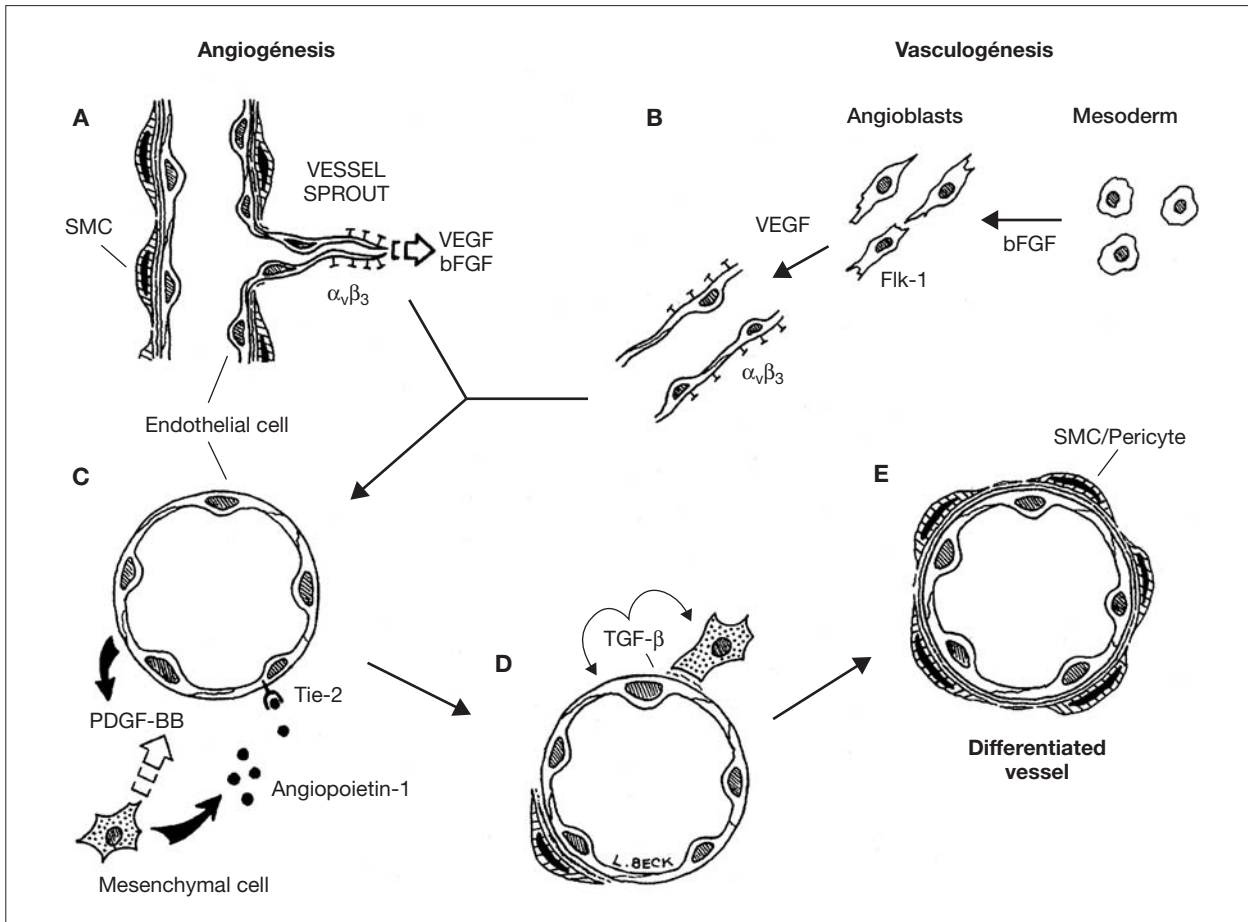


Figura 1. Angiogénesis y vasculogénesis. Los nuevos vasos se pueden formar por angiogénesis o vasculogénesis. En la angiogénesis (A) las células endoteliales proceden de vasos existentes, que se separan de la pared celular y migran y forman nuevos vasos en las áreas de la angiogénesis. En la vasculogénesis (B) las células endoteliales proceden de los angioblastos que se diferencian bajo la influencia de factores del crecimiento, como el VEGF. Los pericitos proceden de células del mesénquima y se diferencian por el efecto de las angiopoyetinas y del TGF-β (C). Los pericitos se adhieren a la pared vascular y contribuyen a formar un vaso más maduro. (Adaptado de la Ref. 5.)

ligan a la matriz extracelular a través de un dominio de la molécula capaz de asociarse con la heparina o proteoglicanos⁶. El VEGF tiene un papel esencial en la vasculogénesis y angiogénesis y la delección de un solo alelo del VEGF-A es letal para el feto, ya que no desarrolla el sistema cardiovascular^{2,6}, y su inhibición durante el período neonatal conduce a la apoptosis de las células endoteliales. El mayor factor regulador de la síntesis y secreción del VEGF es la hipoxia de los tejidos, causada por procesos tan diferentes como puede ser la obstrucción arterial o durante la formación y metástasis tumoral. La tensión de oxígeno regula la expresión de ciertos genes a través del HIF-1, (hipoxia inducible factor 1)^{2,9,10}, que es capaz de activar una serie de genes como respuesta a la hipoxia, por ejemplo, el VEGF y la eritropoyetina.

Receptores del VEGF

Este factor del crecimiento se asocia fundamentalmente con dos receptores tipo tirosincinasa, VEGFR1, conocido como Flt-1 y VEGFR-2, también denominado Flk-1 o KDR⁶⁻⁸. La inactivación de uno de estos re-

ceptores conduce a la muerte intraútero del feto, debido a la falta de desarrollo del sistema vascular⁶. Estos receptores pertenecen al grupo de tirosincinasas y se expresan en la membrana de las células endoteliales y después de ligar al VEGF transmiten señales intracelulares vía MAP cinasas que resultan en un aumento de la proliferación y de la migración de las células endoteliales⁸. Además, esta activación produce una disminución de la apoptosis celular, que es consecuencia de la activación de la PI3K/Akt y aumento en Bcl-2^{6,8}. Además, el VEGF disminuye la adhesión de las células endoteliales a la pared celular, un mecanismo que facilita la separación y emigración, que es necesaria para iniciar la angiogénesis. Otras funciones del VEGF son el aumento de la permeabilidad vascular que induce edema y acumulación de las proteínas que participan en la adhesión celular, y este factor también facilita la migración leucocitaria, por lo cual el VEGF es un agente proangiogénico y proinflamatorio. El receptor fundamental en la angiogénesis es el VEGFR-2, Flk-1, que liga los VEGF A, C, D y también el PlGF (factor de crecimiento de la placenta) (fig. 2). En relación con VEGFR-1 se conoce que su inactivación produce la

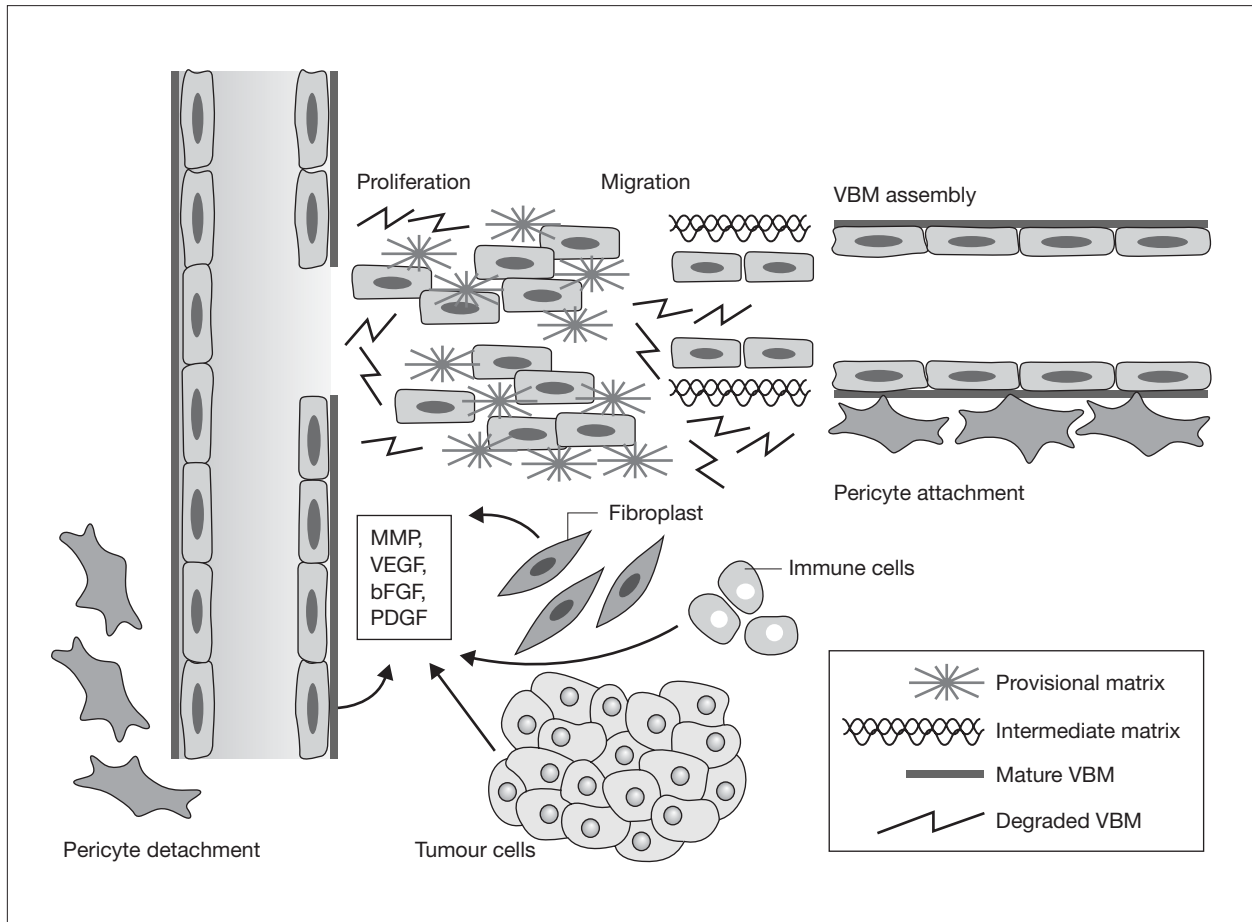


Figura 2. Fases de la angiogénesis. En esta figura se representan las fases más importantes de la angiogénesis. Separación de las células endoteliales de la pared vascular, migración a través de una matriz extracelular parcialmente proteolizada, con adhesión mediada a través de las integrinas, y proliferación de las células endoteliales, todas estas fases impulsadas por el VEGF. Finalmente las células se ensamblan en tubos capilares y los pericitos se adhieren a la nueva pared vascular bajo la influencia del PDGF y el TGF- β . (Adaptado de R. Kalluri. Nat Rev Cancer. 2003;6:422-33.)

muerte intraútero, con presencia de células endoteliales y pobre ramificación capilar^{1-3,6,8}. Parece ser que la función principal del VEGFR-1 es ligar algunos de los VEGF y de este modo regula la actividad de estos factores del crecimiento y de su receptor VEGFR-2^{2,4,11}. De todos modos, puede que el VEGFR-1 participe en la migración de las células endoteliales y promueva la ramificación capilar^{8,11}. Recientemente, ha sido identificado un nuevo receptor, el VEGFR-3, que liga los VEGF C Y D, y esta interacción es una vía fundamental para el desarrollo de los vasos linfáticos^{6,12,13} (fig. 3). Este receptor desempeña un papel muy importante en la metástasis de los tumores a los ganglios linfáticos⁶.

Factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) y PDGF-B (platelet derived growth factor B)

Esta familia de factores del crecimiento no parecen esenciales en la formación de vasos sanguíneos en el feto, como se demostró después su inactivación en ratones transgénicos⁵. Sin embargo, cuando el FGF es usado en sistemas experimentales de angiogénesis, tanto *in vivo* como *in vitro*, es capaz de inducir una po-

tente respuesta angiogénica^{14,15}. Es posible que el FGF participe en la respuesta angiogénica en procesos patológicos, como la isquemia o la formación tumoral⁶. Recientes estudios también indican que la combinación del FGF con PDGF (*platelet derived growth factor*) induce una respuesta angiogénica robusta¹⁴.

El nuevo vaso capilar, constituido por el ensamblaje de células endoteliales, es estabilizado por la adhesión a su pared de células diferenciadas de músculo liso, los pericitos¹⁵. Este proceso está parcialmente regulado por el PDGF y su receptor, que se expresa en los pericitos, y da lugar a un vaso mecánicamente más resistente a la presión intravascular^{5,16}. La inactivación del PDGF-B en ratones induce la formación de microaneurismas en los capilares y formación de una pared vascular débil y escasa en pericitos^{15,16}. El origen de esta célula parece ser doble, o bien se origina de una célula del mesénquima, o de un precursor de la célula endotelial, y en ambos casos el PDGF-BB induce su diferenciación en pericitos¹⁷ (fig. 1).

Otros agentes que regulan la remodelación de la angiogénesis son las angiopoyetinas 1 y 2 y su receptor Tie 1. En este sistema la angiopoyetina liga al receptor

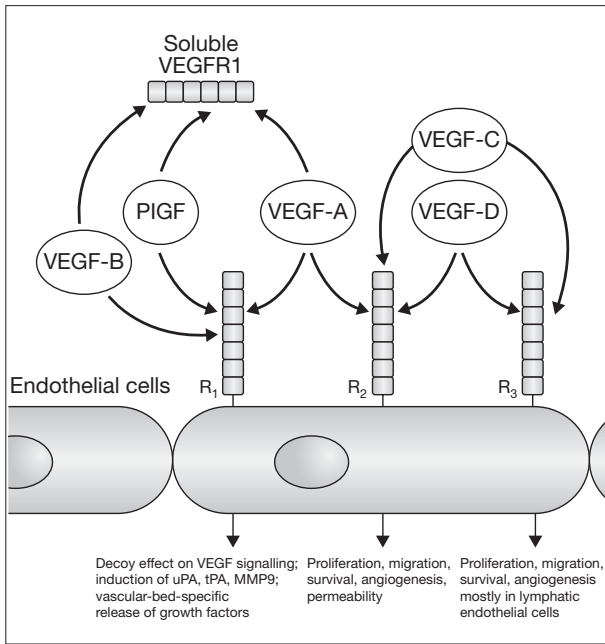


Figura 3. Factores del crecimiento y diferenciación de la célula endotelial. El factor de crecimiento y diferenciación de las células endoteliales es el VEGF-A y su asociación con el receptor VEGFR-2. El VEGF-A también se une al VEGFR-1, pero transmite señales diferentes, fundamentalmente de migración celular, el R1 compite con el R2 por la unión con el VEGF-A y de este modo la actividad angiogénica del VEGF. Los factores VEGF-C y D se unen al receptor R3, que participa en el desarrollo del sistema linfático. (Adaptado de la Ref. 6.)

tipo tirosincinasa Tie 1 y transmite su señal intracelular. Cuando la angiopoyetina 2 liga el mismo receptor, Tie 1, bloquea la actividad de la angiopoyetina 1^{15,18,19}. El factor angiopoyetina 1 y su receptor Tie 1 expresan una actividad que consiste fundamentalmente en la formación de vasos maduros, con fuerte adhesión de las células endoteliales, reclutamiento de pericitos a la pared y formación de matriz extracelular^{15,18,19} (fig. 1). El efecto contrario se obtiene con la ligadura de la angiopoyetina 2 y del receptor Tie 1, que conduce a una regresión vascular^{15,18,19}.

Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

Esta citocina multifuncional también participa en la maduración de la red vascular. Parece ser que su mayor función, después de ligar varios de sus receptores celulares es la diferenciación de los pericitos y adhesión de éstos a la pared vascular¹⁵. Mutaciones de uno de estos receptores del TGF- β , endoglin se asocian con malformaciones vasculares, telangiectasia hemorrágica¹⁶.

La angiogénesis también está muy relacionada con los factores de la coagulación y específicamente con el receptor de la trombina PAR-1. Estudios en ratones transgénicos demostraron que este receptor participa en la formación de la red vascular y su inactivación conduce a un aumento de mortalidad intraútero con manifestaciones hemorrágicas, debidas fundamentalmente a una desorganización de los capilares. Posible-

mente, la activación de PAR-1 por la trombina en la pared de las células endoteliales promueve el desarrollo de la red vascular y de la hemostasia²⁰.

Matriz extracelular-integrinas

El estímulo a la angiogénesis es un proceso complejo en el que se combinan varios factores, entre ellos se halla la modificación de la matriz extracelular, que facilita la migración de las células endoteliales. Estos cambios de la matriz permiten la asociación de las células endoteliales con componentes que promueven la migración, proliferación y diferenciación de las células endoteliales en capilares^{21,22}. Para facilitar la migración celular las células tienen que relajar su adhesión a la matriz y a sus asociaciones intercelulares, un proceso que es facilitado por el VEGF y por la angiopoyetina-2. La proteólisis de la matriz extracelular es inducida por varias enzimas, por ejemplo, por el activador urocinasa del plasminógeno (u-PA), y por la heparinasa que degrada sustratos específicos y libera los factores del crecimiento que están ligados a proteoglicanos. En esta fase también participan ciertas metaloproteinasas capaces de degradar la matriz extracelular, MMP-2, MMP-3 y MMP-9, entre otras, participan en una proteólisis controlada de la matriz extracelular y de este modo se exponen componentes que están ocultos en la molécula intacta, como es el caso del colágeno I, y estos nuevos componentes se asocian con las integrinas de la pared celular^{22,23}. El colágeno I tiene un papel importante en la angiogénesis, tanto el intacto como el parcialmente degradado, y ambos participan en fases distintas de la angiogénesis²². Las integrinas son receptores presentes en la membrana de las células de la pared celular, que adhieren las células a la matriz extracelular. Estos receptores son heterodímeros compuestos por las cadenas α y β , que en su porción extracelular ligan la célula a la matriz extracelular y vía su porción intracelular transmiten señales para la migración, proliferación y supervivencia de la célula^{24,25}. Entre estas integrinas de las células endoteliales la αV - $\beta 3$ y αV - $\beta 5$, han sido las más estudiadas en la angiogénesis. En modelos experimentales estas dos integrinas promueven la angiogénesis tanto la inflamatoria como la tumoral²⁶ y están altamente expresadas en las células que participan en la angiogénesis y escasas en los vasos quiescentes. Los inhibidores de estas dos integrinas disminuyen la respuesta angiogénica. Es interesante mencionar que cada una de estas dos integrinas funcionan en concierto con un factor distinto del crecimiento, la αV - $\beta 3$ con el bFGF y la αV - $\beta 5$ con el VEGF y cada una de estas integrinas junto su factor de crecimiento induce señales intracelulares específicas²⁷. Sin embargo, los estudios en ratones transgénicos ofrecen resultados contradictorios, por ejemplo, la inactivación de los genes de estas integrinas no sólo no inducen malformaciones vasculares en el feto²⁸, sino que, además estos ratones presentan una angiogénesis tumoral aumentada. Estos resultados tan contradictorios podrían explicarse por la re-

dundancia de las integrinas durante el desarrollo y podría ser que el papel de estas integrinas cambie en el contexto de una formación tumoral, de factores de crecimiento asociados a integrinas específicas, o con la regulación de las diferentes integrinas y su unión con una matriz extracelular específica del tumor^{29,30}. Estas integrinas cuando están ligadas a la matriz extracelular y en combinación con los factores de crecimiento envían señales intracelulares vía Ras-ERK que inducen la proliferación y previenen la apoptosis de la célula endotelial^{25,27}. Cuando este sistema esta operativo su disrupción con anticuerpos o péptidos pueden inducir la apoptosis celular e inhibir la angiogénesis^{25,29}. Otras integrinas como la $\alpha 5-\beta 1$ y su sustrato la fibronectina, y la integrina con la subunidad $\beta 8$ son esenciales para el desarrollo vascular y su inactivación genética conduce a la muerte intraútero²⁹.

Papel de la fibrina como matriz provisional

La fibrina forma parte de la matriz extracelular en varios tumores y también en procesos inflamatorios³¹. En estos estados patológicos la secreción del VEGF induce una extravasación de las proteínas plasmáticas, entre ellas la fibronectina y el fibrinógeno, que se convierte en fibrina debido a la activación de la coagulación vía el factor tisular, que está presente en la célula tumoral o en los macrófagos³¹. Eventualmente, la fibrina, que atrae macrófagos y fibroblastos es reemplazada por una matriz formada por varios tipos de colágeno y otras proteínas como la fibronectina. La fibrina contiene componentes que promueven la angiogénesis, actividad mediada a través de dominios moleculares que contienen el péptido Arg-Gly-Asp, que se unen a las integrinas $\alpha V-\beta 3$, $\alpha V-\beta 5$ y $\alpha 5-\beta$, entre otras³². En nuestro laboratorio, hemos estudiado los determinantes moleculares de la fibrina en relación a su habilidad para diferenciar las células endoteliales en estructuras similares a los tubos capilares. En este sistema experimental las células endoteliales son incubadas en fibrina tipo II (fibrinógeno tratado con trombina y sin fibrinopéptidos A y B) y estas células en presencia del bFGF crecen y forman una monocapa confluyente. Cuando se genera una segunda capa de fibrina encima de la monocapa celular, en pocas horas las células atrapadas entre las dos capas de fibrina se ensamblan en estructuras parecidas a tubos capilares y desarrollan lúmenes de diferentes diámetros³³. En este sistema lo específico, es la unión de la porción apical de las células endoteliales con la fibrina y no la adhesión de las células con la fibrina que sirve como matriz para el cultivo celular que da lugar a la monocapa, ya que en este caso el fibrinógeno también sirve como matriz. Un determinante estructural expresado en la fibrina II está compuesto por el fragmento $\beta 15-42$, que queda expuesto al quitar el fibrinopéptido B, y se une con la porción apical de las células endoteliales de la monocapa, y esta asociación es especial para la diferenciación celular³³. Otros estudios en nuestro laboratorio han demostrado que

la unión del fragmento 15-42 con una proteína de la pared celular de la célula endotelial, la VE-cadherina, es fundamental para formar los tubos semejantes a los capilares, además este fragmento $\beta 15-42$ es capaz de inhibir la formación de estas estructuras^{34,35}. Basados en estos estudios, otros investigadores, han demostrado en ratas que el péptido $\beta 15-42$, al ligar la VE-cadherina es capaz de inhibir la transmigración leucocitaria durante el infarto de miocardio y de este modo puede reducir el área de necrosis del miocardio³⁶. Otras matrices, como el colágeno tipo I, también han sido usadas para estudiar la diferenciación celular en tubos capilares. En este sistema, la ligadura de un fragmento del colágeno con la integrina $\alpha 2-\beta 1$ es fundamental y la VE-cadherina desempeñaría su importante papel en la fase de adhesión célula-célula para generar los tubos capilares³⁶.

En la morfogénesis de los tejidos, incluido el vascular, las asociaciones homotípicas célula-célula, son fundamentales en la generación del tejido. Esta interacción celular se establece a través de un grupo de moléculas que forman puentes intercelulares³⁸. Entre estas moléculas la familia de las cadherinas, en los vasos sanguíneos la VE-cadherina, tienen un papel esencial para el ensamblaje de las células endoteliales en vasos sanguíneos y su inactivación en el embrión conduce a la muerte fetal, debido al des-ensamblaje de los vasos^{39,40}.

Remodelación vascular

Una vez formada la nueva red capilar, fruto de la angiogénesis, este sistema es remodelado con generación de nuevas ramas vasculares en ciertas áreas y podada en otras, y estos cambios son útiles para adaptarse a las necesidades metabólicas del tejido⁴¹. La regresión de los vasos es parte de la remodelación y en este proceso juegan varios factores, desde la falta de estímulos angiogénicos, como el VEGF y Angio 1, al bloqueo de los receptores de estos factores, o al aumento de ciertas proteínas de la matriz extracelular que son antiangiogénicas. Entre estas, la más conocida es la trombospondina 1 y 2 que se asocian con la membrana endotelial a través del CD36 y esta unión interfiere con la migración e induce la apoptosis de la célula endotelial^{42,43}.

Estructura y mecanismos implicados en la formación de la red vascular tumoral

Los tumores, en general, usan los mismos mecanismos angiogénicos que los otros tejidos, pero también usan procesos que son característicos de la red vascular tumoral. En varios tumores la masa tumoral inicial no contiene vasos propios, y las células malignas rodean y usan los vasos de los tejidos circundantes, un fenómeno conocido como "coopción"^{3,44,45}. Estos vasos tienden a regresar induciendo una necrosis tumoral, pero como respuesta a la hipoxia hay un aumento de la síntesis del VEGF y de las angiopoyetinas, que conforman el cambio del tumor a proangiogénico (*an-*

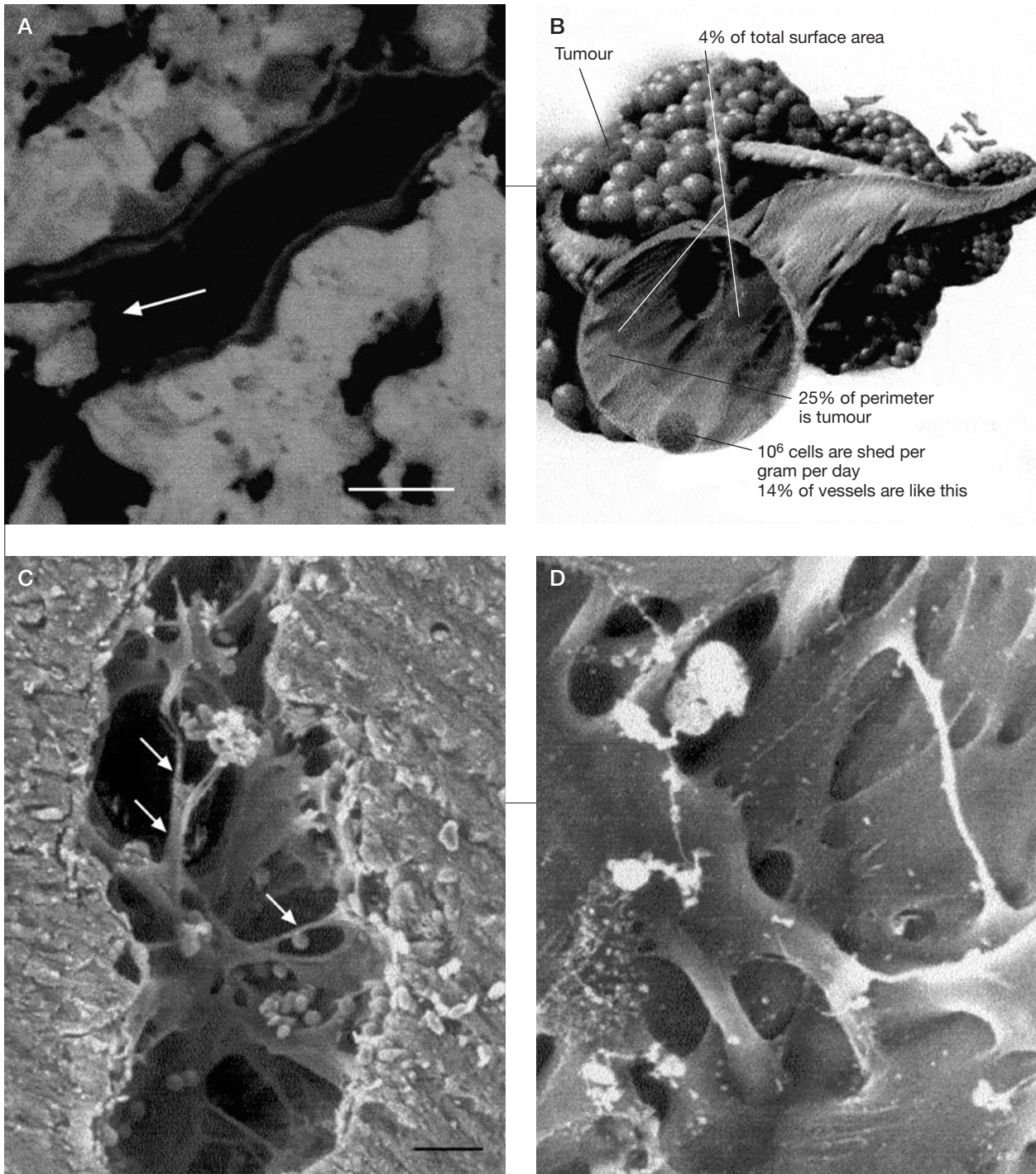


Figura 4. Vascularización tumoral. Células cancerosas (**A**) en el lumen de vasos sanguíneos, algunas de éstas forman parte de la pared vascular, células cancerosas y las endoteliales. Estructura de vasos mosaicos en carcinoma del colon (**B**). El tumor rodea la vaso y ~ 4 % del área de la superficie vascular esta formada por células tumorales. Varias anomalías de los vasos sanguíneos tumorales (**C y D**). (Adaptado de la Ref. 3.)

giogenic switch)^{1,3}. El mecanismo más común para formar nuevos vasos es la angiogénesis, generalmente por brotes de capilares a partir de vasos ya formados, y en algunos casos por intususcepción^{3,44}. Una diferencia muy significativa en la angiogénesis tumoral es la presencia de vasos mosaicos, donde parte de la pared vascular no contiene células endoteliales y estas son sustituidas por células tumorales^{3,44}. Estudios con

células tumorales marcadas han demostrado, que en el carcinoma de colon el 15 % de los vasos son mosaicos y el 4 % de la superficie vascular está ocupada por células tumorales, y además estos vasos son funcionales⁴⁶ (fig. 4). En otros tumores la pared vascular carece de células endoteliales y los canales vasculares están formados por células tumorales, un fenómeno conocido como, "Vascular Mimicri", este mimetismo

vascular parece operativo en ciertos tumores muy agresivos, como el melanoma de la úvea^{44,47} (fig. 4). Tampoco está claro si estas células se han diferenciado, ya que expresan, al menos en parte, el fenotipo de la célula endotelial, por ejemplo la VE-cadherina, el factor de von Willebrand, o el VEGFR-2⁴⁴. Estudios en sistemas experimentales indican que la encima PI3K, activada por ciertas tirosincinasas, tiene un papel importante en este proceso y su inactivación conduce a la supresión de este mecanismo de mimetismo vascular⁴⁸. Relacionado con el fenotipo de la célula endotelial, un estudio muy interesante, ha demostrado que las células endoteliales presentes en los vasos de varios linfomas de célula B, expresan las mismas anomalías cromosómicas que definen el tipo de linfoma. Por ejemplo, las células endoteliales presentan la translocación (14:18) del linfoma B-folicular o la translocación (11:14) del linfoma B-manto, o las translocaciones características de otros linfomas. Una media del 35 % de las células endoteliales microvasculares expresaban las alteraciones cromosómicas, y estas células combinan la morfología y el fenotipo de la célula endotelial^{49,50}. El mecanismo de esta alteración no se ha aclarado, podría ser que la célula precursora común al linfocito B y de la célula endotelial haya mutado, en cuyo caso las células diferenciadas contienen el mismo material cromosómico, o es posible que haya fusión de dos células, una del linfoma y la otra endotelial. Ciertamente, estos estudios abren una línea de investigación muy importante que puede repercutir en el abordaje terapéutico de estos tumores (fig. 5).

La red vascular de los tumores se puede complementar a través de la vasculogénesis. En este caso las células precursoras de las células endoteliales son reclutadas de la médula ósea, o de las que circulan en sangre periférica^{3,44,51}. El porcentaje de células precursoras que participan en la vasculogénesis tumoral es un tema controvertido, y es probable que estos resultados dependan del tipo de tumor, de la fase tumoral, de las condiciones experimentales y de la especie en estudio^{44,51,52}. Un trabajo reciente ha analizado el origen de las células tumorales en pacientes con trasplante de médula ósea, donde el recipiente y donante eran del sexo opuesto. Análisis con hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y anticuerpos demostraron que el tumor contenía una media del 4,9 % de células endoteliales del donante. Estos estudios sugieren que los tumores humanos se comportan de un modo diferente comparado a los estudios experimentales en animales⁵³. Independientemente de si las células precursoras endoteliales participan en la formación vascular del tumor, la presencia de estas células en sangre periférica de ratones, se han usado como un marcador de la angiogénesis tumoral⁵⁴.

Características morfológicas y funcionales de la red vascular tumoral

La red vascular de los tumores es diferente de la de los tejidos normales. La angiogénesis puede ser incompleta e irregular, los capilares son tortuosos y de diá-

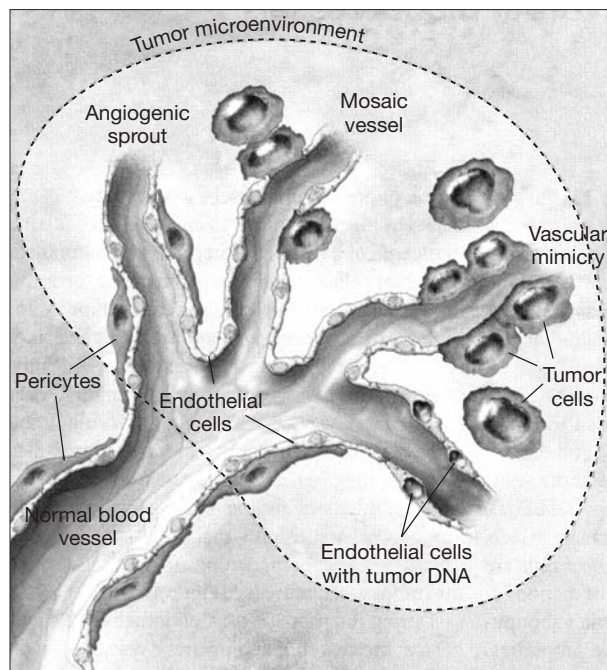


Figura 5. Mecanismos de las diferentes formas de la vascularización tumoral. La forma más común es la angiogénesis por brotes. En algunos casos la pared vascular está formada por células endoteliales y también por células tumorales, vasos mosaicos. Raramente las células tumorales forman canales vasculares, mimetismo vascular. En linfomas las células endoteliales expresan las translocaciones características del linfoma, como puede ser el (11:14).

metros diferentes, y estas alteraciones parecen ser debidas a un imbalance entre las factores del crecimiento, como el aumento del VEGF y disminución de la angiopoyetina 1 (fig. 3). También la pared vascular es anormal, por ejemplo, contiene ventanas debido a la fenestración de las células endoteliales y con una adherencia deficiente de los pericitos a la pared vascular^{3,4,41,55}. Como hemos descrito anteriormente, las células de la pared vascular en el tumor pueden estar constituidas por células tumorales, formando vasos mosaicos, y las células endoteliales pueden expresar, en parte, las características de la célula tumorales. Todos estos factores contribuyen a una gran heterogeneidad topográfica de la red vascular. Estas características anatómicas se traducen en una excesiva permeabilidad con acumulación de eritrocitos, leucocitos, proteínas y edema. Estos factores, aumentan la presión intratumoral, con detrimento de la circulación y aumento de la hipoxia tumoral. Además, selecciona las células tumorales que puedan sobrevivir en condiciones metabólicas tan adversas³. Las características de los capilares en el tumor también se aplican a los vasos linfáticos, éstos presentan una pobre actividad funcional, y además la compresión mecánica en el centro del tumor interfiere con la circulación linfática. En la periferia el tumor puede desarrollar hiperplasia linfática debido a los factores de crecimiento, como el VEGF-C y D. La expansión linfática y aumento de la permeabilidad vascular facilita la metástasis tumoral a los vasos linfáticos^{3,41,56}.

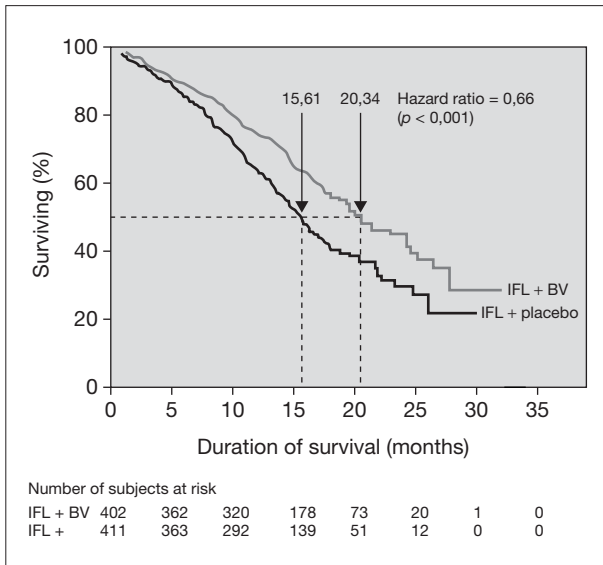


Figura 6. Efecto del anticuerpo bevacizumab en la supervivencia media en cáncer del colon. Los pacientes tratados con quimioterapia y bevacizumab sobrevivieron unos 5 meses más, comparados con pacientes tratados con quimioterapia y placebo. (Adaptado de la Ref. 6.)

Terapia antiangiogénica tumoral

En 1971 J. Folkman formuló la propuesta de que los tumores se expandían y producían metástasis debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos⁵⁷, una idea muy fructífera que ha ampliado enormemente el conocimiento de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. El mayor conocimiento de los mecanismos que dirigen la angiogénesis tumoral ha influido en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. El mayor objetivo de la terapia antiangiogénica, es el controlar el crecimiento tumoral, y también el de evitar las metástasis. Aunque la terapia no sea capaz de eliminar el núcleo primario tumoral, éste no suele tener consecuencias clínicas negativas para el paciente. Otro aspecto fundamental de la terapia antiangiogénica, es que debe ser específica, y no interferir con la circulación de los tejidos normales. Ello es posible porque en el adulto la angiogénesis es prácticamente nula, ya que la vida media de los vasos es muy larga, y además la anomalía de los vasos tumorales los hace más susceptibles a la acción de los agentes antiangiogénicos. En relación con los objetivos de la terapia antiangiogénica existen dos conceptos que parecen ser contradictorios. De un lado, los agentes antiangiogénicos pueden inducir la muerte de los vasos sanguíneos, causando la necrosis tumoral, y del otro lado, también es posible que estos agentes disminuyan la circulación y produzcan hipoxia, reforzando el crecimiento tumoral y seleccionando aquellas células capaces de sobrevivir a la hipoxia. Además, un colapso vascular del tumor puede interferir con la circulación intratumoral de los agentes quimioterapéuticos. Por ello, se ha propuesto que el objetivo principal de la terapia antiangiogénica sirva fundamentalmente para normalizar la circulación tumoral⁵⁸.

Entre los agentes antiangiogénicos, el más estudiado es el que bloquea la actividad del VEGF, estudios justificados por el papel principal de este factor en la angiogénesis y también por el aumento del ARNm y de la expresión del VEGF en varios tumores⁶. Lógicamente muchos de los estudios clínicos se centraron en el desarrollo de agentes con actividad anti-VEGF. Entre estos compuestos, un anticuerpo murino monoclonal humanizado, bevacizumab, Avastin, demostró su capacidad para neutralizar todas las formas del VEGF-A⁶. Los ensayos clínicos preliminares demostraron cierta eficacia en el cáncer colorrectal, pero sólo cuando el anticuerpo es combinado con quimioterapia. Un estudio clínico en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis y no tratados previamente, recibieron una combinación que incluyó quimioterapia, con irinotecan, fluorouracil y leucovorin más bevacizumab, fue superior comparado con la misma quimioterapia y placebo. Los resultados clínicos demostraron una prolongación de la vida de 5 meses en el grupo tratado con quimioterapia y bevacizumab, comparado con el grupo que recibió sólo quimioterapia y placebo⁵⁹ (fig. 6). La única complicación seria de este tratamiento fue la hipertensión, que se controló con medicación. Otra complicación, la trombosis, no fue mayor en el grupo tratado con el anticuerpo⁵⁹. Esta eficacia está respaldada por la demostración de que una sola infusión de bevacizumab produce una disminución de la perfusión del tumor en el cáncer del recto y también disminuye la densidad microvascular, aumentan los pericitos en la pared vascular y se observó una disminución del número de células progenitoras de las células endoteliales⁶⁰. Otros agentes, que bloquean el VEGF, o bien inhiben sus receptores, se hallan en estudio y en diversas fases de ensayos clínicos⁶¹. Uno de estos compuestos, PTK787, es un inhibidor de los receptores tirosinasa del VEGF, R1 y R2, aunque también manifiesta menor actividad contra el receptor PDGF-B. Este compuesto, inhibe la proliferación de las células endoteliales y en experimentos *in vivo* interfiere con el crecimiento de varios tumores humanos implantados en ratones⁶². Los estudios clínicos con este agente se hallaban en el 2004, en fase III. La angiogénesis también está regulada por componentes de algunas proteínas, por ejemplo, angiostatín y endostatín, la primera es un fragmento del plasminógeno y la segunda del colágeno XVIII⁶³. Varios estudios experimentales están siendo analizados, especialmente cuando estos agentes se combinan con quimioterapia, o radiación^{64,65}. Una de los fármacos más interesantes, usados fundamentalmente en enfermedades hematológicas, como el mieloma múltiple, o la mielodisplasia, es la talidomida, un compuesto que no pertenece a los clásicos agentes quimioterapéuticos, y cuyo mecanismo de acción no está completamente aclarado. Uno de los mecanismos propuestos es su efecto antiangiogénico⁶⁶. Recientemente, un estudio de un derivado de la talidomida, lenalidomida, revlimid, ha sido analizado en ensayos angiogénicos experimentales y este agente inhibe la migración de las células endoteliales e interfiere con la angiogénesis, estudiada en condiciones *in*

*vivo*⁶⁷. Además, este fármaco induce la apoptosis de las células del mieloma múltiple⁶⁸. Los progresos terapéuticos en la angiogénesis han sido modestos y solamente con un conocimiento más profundo de los mecanismos implicados en la angiogénesis tumoral se podrán desarrollar terapias eficaces, que inhiban el crecimiento de los vasos tumorales sin afectar la red vascular normal. Los rápidos avances en la genómica y proteómica pueden, en corto tiempo, conseguir estos objetivos, como ejemplo, citaremos un estudio donde se demuestra que la membrana de las células endoteliales de vasos tumorales, expresan proteínas que son únicas cuando se comparan con el perfil de las células endoteliales de tejidos normales⁶⁹. Estas propiedades permitirán el desarrollo de agentes, anticuerpos y pépticos, que ataquen solamente este grupo de células, y se cumpla el objetivo de inhibir el crecimiento y las metástasis de los tumores.

Bibliografía

- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:10931-4.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653-60.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.
- Tang DG, Conti CJ. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30:109-17.
- Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J*. 1997;11:365-73.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:391-400.
- Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, Martínez R, Moller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72:835-46.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13:9-22.
- Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*. 2003;54:17-28.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003;9:677-84.
- Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood*. 2004;103:4527-35.
- Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost*. 2003;90:167-84.
- Jain RK, Padera TP. Development. Lymphatics make the break. *Science*. 2003;299:209-10.
- Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tani M, Okano S, et al. Essential role of PDGFRalpha-p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFRalpha during angiogenesis. *Circ Res*. 2004;94:1186-94.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685-93.
- Lindahl P, Johanson BR, Leveen P, Besots C. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B Mice. *Science*. 1997;277:242-5.
- Mashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells as vascular progenitors. *Nature*. 2000;408:92-6.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;117:1-80.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-8.
- Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*. 2001;293:1666-72.
- Brooke BS, Karnik SK, Li DY. Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol*. 2003;13:51-6.
- Stromblad S, Chersesh DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol*. 1996;3:881-5.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389-95.
- Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*. 1999;9:M33-7.
- Stupack DG, Chersesh DA. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2004;64:207-38.
- Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Chersesh DA. Integrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest*. 1995;96:1815-22.
- Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Chersesh DA. Differential alpha v integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol*. 2003;162:933-43.
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med*. 2002;8:14-6.
- Sheppard D. Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore. *J Clin Invest*. 2002;110:913-4.
- Carmeliet P. Integrin indecision. *Nat Med*. 2002;8:27-34.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315:1650-9.
- Suehiro K, Gailit J, Plow EF. Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272:5360-6.
- Chalupowicz DG, Chowdhury ZA, Bach TL, Barsigian C, Martínez J. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J Cell Biol*. 1995;130:207-15.
- Bach TL, Barsigian C, Yaen CH, Martínez J. Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin. *J Biol Chem*. 1998;273:30719-28.
- Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann NY Acad Sci*. 2001;936:386-405.
- Petzlauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, Castellino FJ, et al. The fibrin-derived peptide beta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat Med*. 2005;11:298-304.
- Sweeney SM, DiLullo G, Slater SJ, Martínez J, Iozzo RV, Lauer-Fields JL, et al. Angiogenesis in collagen I requires alpha2beta1 ligation of a GFP*GER sequence and possibly p38 MAPK activation and focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*. 2003;278:30516-24.
- Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:261-70.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999;98:147-57.
- Crosby CV, Fleming PA, Argraves WS, Corada M, Zanetta L, Dejana E, et al. VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood*. 2005;105:2771-6.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685-93.
- Lawler J, Detmar M. Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:1038-45.

43. Simantov R, Febbraio M, Silverstein RL. The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol.* 2005;24:27-34.
44. Auguste P, Lemiére S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;54:53-61.
45. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 1999;284:1994-8.
46. Chang YS, Di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14608-13.
47. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155:739-52.
48. Hess AR, Sefter EA, Sefter RE, Hendrix MJ. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* 2003;63:4757-62.
49. Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wagner O, et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2004;351:250-9.
50. Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis – not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med.* 2004;351:215-6.
51. Gothert JR, Gustin SE, Van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, et al. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood.* 2004;104:1769-77.
52. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337-46.
53. Peters BA, Díaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med.* 2005;11:261-2.
54. Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell.* 2005;7:3-4.
55. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.* 2000;156:1363-80.
56. Nisato RE, Tille JC, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost.* 2003;90:591-7.
57. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-6.
58. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005;307:58-62.
59. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2335-42.
60. Willett CG, Boucher Y, Di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med.* 2004;10:145-7.
61. Building a better Trap. Building a better Trap. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7785-90.
62. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* 2000;60:2178-89.
63. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med.* 2003;3:643-51.
64. Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, et al. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and anti-tumor effects. *Cancer Res.* 2003;63:8890-8.
65. Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Improving tumor response to radiotherapy by targeting angiogenesis signaling pathways. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18:1039-57.
66. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.
67. Dredge K, Horsfall R, Robinson SP, Zhang LH, Lu L, Tang Y, et al. Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvasc Res.* 2005; 69:56-63.
68. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood.* 2002;99:4525-30.
69. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature.* 2004; 429:618-9.