



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y PROLIFERACIÓN DE
CÉLULAS ENDOTELIALES EN ÓRGANOS DE RATÓN CON
METÁSTASIS

FRANCISCA ANGERSTEIN ARANCIBIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA: DR. DAVID LEMUS

SANTIAGO, CHILE

2003



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN ÓRGANOS DE RATÓN CON METÁSTASIS

FRANCISCA ANGERSTEIN ARANCIBIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DAVID LEMUS
PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA
PROFESOR CONSEJERO: ESTEFANÍA FLORES

SANTIAGO, CHILE

2003

RESUMEN

La búsqueda de tratamientos alternativos para el cáncer es un gran desafío para la comunidad científica moderna, ya que la aparición de resistencia a los tratamientos utilizados, por parte de los diversos tipos de tumor, es un problema aún sin resolver. Se ha visto y comprobado que la angiogénesis (desarrollo de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes) es un fenómeno estrechamente ligado al crecimiento tumoral y la capacidad metastásica del cáncer, por lo que su limitación es un nuevo camino de investigación en búsqueda de un tratamiento definitivo.

Con el objetivo de estudiar el efecto angiogénico tumoral analizamos el efecto del implante intramuscular profundo de tumor TA₃-MTX-R. en el modelo de ratón (*Mus musculus*) AJ hembras, clínicamente sanas. Para ello, se utilizaron 2 grupos de 8 ratones cada uno. Un grupo control (A) al cual se le aplicó suero fisiológico y un grupo experimental (B), al cual se le inoculó por vía intramuscular tumor el mismo día. A los ratones se les realizó mediciones del crecimiento tumoral y se esperó hasta la muerte natural de estos, debido al tumor primario y sus metástasis. Se realizó estudio histológico e inmunohistoquímico con conteo de los capilares en un área de estudio estándar, para evaluar angiogénesis, tanto en tumor como en tejidos blanco de metástasis. Los resultados se analizaron estadísticamente, mostrando un importante aumento en la angiogénesis de los ratones con tumor versus los controles. Se constató también que el tumor tiene la capacidad de sacar a las células endoteliales de su estado de reposo del ciclo celular (G₀), para hacerlas entrar en una proliferación acelerada.

ABSTRACT

The search of alternate cancer treatments has opened a big challenge to the modern science community, due to the resistance to traditional treatment, observed in a varieties of tumors. It has been proved that angiogenesis (development of new blood vessels from the existing vascular network) is essential for tumor progression and metastasis. The limitation of angiogenesis is thus a new possible treatment under study to cure cancer definitely.

To learn more about tumoral angiogenesis we studied the effect of a deep intramuscular implant of TA₃-MTX-R tumor in AJ healthy female mice (*Mus musculus*). Two groups of eight mice each were used: Group (A) as a control group (we inoculated them with saline) and group (B) as the experimental group, where we made the same day a deep intramuscular implant. We measured the tumoral growth of both groups until the natural death occurred because of the primary tumor and development of metastasis.

A histological and immunohistochemical study was made, counting vessels in a standard area, to evaluate angiogenesis in tumor and in white metastatic tissue. The results were statistically analyzed; as a result an important increase of angiogenesis in the experimental group versus the control group was observed. It was also noticed that the tumour was able to move endothelial cells from the idle cellular cycle back to an accelerated dividing status.

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

ÍNDICE DE MATERIAS.....	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV

PÁGINAS DE TEXTO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 OBJETIVOS GENERALES	
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	18
5.1 MATERIALES	
5.1.1 Material Biológico.....	18
5.1.2 Línea Tumoral.....	18
5.2 MÉTODOS	
5.2.1 Obtención de células tumorales (TA ₃ -MTX-R).....	19
5.2.2 Crecimiento del tumor primario.....	19

5.2.3 Sacrificio de animales.....	20
5.2.4 Necropsia de los animales sacrificados.....	20
5.2.5 Preparación de cortes histológicos.....	20
1.) Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	21
2.) Inmunohistoquímica.....	21
2.1 Tinción con BrdU.....	21
2.2 Técnica de los anticuerpos anti CD-31.....	22
3.) PAS.....	22
5.2.6 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1 Descripción del desarrollo de tumor TA ₃ MTX-R.....	23
6.2 Diagnóstico anatomopatológico de metástasis en la necropsia de los ratones.....	27
6.3 Presencia de células tumorales en cortes histológicos de órganos.....	29
6.3.1 Descripción de lo observado en cada órgano.....	34
6.4 Inmunohistoquímica.....	40
6.4.1 Tinción con BrdU.....	40
6.4.2 Tinción con anti CD-31.....	41
6.4.3 Tinción con PAS.....	41
6.5 Recuento de vasos sanguíneos.....	43
8. CONCLUSIONES.....	48
9. BIBLIOGRAFÍA.....	49

10. ANEXOS.....	54
10.1 Procesamiento de muestras.....	54
10.1.1 Técnica Inmunohistoquímica de la bromodeoxiuridina	55
10.1.2 Técnica Inmunohistoquímica AntiCD-31.....	57
10.1.3 Método del ácido periódico Schiff (PAS) para identificar glicosaminoglicanos de membranas basales.....	59

INDICE DE ABREVIATURAS

Ang-1:	Angiopoyetina-1
Ang-2:	Angiopoyetina-2
BrdU:	Bromodeoxiuridina
CT:	Células tumorales
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico
Grupo A:	Grupo Experimental
Grupo B:	Grupo Control
H-E:	Hematoxilina-Eosina
PGF:	Factor de crecimiento plaquetario
TA₃-MTX-R:	Tumor TA ₃ metotrexato resistente
TGFβ:	Factor de crecimiento y transformación β
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular

* En esta memoria de título se consideró la palabra ganglio como un sinónimo de linfonodo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis, especialmente a mis padres, quienes permitieron que yo llegara hasta acá y a quienes les dedico esta Memoria de Título.

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Lemus, por recibirme en su laboratorio y por haberme brindado la oportunidad de conocer esta increíble área de la oncología.

También quiero agradecer a la Dra. Fuenzalida, al Dr. Guerrero y a Irma del Laboratorio de Histología, por su ayuda y excelente disposición. Asimismo, quisiera agradecer a la Dra. Cepeda que siempre estuvo dispuesta a ofrecerme su tiempo para ayudarme con la revisión y redacción de esta memoria.

Luego quisiera agradecer a mis hermanas, por su ayuda y apoyo con mis frustraciones, además de paciencia con mis malos genios.

Finalmente, deseo agradecer a mis amigos con quienes mutuamente siempre nos subimos el ánimo en esta larga tarea, que es desarrollar la Tesis de Grado.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad muy grave que afecta, según estadísticas norteamericanas, a una de cada tres personas durante su vida, de las cuales 50-60% morirá por esta causa. Cada minuto muere alguien de cáncer en USA y no es sorprendente que ésta sea la segunda causa de muerte en Norteamérica, después de las enfermedades cardiovasculares. Según estudios epidemiológicos, en los próximos años pasaría a ser la causa principal (Jeong, 1996), debido al avance en las terapias y cirugías cardiovasculares menos invasivas.

En Chile, el cáncer es también la segunda causa de muerte, con un porcentaje aproximado de 25%, bastante menor al de USA, pero se espera que estas cifras aumenten a medida que el desarrollo del país aumente.

En medicina veterinaria las estadísticas son similares, ya que los avances científicos han logrado aumentar la esperanza de vida considerablemente y por ende, han aumentado las enfermedades de presentación más frecuente en edad avanzada, como son los cánceres.

Es por esta razón, que se ha vuelto tan importante idear un tratamiento efectivo contra esta enfermedad.

Desde hace varias décadas, los científicos del área médica y médica veterinaria buscan una terapia alternativa a la quimioterapia y radioterapia para el tratamiento del cáncer, que destruya selectivamente las células neoplásicas sin dañar los tejidos sanos. En el caso del cáncer, esto es muy difícil, puesto que el tejido neoplásico proviene de células del propio organismo y por lo tanto no hay grandes diferencias en su origen y funcionamiento para el ataque selectivo. Por otro lado, se busca una terapia eficiente y que por lo tanto el tumor no pueda generar resistencia.

Actualmente, son muchas las universidades y hospitales de todo el mundo que estudian la posibilidad de usar terapias antiangiogénicas en el tratamiento del cáncer, ya que presentaría ventajas altamente beneficiosas (Chapey *et al*, 1996), tales como:

- No generar resistencia por parte del tumor, ya que las células endoteliales son genéticamente estables y homogéneas, y son raras las mutaciones espontáneas.
- No producir supresión de la médula ósea, por lo tanto no generaría inmunodeficiencia en el paciente ni los síntomas adversos tan desagradables de la quimioterapia, tales como caída del cabello y signos gastrointestinales, entre otros.
- Pueden ser administradas sistémica o localmente, no requiriendo equipamiento especial para su uso.
- La terapia antiangiogénica podría potencialmente aumentar la llegada de quimioterápicos al tumor primario y aumentar la respuesta a la radioterapia, gracias a la disminución de vasos alterados y también disminuir el crecimiento y formación de metástasis.

A pesar que se han logrado grandes avances en la investigación de terapias alternativas a la quimioterapia para el tratamiento del cáncer, aún queda mucho por dilucidar, para que este tratamiento además de ser efectivo, sea seguro para la salud del paciente tratado.

2. Revisión Bibliográfica

A pesar de que el cáncer ha adquirido mayor importancia en el último tiempo, no lo podemos considerar como una patología nueva. Tumores malignos se han descrito a través de dibujos y escritos de muchas civilizaciones antiguas de Asia, Sudamérica y Egipto, incluso se han diagnosticado osteosarcomas en momias egipcias.

El cáncer, llamado así por la morfología similar a un cangrejo que puede llegar a presentar, se ha visto que puede afectar a todas las especies animales superiores conocidas, teniendo un comportamiento distinto en cada individuo, según el tipo histológico de cáncer. Puede presentarse a cualquier edad, pero es más probable que afecte a personas de edad avanzada, por lo general, a partir de los 55 años, aunque también puede presentarse en niños, siendo esta la segunda causa principal de muerte en niños de edades comprendidas entre 1 y 15 años. Ya que el cáncer puede presentarse también con otras formas, incluso más difusas, se decidió cambiar el término a neoplasia y mantener el nombre de cánceres para todos los tumores malignos.

La palabra tumor, proviene del término tumefacción, ya que se vio que muchas neoplasias, aunque no todas, se asociaban a aumentos de volumen.

El término más aprobado por los oncólogos para describir este tipo de patologías es neoplasia, ya que significa literalmente “nuevo crecimiento”, y cuya definición más exacta es la que dio Sir Rupert Willis en 1952: “Una neoplasia es una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales y que no está coordinado con estos mismos; carece de finalidad y persiste en la

misma manera excesiva después de cesar el estímulo que desencadenó el cambio”.

Se ha determinado, que en una neoplasia células malignas proliferan a partir de una célula precursora normal simple, originando una progenie también maligna, pero de tipo heterogénea, debido a efectos genéticos e influencias microambientales tisulares que ocurren durante el crecimiento tumoral. Esto lleva a una gran heterogeneidad en las propiedades de las células neoplásicas individuales, que pueden afectar el desarrollo tumoral, tales como características invasivas, propiedades metastásicas, resistencia a agentes terapéuticos y por lo tanto progresión tumoral.

A través de investigaciones, se ha visto que existen oncogenes que codifican para ciertas proteínas que pueden llevar a que una célula normal mute y sufra cambios malignos. Muchos de estos genes están involucrados en la transmisión normal de señales promotoras de crecimiento de la superficie celular al núcleo (ej. Genes Ras y Src) o de factores de transcripción (ej. Myc y Fos).

Por otro lado, se ha determinado también que existen genes supresores de tumores, que si ambas copias de los genes se pierden, mutan o inactivan, generan crecimiento tumoral (ej. Rb, p53, etc.), por lo tanto, la función celular normal se ve controlada por un equilibrio de señales positivas y negativas recibidas del interior y exterior celular (Tannock *et al*, 1998).

En un tejido normal existe un equilibrio entre proliferación y muerte celular, en cambio en el crecimiento tumoral, hay una proliferación descontrolada de células, disminución de la muerte celular programada (apoptosis) y procesos neoangiogénicos. Sin nuevos vasos, la neoplasia no podrá crecer ni invadir órganos a distancia (metástasis), ya que necesita nutrientes y oxígeno que llegan a través de la sangre y que, además, le permiten eliminar sustancias de desecho.

Esta teoría formulada por Judah Folkman y Pietro Gullino, el año 1971, ha impulsado dramáticamente al estudio de la angiogénesis en el área oncológica, dando resultados muy prometedores para el control del cáncer en un futuro no muy lejano, ya sea combinado a quimioterapia o radioterapia.

Cada día es un reto la búsqueda de un tratamiento eficaz para la cura del cáncer. Actualmente, existen seis formas principales para tratar una neoplasia y el médico puede utilizar un solo método o una combinación de varios:

- Cirugía, donde se extrae el tumor completo o una parte, además de tejido enfermo y/o ganglios cercanos.
- Radioterapia, donde se aplica radiación ionizante, con el fin de reducir el tamaño de ciertos tumores, pero es solamente útil en neoplasias localizadas y de tamaño reducido.
- Quimioterapia, donde a través de ciertas drogas se ataca a las células de rápida proliferación.
- Terapia hormonal, en tumores hormona dependiente.
- Terapia biológica, principalmente referida a la inmunoterapia.
- Terapia antiangiogénica

El primero que empezó a estudiar la angiogénesis tumoral como un tratamiento alternativo para el cáncer fue Folkman, en los años 70, quien sugirió que los tumores cancerosos debían producir sustancias que estimularan su invasión por vasos sanguíneos. De esta forma, los tumores podrían alimentarse y crecer. Muchos fueron escépticos ante esta propuesta, hasta que a principios de los 80 el equipo de Folkman aisló e identificó una serie de factores angiogénicos que provocaban la neovascularización de los tumores. El siguiente paso era inhibir la angiogénesis con el fin de frenar el crecimiento y dispersión del tumor. El grupo de Napoleone Ferrara el año 1993 en Genentech, San Francisco, logró detener el crecimiento de un tumor en ratones sólo con la administración de

anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento y supervivencia de las células endoteliales. Poco después, en 1994, un grupo alemán demostró que en ratones carentes del receptor tipo 2 para el VEGF se inhibía el crecimiento de glioblastomas. Parecía entonces claro que el sistema VEGF y su receptor eran fundamentales para la progresión de tumores sólidos. Ese mismo año, el grupo Folkman descubrió un factor inhibidor de la vascularización tumoral, la angiostatina, producida por los propios tumores. La angiostatina, un fragmento del plasminógeno, era capaz de inhibir específicamente la proliferación endotelial, al hacer refractaria las células endoteliales a los estímulos angiogénicos, además de inducir apoptosis en éstas, con la consecuente regresión tumoral. Folkman y su equipo descubrieron el año 1994 un inhibidor endógeno de la angiogénesis, la endostatina, un fragmento C-terminal de 20kD del colágeno XVIII, también producido por ciertos tumores, que produce la regresión de grandes tumores primarios hasta tamaños microscópicos, sin provocar efectos tóxicos. (Folkman, 1995) El más reciente inhibidor endógeno descubierto es la vasostatina, un fragmento de la calreticulina que inhibe exclusivamente la proliferación de células endoteliales, inhibiendo así la angiogénesis y suprimiendo el crecimiento tumoral. La ventaja de este inhibidor sobre los otros es que la vasostatina es una molécula estable, pequeña, soluble, fácil de producir y administrar. Por otro lado, la dosis requerida es baja y su duración es larga, además de no tener efectos secundarios en otros órganos. (Pike *et al*, 1998 ; Cheng *et al* 2001)

Angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, lo que ocurre, principalmente, en procesos fisiológicos, cicatrización, ciclo menstrual y formación de placenta, como en procesos patológicos, inflamación crónica, fibrosis, crecimiento tumoral y metástasis. (Griffioen y Molena, 2000) La angiogénesis es un proceso multifactorial

controlado por factores proangiogénicos y antiangiogénicos, cambios genéticos y condiciones microambientales tisulares. En condiciones normales, predominan los factores angiostáticos sobre los proangiogénicos en los tejidos, por lo cual las células endoteliales se mantienen en fase G0 o de reposo del ciclo celular (Danekamp, 1990), es decir, son células estables, maduras, que no se multiplican, pero pueden entrar al ciclo si se requieren capilares en neoformación durante los procesos de reparación fisiológica. En un adulto normal, sólo 0,01% de las células endoteliales están en división, ya que pueden sobrevivir por años en estado de G0. Si este sistema se desequilibra, aumentando los factores proangiogénicos o disminuyendo los antiangiogénicos, se desarrollará una patología. La angiogénesis es un proceso complejo que involucra a las células endoteliales, pericitos, factores u hormonas paracrinas, receptores, kinasas, transductores de señales y matriz extracelular. Los procesos de angiogénesis ocurren en etapas sucesivas que comienzan con la activación, desestabilización y disociación de las células endoteliales, con hidrólisis de la membrana basal capilar y separación de las células de la pared vascular, mediado principalmente por una glicoproteína denominada angiopoyetina-2 (Ang-2). La segunda fase se denomina proliferación, ya que en ésta los elementos disociados experimentan una multiplicación inducida principalmente por VEGF. A continuación, las células endoteliales se disponen delimitando estructuras tubulares y forman una nueva membrana basal. En esta etapa de asociación y en la siguiente interviene la angiopoyetina-1 (Ang-1). La última etapa es la de estabilización, ya que finalmente los vasos neoformados maduran y se estabilizan gracias a las interacciones de las células de la pared vascular y a la resistencia de las células a la apoptosis, reiniciándose así el flujo sanguíneo. La Ang-1 tiene una importante función en la maduración y el mantenimiento de los vasos. Tanto la Ang-1 como

el VEGF inducen mecanismos antiapoptóticos en las células endoteliales (Ausprunk y Folkman, 1997).

La apoptosis es un proceso biológico que en condiciones fisiológicas regula y mantiene a las poblaciones celulares. Un desequilibrio entre los factores reguladores proapoptóticos y antiapoptóticos es un factor clave en la patogenia del cáncer. La mayoría de las drogas antineoplásicas actúan mediante la inducción de apoptosis en la célula tumoral, así, uno de los mecanismos responsables de la resistencia intrínseca a quimioterápicos por un tumor sólido es la activación de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas. De aquí la gran importancia de adquirir mayor conocimiento de los mecanismos que inducen y controlan la angiogénesis y apoptosis, lo cual permitiría diseñar un nuevo enfoque terapéutico del cáncer y desarrollar métodos para influenciar farmacológicamente estos dos procesos que cumplen un rol clave en la patogénesis de tumores sólidos.

Las terapias angiogénicas tienen varias aplicaciones en el campo de la medicina, tales como diagnóstico y pronóstico de patologías a través de la cuantificación de la angiogénesis para predecir ocurrencia de metástasis, recurrencia de un tumor, diferenciar procesos neoformativos y predecir involución de las lesiones. Otro uso es la aceleración terapéutica de la reparación en pacientes con úlcera (Griffioen y Molena, 2000) y en enfermedades isquémicas, como infarto del miocardio (Carmeliet *et al*, 1999), donde la estimulación de la angiogénesis evitaría la necrosis del tejido. Una tercera aplicación sería la inhibición terapéutica de la angiogénesis (Folkman, 1995) principalmente como terapia antitumoral y en enfermedades no neoplásicas tales

como: artritis reumatoídea, psoriasis, retinopatía diabética y otras enfermedades inflamatorias crónicas por excesiva neovascularización.

La angiogénesis se debe diferenciar de la **vasculogénesis** que es la formación de vasos en el embrión a partir del tejido mesodérmico alrededor de la tercera semana de gestación, gracias a la secreción de sustancias inductoras por el endoderma subyacente, que hace que células del mesoderma se diferencien en angioblastos, luego en células endoteliales planas y finalmente en vasos sanguíneos. Este conjunto primitivo de vasos luego se expande a través de yemación (angiogénesis) o intususcepción, en donde columnas de tejido intersticial se insertan en el lumen de vasos preexistentes, dividiendo este en dos (Patan *et al*, 1996).

Los vasos tumorales también se desarrollan a través de yemación y/o intususcepción de vasos preexistentes. Precusores endoteliales circulantes, liberados de paredes vasculares o movilizados desde la médula ósea contribuyen con la angiogénesis tumoral (Asahara *et al*, 2000; Rafii, 2000). Las células tumorales pueden, además, crecer alrededor de un vaso, formando un manguito perivascular.

Los vasos neoformados en tumores muestran notables alteraciones morfológicas y funcionales (Johnson *et al*, 1998). Los vasos son tortuosos, de calibre aumentado e irregular, presentando un exceso de ramificaciones y de conexiones intervasculares. Esto se puede deber a un desbalance de reguladores angiogénicos, tales como VEGF y angiopoyetinas. Como consecuencia, el flujo sanguíneo está alterado, lo que da lugar a regiones hipóxicas y zonas del tumor con marcada disminución del pH (Ferman *et al*, 1998). La presencia de vasculatura alterada, junto con la relativa ausencia de vasos linfáticos intratumorales, causa un aumento de presión intersticial en el tumor, que puede llevar a compresión vascular y necrosis central. Estas condiciones bajan la

efectividad de tratamientos como quimioterapia y radioterapia, principalmente por la dificultad de entrega de las drogas anticancerígenas; modula la producción de factores angiogénicos y selecciona las células cancerígenas más malignas y metastásicas, debido a que la hipoxia lleva a la selección de células que han perdido la respuesta apoptótica frente a la disminución de oxígeno (Giaccia, 1996). Además, los vasos son anormalmente permeables, presentando en el endotelio fenestraciones, numerosas vesículas y agujeros transcelulares. Los espacios que separan las células endoteliales se encuentran marcadamente aumentados y la membrana basal es discontinua o inexistente. La luz de los vasos tumorales no siempre se encuentra delimitada por células endoteliales; en su lugar pueden encontrarse células tumorales o bien un mosaico de células endoteliales y tumorales. Esto se podría deber a invasión del lumen vascular por células tumorales o por apoptosis de células endoteliales, lo que llevaría a exposición de las células tumorales subyacentes. El contacto de las células tumorales con la sangre podría tener importantes implicaciones en relación con las metástasis. (Gasparino, 1977)

La mayoría de las muertes por cáncer se deben a la presencia de metástasis, donde el tratamiento convencional fallaría, debido a que la mayoría de los tumores son biológicamente heterogéneos y cuentan con diversas poblaciones celulares que tienen distintas propiedades, las cuales determinan una sensibilidad variable ante los agentes citostáticos y una distinta capacidad invasora y productora de metástasis. Algunas metástasis pueden ser originalmente clonales y otras pueden originarse de diferentes progenitores celulares debido a la heterogeneidad tumoral y pueden localizarse en ganglios linfáticos u otros órganos, protegidos del sistema inmune. El entorno biológico, es decir el órgano y la ubicación de la metástasis en el órgano, puede influenciar en el comportamiento de las células metastásica y su respuesta al tratamiento

anticancerígeno instruido. La patogenia de las metástasis cancerosas consiste en una serie de reacciones en cadena que incluye: crecimiento - invasión - circulación - sobrevivida - detención en órgano a distancia - extravasación y proliferación. Las vías de diseminación más frecuentes son la circulación linfática y la hematológica, que se encuentran interconectadas y funcionan paralelamente en la diseminación tumoral.

A través de múltiples investigaciones se ha logrado establecer que el crecimiento tumoral y la formación de metástasis es dependiente de la angiogénesis y que la mayoría de los tumores humanos persistiría “*in situ*” por períodos largos de tiempo (meses a años) en un estado silente, avascular, conteniendo millones de células. Al cambiar un subgrupo de células del tumor al fenotipo angiogénico, se alteraría el equilibrio local entre factores pro y antiangiogénicos, con lo cual el tumor comenzaría a crecer rápidamente y se haría clínicamente detectable. Señales que activarían la angiogénesis en el tumor son: cambios genéticos, tales como activación de oncogenes o delección de genes supresores del crecimiento tumoral (Kerbel, 2000, Carmeliet, 1999), que controlan la producción de reguladores de la angiogénesis, cambios microambientales tisulares, tales como: estrés metabólico (hipoxia, hipoglicemia, disminución de pH), estrés mecánico (presión ejercida por proliferación celular) y respuesta inflamatoria. El mecanismo por el cual los cambios genéticos y microambientales tisulares producirían este cambio fenotípico del tumor, produciendo angiogénesis y crecimiento tumoral, son complejos y aún no totalmente comprendidos.

Actualmente, las investigaciones sobre angiogénesis están dirigidas, principalmente, a cuatro objetivos:

1. Cuantificación de la neovascularización en biopsias tumorales con finalidad diagnóstica y de pronóstico. La angiogénesis es un factor

predictor del pronóstico en muchas neoplasias humanas y tanto es así, que se considera existe una correlación importante, entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos, con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente, grado de malignidad tumoral (Johson *et al*, 1998).

2. Determinación del origen o procedencia de las células que van a formar los vasos que irrigarán al tumor. Investigadores del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center y del Weil Medical College of Cornell University, a través del uso de anticuerpos monoclonales, han determinado que la angiogénesis tumoral se produciría en parte por células troncales provenientes de la médula ósea, que serían movilizadas, reclutadas y luego por acción del VEGF transformadas en células precursoras endoteliales y posteriormente en vasos sanguíneos.
3. Identificación de reguladores positivos y negativos de la angiogénesis (pro y antiangiogénicos) y la caracterización de sus mecanismos de acción. Hasta el momento, se han logrado identificar 12 proteínas que actuarían como reguladores de la angiogénesis, serían producidas, tanto por el tumor, como por células inflamatorias que se habrían infiltrado en el tejido neoplásico, endotelios, células del estroma, células sanguíneas o de la matriz extracelular (Fukumura *et al*, 1998). Su contribución relativa varía según el tipo y tamaño del tumor, y probablemente también cambie a medida que crece el tumor, regresa o recidiva la enfermedad. La mayoría de estas estarían almacenadas en la matriz extracelular en forma bioactiva y actuarían desde la circulación o en la matriz extracelular. Los receptores de estos factores se ha demostrado que se encuentran en la superficie de las células endoteliales, pero el mecanismo por el cual la señal de transducción produciría la inducción del fenotipo angiogénico aún no está

dilucidado. Se cree que se asociaría a sobre expresión intracelular de uno o más reguladores positivos de la angiogénesis, movilización de proteínas angiogénicas de la matriz extracelular (producidas por macrófagos) o combinación de los dos procesos anteriores, que llevarían a proliferación celular o quimiotaxis (Sánchez, 1999). El reto actual es establecer la secuencia temporal y magnitud en que se generan estas moléculas, (Ramanujan *et al*, 2000) ya que esto podría ser útil para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas.

La expresión temporal y espacial de estos reguladores en el tumor, no están tan bien coordinados como en los procesos fisiológicos de angiogénesis y sus mecanismos de acción son poco conocidos. Además, los vasos tumorales carecen de mecanismos protectivos que los vasos normales adquieren durante el crecimiento. Por ejemplo, les falta células perivasculares activas, que son necesarias para proteger al vaso de cambios en el balance de oxígeno u hormonal, además de proveerles de control vasoactivo necesario para acomodarse a los cambios metabólicos e inducir inactividad vascular (Benjamin *et al*, 1999).

Los reguladores más comúnmente identificados en tumores son:

- **Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF):** es considerado el factor angiogénico más importante. Su actividad angiogénica está finamente regulada por genes (Carmeliet, 1999; Carmeliet *et al*, 1996) y presenta al menos 4 isoformas resultantes del “splicing” del ARN_m transcrito primario. Estas isoformas se denominan VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, según el número de aminoácidos que posee la proteína (Ferrara, 1995; Thomas, 1996). Generalmente, actúa en forma coordinada con otros factores como el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, regulando la permeabilidad vascular. Se expresa,

abundantemente, en tumores de origen epitelial y asociado a estados clínicos de isquemia. En los tejidos neoplásicos, su síntesis es promovida por las propias células tumorales (Gerwins *et al*, 2000).

➤ **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF):** Existen 2 variedades: ácidas y básicas, ambas pueden, por estimulación paracrina, incrementar la síntesis de factores angiogénicos por los macrófagos del tejido conectivo o estimular la proliferación de las células endoteliales. El FGF, al igual que otros factores de crecimiento tumoral, al aumentar el índice de actividad mitótica, facilitan la proliferación, migración y diferenciación de las células tumorales y endoteliales vasculares en las áreas más vascularizadas del tumor (Senger, 1996).

➤ **Factor de crecimiento y transformación β (TGF β):** Este factor de crecimiento inhibe la proliferación de los endoteliositos “*in vitro*”, pero una inyección focal “*in vivo*” estimula la angiogénesis (Finkenzeller *et al*, 1992).

➤ **Factor de crecimiento placentario (PGF):** Las células neoplásicas pueden sintetizar en forma alternativa un PGF identificado como tipo 2, este posee un mayor número de aminoácidos básicos que la secuencia del factor clásico. Compete por los sitios de unión de FGF y VEGF. Hace que las formas difusibles activas permanezcan mayor tiempo en los tejidos e incrementen su efecto angiogénico. Esto sugiere un mecanismo por el cual las isoformas de factores de crecimiento sintetizadas por las células neoplásicas aumentan la angiogénesis, para favorecer el crecimiento y la progresión tumoral (Finkenzeller *et al*, 1992).

4. Identificación de inhibidores naturales y/o sintéticos de la angiogénesis.

Las terapias antiangiogénicas están dirigidas a:

- 1) Bloquear la unión del factor angiogénico con su ligando o receptor. El problema de bloquear únicamente una molécula angiogénica, es que el tumor puede producir un cambio y así dejarse estimular, mayormente, por las otras moléculas angiogénicas (Auerbach W. y Auerbach R., 1994).
- 2) “Feedback” positivo o mayor llegada de inhibidores de la angiogénesis endógenos, evitando provocar esto en tejidos sanos (Auerbach W. y Auerbach R, 1994).
- 3) Atacar, directamente, la vasculatura tumoral, por inhibición de la migración celular al atacar proteasas que permiten liberar las células endoteliales de la matriz extracelular, inhibición de la proliferación y formación de tubos vasculares (Folkman, 1995).

Actualmente, se conoce una gran variedad de fármacos de uso rutinario que tendrían efecto antiangiogénico, tales como antibióticos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Una droga bastante estudiada es la betametasona, un glucocorticoide, de potente acción antiinflamatoria e inmunosupresora, que tendría acción angiostática por afectar la migración de células endoteliales en procesos de angiogénesis inflamatoria y tumoral. Se describen tres mecanismos de acción: genómico, no genómico mediado por receptor y no genómico de tipo fisicoquímico, por el cual se inhibiría la transcripción de la fosfolipasa A2, con lo cual disminuiría la producción de ácido araquidónico, sustrato de las ciclooxigenasa y lipooxigenasa, impidiendo así la formación de Prostaglandinas y Leucotrienos. Además, tendría propiedades proapoptóticas sobre las células endoteliales en mayor dosis. (Lemus *et al*, 2001 ; Illanes *et al*, 2002 ; Strauss *et al* 2002 ; Zúñiga *et al* 2003)

Uno de los grandes problemas planteados respecto a los estudios en angiogénesis es que los modelos experimentales más ampliamente utilizados, tales como membrana alanto-coriónica de pollo embrionado, implante subcutáneo de esponja en ratón AJ y “Corneal Pocket”, es que no serían equivalentes al medio real de desarrollo de un tumor sólido (intra parenquimatoso), dadas las alteraciones de la farmacocinética y la respuesta del huésped en estos modelos. Esto nos llevó a analizar un modelo en que el tumor sea implantado en una zona de tejido profundo (como el músculo, que además nos permite evaluar el tamaño tumoral), para así aproximarnos mejor a la realidad de la interacción tumor-huésped.

El efecto de los factores antiangiogénicos en las terapias contra el cáncer está relativamente claro, pero aún queda mucho por dilucidar para que el tratamiento antiangiogénico, además de ser efectivo, sea seguro para la salud del paciente tratado y, definitivamente, van a tener que pasar aún varios años de arduas investigaciones antes de que el cáncer sea una enfermedad de fácil tratamiento y baja mortalidad.

3. Hipótesis

La proliferación vascular en ratones portadores de tumor TA₃, es significativamente superior, en comparación con ratones clínicamente sanos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General:

Determinar que la proliferación vascular aumenta en órganos blancos de metástasis, en ratones portadores de cáncer TA₃MTX-R.

4.2 Objetivos Específicos:

- a.- Identificar los órganos blancos preferenciales del tumor para formar metástasis.
- b.- Describir mediante técnicas inmunohistoquímicas, la proliferación de células endoteliales en ratones portadores del tumor.
- c.- Comparar la proliferación de células endoteliales de ratones portadores del tumor y ratones clínicamente sanos.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales:

- **5.1.1 Biológicos:** Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembras, clínicamente sanos, de la cepa AJ, de 25 gr. de peso y dos meses de edad. Los ratones fueron mantenidos en jaulas a temperatura controlada de 25 °C a 26 °C, alimentados con pellet comercial para ratones y agua ad libitum.
- **5.1.2 Línea tumoral:** Se utilizaron células de la sublínea tumoral TA₃-MTX-R, caracterizadas por tener crecimiento ascítico, resistentes a metotrexato, vinblastina, fluoracilo y cisplatino entre otros; originada de la línea tumoral TA₃, proveniente de un carcinoma mamario de ratón, la cual fue proporcionada por el bioterio central del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5.2 Métodos:

Se utilizaron dos grupos, cada uno constituido por 8 ratones:

- **Grupo A (Grupo control):** Cada ratón fue inoculado por vía intramuscular con suero fisiológico en día 1.
- **Grupo B (Grupo experimental):** Cada ratón fue inoculado por vía intramuscular con células tumorales TA₃MTX-R en día 1.

Se mantuvieron ambas jaulas de ratones en el bioterio de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, en iguales condiciones de temperatura, humedad relativa, alimento y disponibilidad de agua, durante todo el período experimental.

5.2.1 Obtención de células tumorales (CT):

Las células tumorales se obtuvieron del líquido ascítico de un ratón portador de tumor TA₃ intraperitoneal, sacrificado por dislocación cervical, previa medicación anestésica con 25 µg/animal de diazepam y 2,5 mg/Kg de ketamina. Con jeringa tuberculina se le extrajo 0,3 ml de líquido ascítico de la cavidad peritoneal, el cual se diluyó en 5 ml de suero fisiológico (una ampolla).

Del volumen total se extrajo 0,8 ml para inocular a cada ratón del grupo experimental (B) 0,1 ml por vía intramuscular en el miembro posterior izquierdo.

Se realizó recuento de células tumorales en cámara de Neubauer y evaluación del porcentaje de células vivas con tinción vital Azul Trypan y observación al microscopio óptico. Se diferenció células tumorales de otras células, por características morfológicas. Se obtuvo un recuento promedio de 9.000.000 de células por ml, por lo tanto, a cada ratón se le inocularon aproximadamente 900.000 células.

Recuento de células tumorales promedio por celdilla de la cámara = 36

Número de celdillas de la cámara = 25 (5 x 5)

$$36 \times 25 \times 10.000 = 9.000.000 \text{ células por ml}$$

Al grupo control (A) se le aplicó suero fisiológico.

5.2.2 Crecimiento del tumor primario:

Se realizó cada 4 días una medición del diámetro longitudinal (dorso-ventral) y transversal (latero-medial) del tumor primario, a través de un compás micrométrico y usando la fórmula de O'Reilly se calculó el volumen.

$$\text{Volumen} = \text{ancho}^2 \times \text{largo} \times 0,52$$

La medición de los diámetros del tumor fue realizada en mm y para efecto de cálculo se expresó en volumen (cm³).

5.2.3 Sacrificio de animales:

El día 28, cuando los animales experimentales presentaron signos claros de agonía (deshidratación marcada, anorexia, dificultad para moverse y menor reactividad al medio) se inyectó a todos los ratones 0,25ml de bromodeoxiuridina (BrdU) por vía intraperitoneal. Dos horas después, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical previa medicación anestésica con ketamina y diazepam.

5.2.4 Necropsia de los animales sacrificados:

Se le realizó a cada animal una necropsia individual, donde se visualizó los órganos, tejidos y líquidos circundantes. Primero se revisó la cavidad peritoneal, para ver si había presencia de líquidos, luego los órganos de la cavidad abdominal y torácica.

Ya que la mayoría de las metástasis no eran visibles con lupa, se extrajo tejidos y órganos que presentaban alguna lesión secundaria, ya sea aumento de volumen, zonas isquémicas, lesiones petequiales o aumento de irrigación de la zona.

Los órganos de cada animal se procesaron en forma independiente y fueron fijados en formalina al 10%. Posteriormente, se realizó con microbisturí el aislamiento de las metástasis.

5.2.5 Preparación de cortes histológicos:

Los tejidos fueron procesados mediante las técnicas tradicionales para realizar los cortes. (Anexo 10.1)

Se realizaron cortes seriados de toda la muestra y fueron montados semiseriadamente, 1 cada 10 μ , en un portaobjeto. Se desparafinaron estos cortes a través de un baño en xilol y alcoholes descendentes, hasta llegar al agua, para proceder a la tinción con hematoxilina y eosina. Luego se eligió la zona más representativa, de la cual se obtuvo los 4 cortes histológicos sucesivos que fueron sometidos a las siguientes técnicas:

1) **Tinción con Hematoxilina - Eosina:** Para este fin se utilizó el primer corte de los seleccionados y su objetivo fue el recuento de vasos sanguíneos en las metástasis. Para esto, se contó los vasos sanguíneos observados en un campo microscópico determinado ($22.500 \mu\text{m}^2$ o $0,02\text{mm}^2$) usando un lente reticulado y aumento 40X en un microscopio óptico. El recuento se realizó en el corte de cada órgano, en los 8 animales de cada grupo y en 100 campos de observación.

$$(1 \times 8 \times 100 = 800 \text{ campos})$$

Las cifras obtenidas de los 800 campos permitió determinar los vasos sanguíneos de cada órgano metastatizado, y de cada grupo animal para realizar, posteriormente, los estudios estadísticos correspondientes.

2) **Inmunohistoquímica:**

2.1. Tinción con BrdU: La BrdU es un análogo de la timidina, que se incorpora al DNA de células en replicación (fase S del ciclo celular), por lo cual actuaría como un reactivo radioactivo, pero menos nocivo para el operador. La detección de las células marcadas con BrdU, se realizó mediante su unión con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU y revelado por un sistema de streptavidina-biotina, altamente sensible.

Su determinación se realizó en base a la tinción café oscura de los núcleos de las células que se presentaban en fase S del ciclo celular, independiente del tipo celular que se trataba. Este sistema es altamente específico, por lo cual presenta baja proporción de reacciones falsa positivas. (Anexo 10.1.1)

2.2. Técnica de los anticuerpos anti-CD 31: La reacción inmunohistoquímica anti-CD 31, detecta células endoteliales, ya que CD31 es una glicoproteína que es expresada específicamente por este tipo celular. Al usar anticuerpos anti-CD31 se puede determinar el número de células endoteliales y de esta manera estimar la densidad vascular y el número de vasos sanguíneos presentes en la muestra.

Su determinación se realizó en base a la tinción roja de las células endoteliales. (Anexo 10.1.2)

Esta técnica, en relación con la anterior, permite identificar las células endoteliales bromodeoxiuridina positivas, es decir, las células endoteliales que se encuentran en mitosis; y por lo tanto, determinar el grado de angiogénesis tumoral.

3) **PAS:**

Esta técnica se caracteriza por teñir componentes de la membrana basal, específicamente glicosaminoglicanos, lo que favorece la visualización de vasos sanguíneos. (Anexo 10.1.3)

5.2.6 Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos permitieron realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados y un análisis de varianza jerarquizado (o anidado “ANOVA”), ya que se obtuvieron múltiples resultados de un mismo animal. El programa computacional utilizado fue el SAS (Statistical Analysis System)

proporcionado por la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

6. Resultados y Discusión

6.1 Descripción del desarrollo de tumor TA₃MTX-R inoculado por vía intramuscular en ratones

Hasta los cuatro días de inoculado el tumor, los ratones presentaron un aumento de volumen muy leve, no determinable a simple vista, con calor en el muslo, interpretable como un proceso de inflamación local. Los ratones del grupo control también presentaron cierto grado de inflamación, atribuible a la punción, pero que desapareció, aproximadamente, al tercer día. Al cuarto día, el crecimiento tumoral empezó a ser registrable, obteniéndose así los resultados expresados en la tabla I y el gráfico de la figura 1.

Tabla I: CRECIMIENTO TUMORAL EN EL TIEMPO, EXPRESADO COMO VOLUMEN PROMEDIO

A			B		
N	T	VP	N	T	VP
8	4	0,39	8	4	0,43
8	8	0,39	8	8	1,26
8	12	0,39	8	12	1,91
8	16	0,39	8	16	2,54
8	20	0,39	8	20	2,54
8	24	0,39	8	24	5,23
8	28	0,39	8	28	6,55

A: Grupo Control

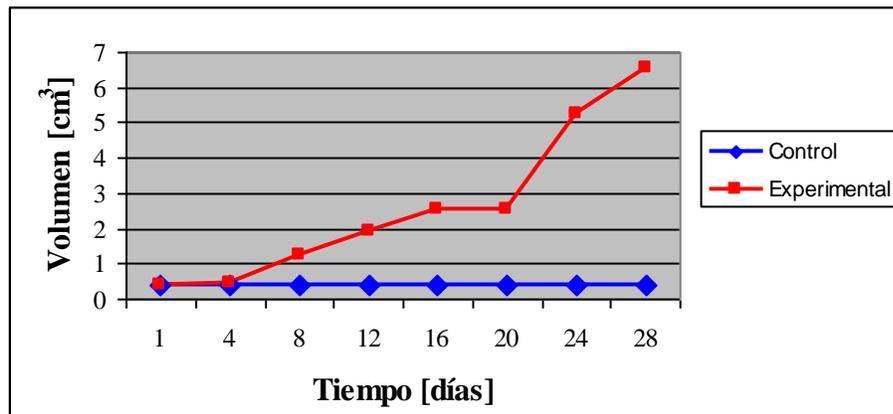
B: Grupo Experimental

T: Tiempo expresado en días

VP: Volumen Promedio expresado en cm³

N: Número de muestras obtenidas por grupo

Figura 1: Gráfico que muestra el crecimiento tumoral en el tiempo.



A: Grupo Control

B: Grupo Experimental

Hasta los 16 días hubo un crecimiento lineal del tumor (figura 1), visible a simple vista y con franca desmejoría del animal. Se presentaron signos de deshidratación leve, hirsutismo, cojera y disminución leve del consumo de alimento.

A la tercera semana hubo una disminución de la tasa de crecimiento del tumor, que podría explicarse por un efecto de mayor proliferación de células tumorales, que vasos neoformados, por lo cual, probablemente, las células tumorales más distantes de los vasos sanguíneos sufrieron muerte celular por isquemia y anoxia y no fueron capaces de replicarse. La última semana se recuperó la tasa de crecimiento tumoral, posiblemente, porque los factores angiogénicos liberados, tanto por el tumor como por células inflamatorias y endoteliales, lograron estimular la formación de vasos, para nutrir y oxigenar el tumor, adquiriéndose así una curva de crecimiento exponencial. Esto coincide con lo observado por Gullino (1978) en el crecimiento tumoral de un carcinoma mamario implantado en ratón, quien informó que células de tejido canceroso adquirirían capacidad angiogénica para crecer e invadir otros órganos.

Al momento del sacrificio (28 días post inoculación), los animales presentaron compromiso del estado general, deshidratación marcada, hirsutismo y alopecia progresiva, anorexia, dificultad para moverse debido al aumento de volumen e inflamación de la extremidad posterior derecha, cojera con necrosis y hemorragia digital distal de la misma, además de menor reactividad a estímulos externos; por lo tanto signos claros de agonía.

El ratón número 3 del grupo A presentó un crecimiento leve inicial, que comenzó a disminuir a las dos semanas, volviendo al tamaño inicial en la última semana del experimento. Además no presentó signos de desmejoramiento de la salud, ni de agonía al momento del sacrificio. Este efecto podría explicarse de dos maneras:

1.- Error en la inoculación, ya sea porque no se inoculó las células intramuscularmente o no se inocularon en número suficiente para producir un crecimiento tumoral. En este caso, el aumento de volumen inicial se explicaría, por un efecto inflamatorio local producto de la punción, similar a lo que ocurrió en los animales del grupo control; sin embargo no se encontró bibliografía al respecto.

2.- Respuesta individual: existen individuos, que a través de una reacción inmune de alta magnitud, son capaces de eliminar las células tumorales o bloquear su crecimiento porque el sistema inmune detecta que son células anormales. Esto coincidiría con lo observado por Boon *et al* (1994), quienes informaron que algunos tumores poseían moléculas diferentes de las células normales, tales como productos de oncogenes mutados y proteínas, los que podrían ser presentados al sistema inmune, el cual desarrollaría una reacción inmunológica, que en algunos casos sería capaz de erradicar un tumor, incluso antes de generar signos clínicos.

Los ratones del grupo control no sufrieron cambios en los 28 días, el consumo alimenticio y de agua se mantuvo igual y no presentaron cambios en la actividad.

6.2 Diagnóstico anatomopatológico de metástasis en la necropsia de los ratones

Se extrajeron los órganos que presentaron metástasis (figura 2) y aquellos que presentaron alguna lesión secundaria, ya sea aumento de volumen, zonas isquémicas, lesiones petequiales o aumento de irrigación de la zona, signos asociables con invasión tumoral.



Figura 2: Fotografía con lupa de los órganos torácicos de un preparado de ratón, que presentó metástasis

Los órganos y tejidos extraídos para estudiar histológicamente fueron: bazo, linfonodos, pulmón, corazón, y músculo con tumor primario (Ver Tabla II).

Se obtuvo una muestra de intestino de cada animal, ya que este órgano es útil como control de la técnica inmunohistoquímica de BrdU, porque siempre presenta gran número de células en división.

Tabla II: NÚMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS EN CADA GRUPO ANIMAL Y DIVIDIDA SEGÚN ÓRGANO Ó TEJIDO

Muestras	A	B	N
Músculo	2	8	10
Linfonodo	0	11	11
Pulmón	2	8	10
Corazón	2	8	10
Bazo	2	2	4
Intestino	2	8	10

A: Grupo Control

B: Grupo Experimental

N: Número total de muestras obtenidas

6.3 Presencia de células tumorales en cortes histológicos

Se examinó cada uno de los cortes histológicos en busca de células tumorales a través de un microscopio óptico con lente de inmersión.

Se determinó, que las células tumorales de las metástasis eran de características morfológicas muy similares a las células del tumor primario.

Las células tumorales se diferenciaron por poseer características como:

- Células grandes de forma irregular
- Núcleo también es de forma irregular y de gran tamaño en relación al tamaño celular total (hasta 1:1 relación núcleo:citoplasma)
- Nucleolo prominente
- Células vacuoladas o de citoplasma irregular
- Crecimiento desorganizado, sin inhibición por contacto con células vecinas o células desprendidas entre sí y de la membrana basal
- Figuras mitóticas atípicas

Las metástasis se reconocieron en los cortes histológicos por presentar células anormales, tumorales, como las células constituyentes del tumor primario, además de la pérdida de la estructura y organización típica del órgano. Otra característica encontrada fue la presencia de un gran número de vasos sanguíneos en la periferia de este tumor secundario, formación en algunos órganos de trabéculas de tejido conectivo rodeando los nódulos de células tumorales y gran número de células inflamatorias. Estas observaciones coinciden con las obtenidas por Folkman el año 1995 (Folkman, 1995)

Como se observa, en la tabla III y en el gráfico de la figura 3, los órganos preferenciales del tumor TA₃MTX-R, inoculado por vía intramuscular, para formar metástasis fueron: pulmón, nodos linfáticos y corazón.

Tabla III: NÚMERO DE MUESTRAS QUE PRESENTARON CÉLULAS TUMORALES

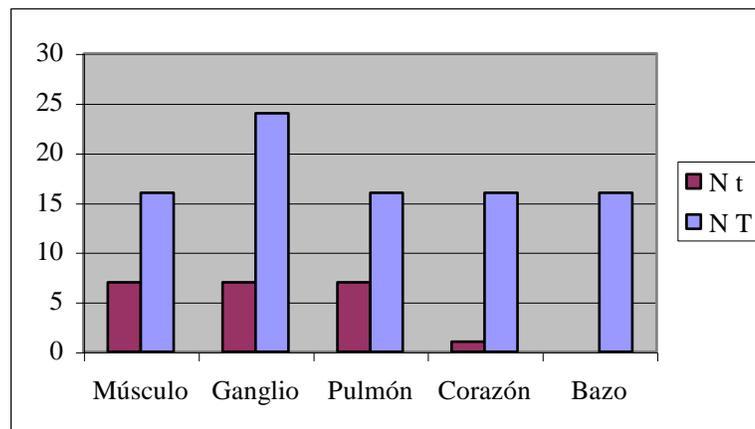
Muestras	N t	N T	P
Músculo	7	16	43,75%
Linfonodo	7	24	29,17%
Pulmón	7	16	43,75%
Corazón	1	16	6,25%
Bazo	0	16	0%

Nt: Número de muestras que presentaron células tumorales

NT: Número total de muestras obtenidas por órgano

P: Porcentaje

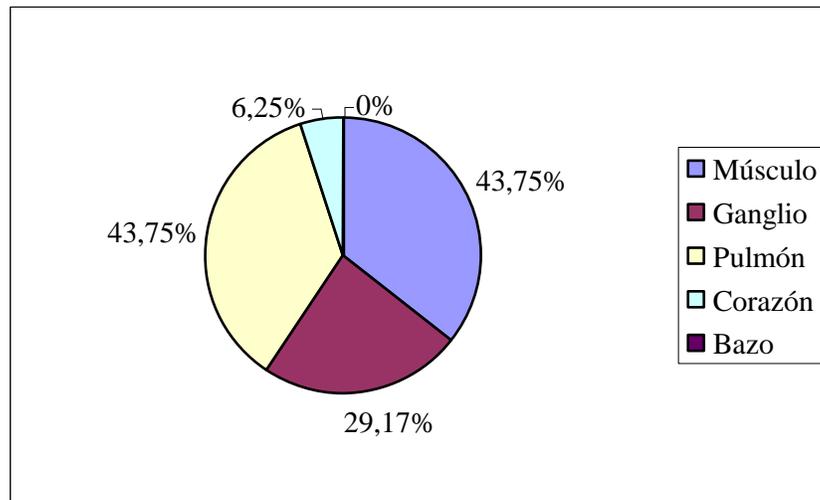
Figura 3: Gráfico que indica el número de muestras con células tumorales, en los órganos y tejidos estudiados.



Nt: Número de muestras que presentaron células tumorales

NT: Número total de muestras obtenidas por órgano

Figura 4: Representación gráfica de los porcentajes de muestras de los diferentes órganos y tejidos que presentaron células tumorales.



Como se puede observar en el gráfico representado en la figura 4, los órganos y tejidos que más frecuentemente presentaron células neoplásicas fueron el músculo, el pulmón y nodos linfáticos. Esto se debe a que el músculo es el lugar donde se inoculó el tumor; por lo tanto estas células neoplásicas corresponden a multiplicación de células tumorales primarias. El tumor primario se visualizó muy aumentado de volumen, con gran cantidad de tejido necrótico, vasos sanguíneos circundantes aumentados y linfadenopatía local.

El pulmón se encontró afectado por células neoplásicas en igual frecuencia (43,75%) que el músculo, pero estas células neoplásicas corresponderían a células tumorales secundarias. Es decir, son células que diseminaron desde el tumor primario para detenerse en órganos e invadirlos. Lo más probable, es que la diseminación al pulmón haya sido por vía hematogena, a diferencia de los linfonodos donde ocurre generalmente por vía linfática. Esto fue descrito por

Sugarbaker (1981), quien describió los principales lugares a los que metastatizaban neoplasias tiroideas, mamarias, gastrointestinales, cutáneas y otras en humanos.

El nodo linfático más comprometido fue el más cercano al tumor primario, es decir, el linfonodo regional y luego el paraaórtico. El resto de los linfonodos se veían menos comprometidos. El nodo linfático es un órgano que se presenta generalmente afectado, ya sea por invasión local del tumor primario o por metástasis. La razón de esto se debe a que la primera barrera de diseminación tumoral son los nodos linfáticos, que pueden contener las células tumorales e incluso destruir parte de ellas (Robbins *et al*, 2000). Una vez que se supera esta barrera, la diseminación por vía linfática y sanguínea se haría inminente.

Como se observa en la figura 4, el corazón se encontró sólo en pocas muestras invadido (6,25%) y no se halló células tumorales en el bazo.

La razón de esta disposición de metástasis en los diferentes órganos se podría deber a una interacción entre el tipo de célula tumoral y la afinidad individual del tumor por un órgano (Sugarbaker, 1981). Se ha postulado, que esto también estaría influenciado por un fenómeno hemodinámico, que tendría relación con el número de células tumorales que difundirían por vía sanguínea, la cantidad de irrigación que posee un órgano y el número de células tumorales que quedarían arrestadas en los capilares de ese órgano. En general, las células tumorales tienden a invadir los primeros órganos que atraviesan a través de la circulación sanguínea, posterior a su liberación del tumor primario. Por otro lado, estas células sólo serían capaces de crecer y sobrevivir si el órgano les provee un ambiente favorable para este fin (Sugarbaker, 1981).

La mayoría de los tumores cuya irrigación sanguínea drena a las venas sistémicas, tienden a metastatizar primero en el pulmón, en cambio, tumores

cuyas venas drenan en el sistema porta (cánceres gastrointestinales), lo realizarán al hígado (Weiss, 1990). Sólo pocas células tumorales son capaces de alcanzar la circulación arterial, desde donde serán distribuidas al resto del cuerpo.

Estudios realizados en animales han demostrado, que a pesar que muchas células tumorales viables pasan a la circulación, sólo unas pocas son capaces de generar metástasis (Tarin *et al*, 1984).

El diseño experimental utilizado, en esta memoria de título, se consideró que fue exitoso, ya que se produjeron numerosas metástasis, probablemente, debido al efecto invasivo propio del tumor TA₃MTX-R, obtenido por la selección de células más invasivas, a través de la manipulación por varios años de este tumor y a factores individuales de los ratones utilizados, como son: stress por el cautiverio, cepa utilizada, la manipulación e inyección de las células tumorales, que podrían haber afectado la respuesta inmune natural del animal.

Para el diseño del modelo experimental utilizado en este trabajo, fueron considerados los comentarios realizados por Folkman (1995) y Griffioen y Molena (2000) con relación a los problemas presentados por los modelos anteriormente utilizados en el estudio de la angiogénesis y desarrollo de nuevas terapias. Dichos modelos (membrana alantocoriónica de pollo, esponja de poliuretano en lomo de ratón, implante subcutáneo de tumor y “corneal pocket”, principalmente) no reflejarían el medio ambiente real en que se desarrollan los tumores en el individuo enfermo. La interfase tumor-huésped es un elemento de suma importancia en la biología del cáncer, tanto por las características del tejido (conectivo en el caso del implante subcutáneo o epitelial en los otros modelos), como por su irrigación. Es por ello, que el modelo usado en este estudio presenta dos ventajas comparativas importantes: la primera es que el implante intramuscular profundo aporta al tumor un ambiente de tejido parenquimatoso bien irrigado similar a la ubicación de un tumor espontáneo en un órgano y, la

segunda, es que permite evaluar el desarrollo tumoral, midiendo, directamente, su tamaño en el tiempo. Otro punto importante en este sentido, es la utilización de los tejidos metastizados para la evaluación de la angiogénesis tumoral.

6.3.1 Descripción de lo observado en cada órgano y tejido:

Se observó cada corte teñido con Hematoxilina-Eosina en el microscopio óptico con lente de inmersión y se corroboró lo observado con los cortes teñidos con la técnica de PAS. La técnica de PAS tiñe de color fucsia los glicosaminoglicanos de las membranas basales, con lo cual es más fácil observar la presencia de vasos sanguíneos.

1. Músculo estriado esquelético: como se observa en la figura 5, el tejido muscular se presentó muy desorganizado y casi no se reconocieron fibras musculares. Se observó gran cantidad de células tumorales de características vacuoladas, de irregular tamaño y forma. El núcleo era de gran tamaño y poseía un nucleolo prominente. Se evidenció la presencia de crecimiento superpuesto de células tumorales, lo que indicó que no había inhibición por contacto, característica clásica del crecimiento tumoral previo a la diseminación (Robbins *et al*, 2000). Se reconocieron algunas células tumorales en mitosis por disposición de la cromatina en el núcleo, observándose figuras mitóticas atípicas. Algunas células se tiñeron más que otras y se observaron trabéculas de tejido conectivo, que podrían corresponder al estroma de sostén del tumor. Se observó gran número de capilares y vasos sanguíneos, que invadieron el tejido desde el exterior; además, una gran proporción de células inflamatorias. En la periferia se

reconoció tejido necrótico, células vacuoladas y células con presencia de cuerpos apoptóticos, por lo tanto, células en proceso de muerte celular programada.

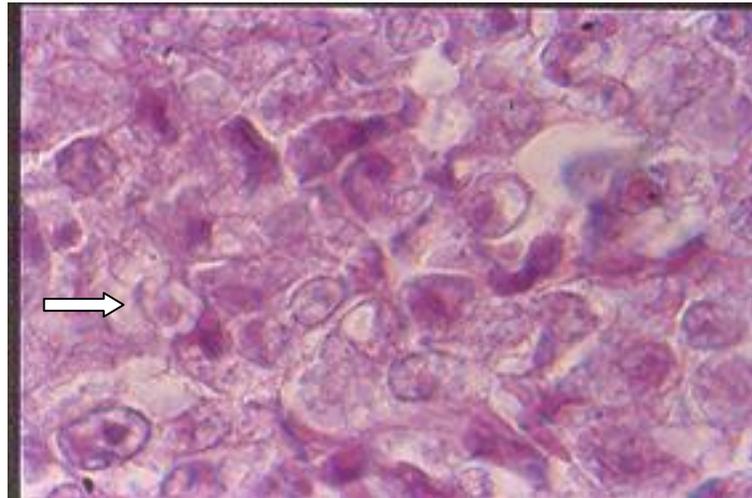


Figura 5: Imagen de células tumorales (CT) presentes en tejido muscular. La flecha indica una CT con nucleolo prominente y pérdida de la inhibición por contacto. (Tinción H-E, aumento 40X)

2. Nodo linfático: este órgano perdió su estructura histológica típica de corteza, paracorteza y médula, impidiendo la posibilidad de diferenciar las diferentes partes de éste. La cápsula se mantuvo intacta en algunos nodos, en otros se observó la invasión por el tumor cercano (figura 6). Como se aprecia en la figura 7, las células tumorales eran de iguales características que las del tumor primario (vacuolas, núcleos grandes y nucleolos prominentes, gran cantidad de células en mitosis, trabéculas de tejido conectivo rodeando los nodos y abundante cantidad de capilares). En general, se observó poco tejido linfático normal, debido a la gran invasión

local. El nodo linfático paraaórtico del grupo experimental era, a observación macroscópica, de mayor tamaño que el del grupo control.

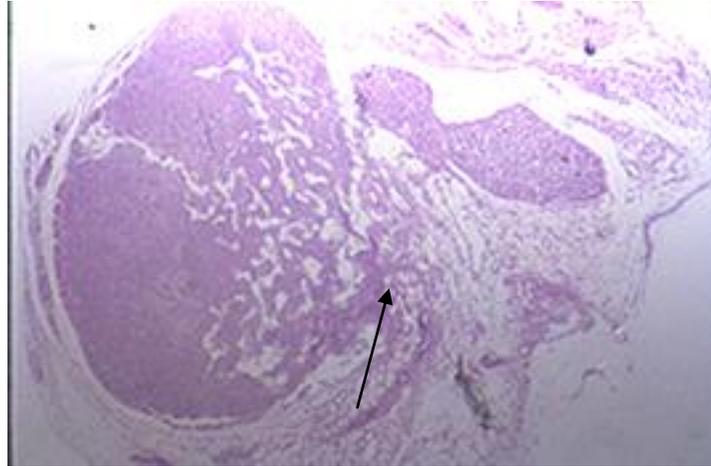


Figura 6: Invasión de linfonodo regional por tumor primario. La flecha indica la ruptura de la cápsula del nodo linfático provocada por la invasión tumoral. (Tinción H-E, 10X)

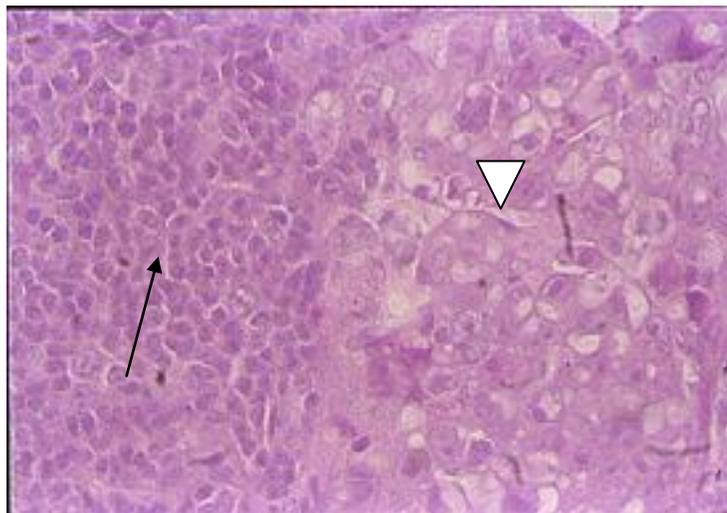


Figura 7: Imagen de tejido de linfonodo. La flecha indica células linfáticas normales y la punta de flecha indica células con características típicas tumorales. (Tinción H-E, 20X)

3. Pulmón: como se observa en la figura 8, habían algunas células tumorales, organizadas formando metástasis en este órgano. La mayoría de las CT se distribuyeron en la periferia del órgano. Se observó gran cantidad de células sanguíneas.

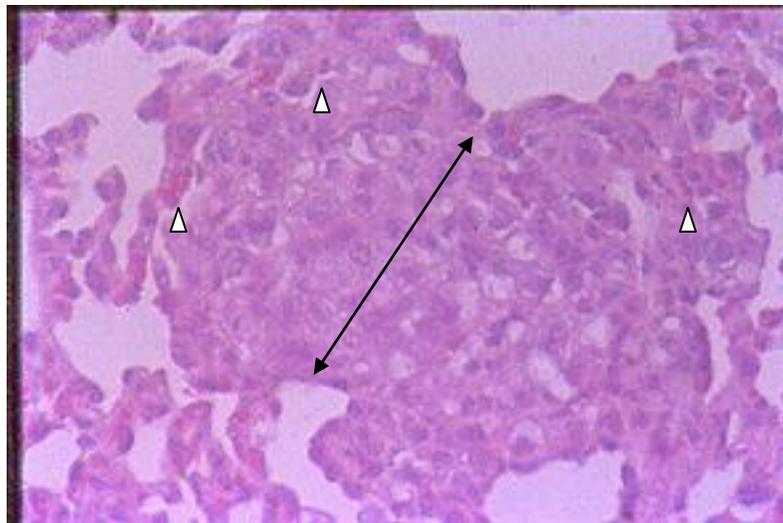


Figura 8: Imagen de tejido pulmonar. La flecha con dos puntas indica la metástasis. Las flechas blancas indican pequeños vasos sanguíneos que rodean al tumor secundario. (Tinción H-E, 40X)

4. Corazón: este órgano se presentó altamente irrigado. Los vasos coronarios se observaron con gran cantidad de células sanguíneas en su interior. Se evidenciaron algunas células tumorales de características vacuoladas y, también, gran cantidad de células inflamatorias, como se observa en la figura 9.

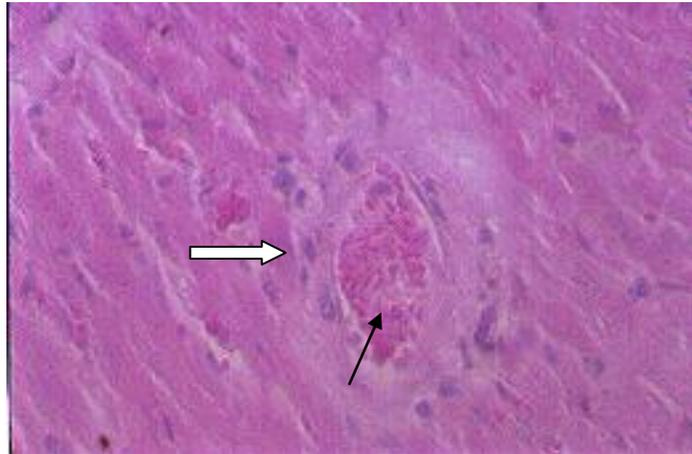


Figura 9: Imagen de miocardio. La flecha blanca indica un vaso coronario con gran cantidad de eritrocitos en su interior. (flecha negra) (Tinción H-E, 20X)

5. Bazo: mantuvo su organización normal y se observó gran cantidad de macrófagos y células sanguíneas. (Figura 10)

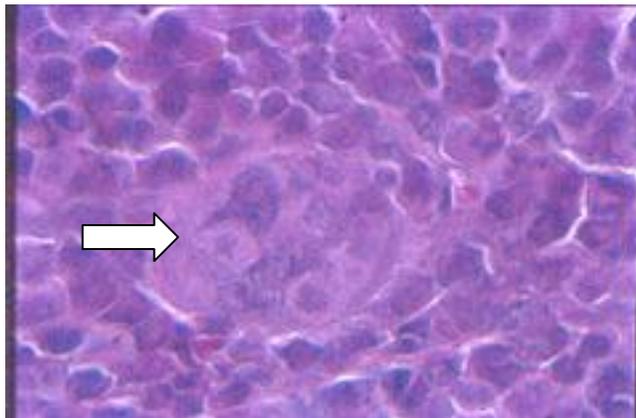


Figura 10: Imagen de bazo. La flecha blanca indica un macrófago teñido con H-E, 40X

6. Intestino: como se observa en la figura 11 los cortes obtenidos no presentaron células tumorales. El intestino mantuvo su estructura típica.

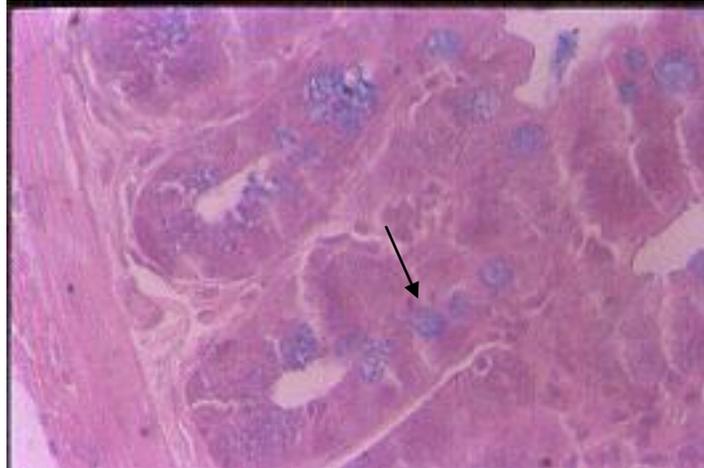


Figura 11: Corte histológico de intestino. La flecha negra indica las glándulas intestinales de Lieberkühn. (Tinción H-E, 20X)

6. 4 Inmunohistoquímica

6.4.1 Tinción con BrdU:

GRUPO EXPERIMENTAL:

Como se observa en la figura 12, se evidenció gran número de células con núcleo y nucleolos inmunomarcados, principalmente de origen tumoral. También se inmunomarcaron células endoteliales de algunos vasos, principalmente, capilares cercanos a metástasis. Se observaron focos de yemación de vasos con altas tasas de proliferación de células endoteliales. Al distanciarse de las zonas con CT se observó una disminución de las células inmunomarcadas y una disminución progresiva de vasos sanguíneos. En todos los órganos se pudo observar además, un reducido número de células normales inmunomarcadas, propias de los diferentes tejidos en división.

A través de la técnica inmunohistoquímica de BrdU se observó un gran número de células endoteliales inmunomarcadas, lo que estaría indicando que factores angiogénicos, tales como VEGF, FGF u otros, secretados tanto por el tumor como por células inflamatorias, serían capaces de sacar a las células endoteliales del estado G0, lo que correspondería con lo expresado por Folkman en sus primeros estudios sobre angiogénesis, quien observó que un tumor para crecer necesita vasos sanguíneos y para esto es necesario que las células endoteliales entren en replicación nuevamente (Folkman, 1976).

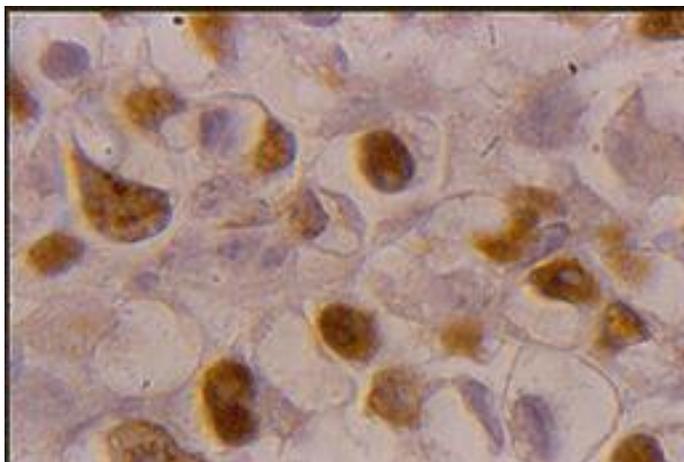


Figura 12: Imagen de tumor primario teñido con BrdU. Se observa gran cantidad de CT marcadas (tinción café). Aumento 40X.

GRUPO CONTROL:

En este grupo también se encontraron algunas células marcadas, pero en proporción, por campo de observación, bastante más reducida, que el grupo experimental. No se observaron células endoteliales en división.

6.4.2 Tinción con anti CD-31:

Luego de repetir múltiples veces esta técnica bajo diferentes condiciones y de concretar la falta de tinción incluso de los controles, pudimos llegar a la conclusión que el anticuerpo monoclonal primario de ratón anti CD31 no se estaba uniendo a sus respectivos receptores, por causas que desconocemos, ya que la fecha de vencimiento de este aún no se había cumplido. Debido al alto costo de estos kits inmunohistoquímicos, no se pudo obtener uno nuevo, por lo cual esta etapa del experimento fue reemplazada a través del uso de la técnica de PAS.

6.4.3 Tinción con PAS:

Esta técnica se realizó sólo en las placas histológicas sucesivas a las cuales se aplicó la técnica inmunohistoquímica de la Bromodeoxiuridina. Esta técnica facilitó la visualización de células endoteliales teñidas por la técnica de Bromodeoxiuridina, ya que tiñe las membranas basales de vasos sanguíneos.

6.5 Recuento de vasos sanguíneos:

Como se observa en la tabla IV, en el músculo estriado esquelético hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre la media del grupo control y la media del grupo experimental. El mayor efecto angiogénico se podría deber a que el músculo sufrió una injuria directa al momento de la inoculación, lo que podría haber provocado un reclutamiento de células inflamatorias, que podrían haber coadyudado a las células tumorales en la secreción de factores proangiogénicos.

En el pulmón, como se observa en la tabla IV, se obtuvo una diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre ambos grupos. Este órgano presentó el mayor número de vasos sanguíneos (figura 13), esto se podría deber, como lo afirmó Sugarbaker (1981), a que toda la sangre corporal circula por el pulmón y este al tener vasos muy finos, fácilmente células tumorales podrían quedar atrapadas ahí, generar angiogénesis y así formar metástasis. El pulmón de por sí es un órgano que posee gran cantidad de vasos sanguíneos necesarios para cumplir con su función de intercambio de gaseoso.

El grupo experimental presentó en el miocardio un recuento estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) mayor que el grupo control, lo que podría deberse a que toda la circulación sanguínea pasa por el corazón, además de hacerlo a gran presión, lo que favorecería su choque contra las paredes y así la posibilidad de metástasis. Esto coincide con lo observado por Sugarbaker (1981), quien informó sobre los lugares en que los tumores presentan con mayor frecuencia metástasis.

En el bazo el grupo experimental también presentó un recuento estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) en comparación al grupo control, a pesar de que a este órgano no se le pudieron determinar metástasis. No se encontró bibliografía que explicara la causa de esto.

A nivel de linfonodos, el nódulo que presentó mayor irrigación fue el regional, luego el paraaórtico y el menos afectado fue el axilar (figura13). Esto podría deberse, por una parte, a que la invasión por células tumorales ocurrió primero en la cercanía del tumor primario, ya sea por vía hematogena y o linfática, lo que generalmente provoca que el primer lugar donde se van a ubicar células tumorales sean los linfonodos regionales. En el nodo linfático regional y en el paraaórtico se obtuvieron diferencias significativamente mayores ($P \leq 0,05$) con el grupo control. Los resultados obtenidos en el linfonodo axilar no presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el experimental ($P \leq 0,05$). Este resultado se puede deber a que el linfonodo axilar a pesar de que presentó aumento de tamaño, no se encontraron células tumorales y el aumento de tamaño podría corresponder a una respuesta inflamatoria e inmune generalizada, en contra del tumor.

Tabla IV: PROMEDIO DE VASOS SANGUÍNEOS PROMEDIOS CONTADOS

Muestra	A		B		P
	N	$\bar{x} \pm ds$	N	$\bar{x} \pm ds$	
Músculo estriado esq.	80	$2,88 \pm 2,97$	80	$8,15 \pm 5,51$	0,0001
Pulmón	80	$34,75 \pm 18,87$	80	$49,15 \pm 17,47$	0,0001
Corazón	80	$12,38 \pm 5,76$	80	$14,44 \pm 5,67$	0,0005
Bazo	80	$14,5 \pm 7,16$	80	$14,3 \pm 9,12$	0,0161
Linfonodo Regional	50	$2,16 \pm 1,53$	50	$4,4 \pm 3,02$	0,0001
Linfonodo Paraaórtico	50	$3,1 \pm 2,03$	50	$4,9 \pm 2,03$	0,0001
Linfonodo Axilar	20	$2,4 \pm 1,57$ *	20	$2,15 \pm 1,42$ *	0,56

Se ha considerado un 5% de nivel de significancia, por lo cual todo valor de $P \leq 0,05$ se consideró como diferencia significativa

A: Grupo Control

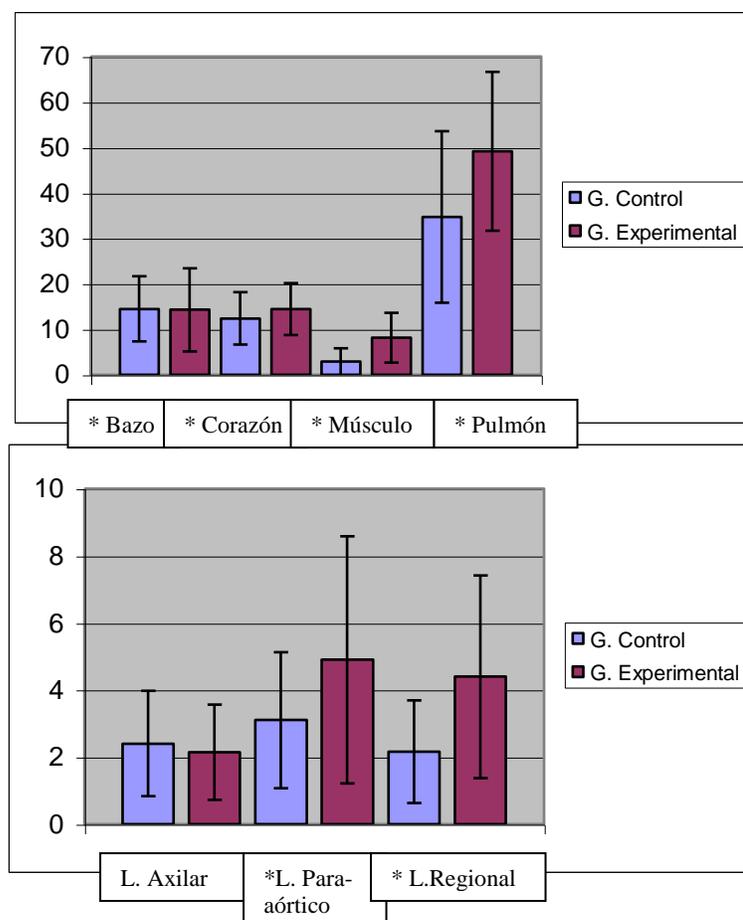
B: Grupo Experimental

N: Número de recuentos realizados por grupo y órgano

x ± ds: Media ± Desviación estándar

*Sin diferencia significativa

Figura 13: El gráfico muestra el número promedio de vasos y la desviación estándar en órganos y tejidos de individuos control y experimental



* *Difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$)*

L. Axilar: Linfonodo axilar

L. Paraórtico: Linfonodo paraaórtico

L. Regional: Linfonodo regional

Estos resultados permiten inferir que las células tumorales TA₃MTX-R estimulan selectivamente la neoangiogénesis en los diferentes órganos del cuerpo. No existe una explicación clara, pero se podría especular que las células de este tipo de tumor sintetizan y liberan factores de crecimiento proangiogénicos a su microambiente. Muchos factores de crecimiento se sintetizan a nivel local del tumor y pasarían a la circulación sanguínea, donde actuarían sobre las células endoteliales. Esta selectividad podría explicarse por que las células endoteliales de la mayoría de los órganos y tejidos presentarían receptores de más afinidad para estos factores (Folkman, 1995).

Las señales que estimulan la angiogénesis son conocidas y en este caso se podrían asociar a stress metabólico (baja pO₂, bajo pH o hipoglicemia) por el aumento de número de células sin suficiente irrigación sanguínea, stress mecánico por la inoculación de tumor o la presión generada por proliferación celular y también, se podría asociar a la respuesta celular inflamatoria, ya que estas células son capaces de secretar factores o precursores proangiogénicos (Fukumura *et al*, 1998)

Las células tumorales recién inoculadas se nutrirían por osmosis a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Se seleccionarían así las células más resistentes a la hipoxia. La hipoxia induce cambios genéticos y de su proteosoma, lo que estimula la transcripción de enzimas glicolíticas, transportadoras de glucosa y especialmente moléculas angiogénicas (Höckel y Vaupel, 2001). Estas células tumorales al proliferar liberarían factores proangiogénicos a la sangre y en el caso del tumor TA₃MTX-R al líquido ascítico. El sobrenadante de tumor TA₃MTX-R, que se utilizó en este experimento para realizar la inoculación intramuscularmente, es muy probable que haya contenido factores proangiogénicos que fueron liberados por las mismas células tumorales al líquido ascítico. Este líquido ascítico, luego al ser inoculado intramuscularmente en el

ratón, ya presentaría factores proangiogénicos que favorecerían el desarrollo de vasos sanguíneos.

Se ha visto, que gran número de células son capaces de secretar factores que estimulan la angiogénesis, tales como las propias células tumorales, células endoteliales, sanguíneas e inflamatorias. Monocitos, macrófagos, plaquetas, mastocitos y otros leucocitos son capaces de liberar factores angiogénicos tales como VEGF, Ang-1, bFGF, TGF- β 1, PDGF, TNF- α , entre otros. Además, las células cancerosas al interactuar con macrófagos los estimulan a sintetizar y secretar más de estos factores de crecimiento angiogénicos. Su relativa contribución, probablemente, varía según el tipo y tamaño tumoral, y es probable, además, que varíe a medida que crezca, regrese o reaparezca un tumor.

Precusores endoteliales circulantes también podrían contribuir a la angiogénesis tumoral, ya sea por liberación de estos desde las paredes vasculares o por movilización desde la médula ósea (Asahara *et al*, 2000 ; Rafii, 2000).

Los resultados obtenidos en este trabajo son preliminares y es importante que a futuro, se realicen nuevos trabajos experimentales para determinar cuales son los factores angiogénicos que produce este tipo de tumor, los mecanismos por los cuales este tumor produce angiogénesis y el tipo de regulación. Además, se podría determinar el tipo de vasos sanguíneos que se forman luego de la estimulación neoangiogénica inducida por los factores de crecimiento liberados por esta neoplasia, así como también estudiar los mecanismos de acción de medicamentos con efectos antiangiogénicos en neoplasias y así evaluar la posible aplicación práctica de estos contra el cáncer.

7. Conclusiones

1.- El tumor TA₃MTX-R inoculado por vía intramuscular indujo metástasis en el pulmón, corazón, linfonodo regional y paraaórtico de ratones Mus musculus cepa AJ.

2.- Los órganos metastizados presentan mayor cantidad de vasos sanguíneos en comparación con los controles.

3.- El tumor TA₃MTX-R es capaz de sacar a las células endoteliales de su estado de reposo (G₀) del ciclo celular, permitiendo así que entren en una acelerada proliferación, que favorece la angiogénesis tumoral, probablemente debido a la capacidad de este tumor de secretar factores proangiogénicos.

8. Bibliografía

- **ASAHARA, T; KALKA, C; ISNER, J. M;** 2000 Stem cell therapy and gene transfer for regeneration.h Gene ther. 7, 451-457
- **AUERBACH, W; AUERACH R;** 1994 Angiogenesis inhibition: A Review. Pharm. Ther. 63: 265-311
- **AUSPRUNK, D. H; FOLKMAN, J;** 1997 Migration and Proliferation of Endothelial Cells in Preformed and Newly Formed Blood Vessels during Tumor Angiogenesis. Microvasc. Res. 14: 53
- **BENJAMIN, L. E; GOLIJANIN, D; ITIN, A; PODE, D; KESHET, E;** 1999 Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows avascular endothelial growth factor withdrawal. J. Clin. Invest. 103: 159-165
- **BOON, T; CEROTINI, J. C; VAN DEN EYNDE, B; ET AL;** 1994 Tumor antigens recognized by T lymphocytes. Annu Rev. Immunol. 12 : 337-365
- **CARMELIET, P; ET AL;** 1996 Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. Nature 380: 435-439
- **CARMELIET, P; N.G. y S; NUYENS, D; THEILMEIER, G; BRUSSELMANS, K; LUPU, F; MONS, L; COLLEN, D; D-AMORE, D.A; SHIMA, D.T;** 1999 Impaired Myocardial Angiogenesis and Ischemic Cardiomyopathy in Mice Lacking the Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms VEGF 164 and VEGF 188. Nat. Med. 5: 495-502 (Abstract)

- **CARMELIET, P;** 1999 Controlling the cellular brakes. *Nature* 401, 657-658
- **CHAPPEY, O; WAUTHIER, M.P; BOVAL B; WAUTIER, J.L;** 1996 Endothelial Cells in Culture. An Experimental Model for the Study of Vascular Disfunctions. *Cell Biol. Toxicol* 12:199
- **CHENG W; HUNG C; CHAI C; HSU K; HE L; LING M; WU T;** 2001 Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* 108: 669-678
- **DANEKAMP, J;** 1990 Vascular Attack as a Therapeutic Strategy for Cancer. *Cancer Metast. rev.* 3:267
- **FERMAN, S.S; LEONARD-MARTIN, T.C; SERNCHUYSHYN, T. M;** 1998 The Topographic Distribution of the First Sites of Diabetic Retinal Neovascularization. *Am J. Ophthalmol.* 125:704-706
- **FERRARA, N;** 1995 The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 127-137
- **FERRARA, N; ALITALO, K;** 1999 Clinical application of angiogenic growth factor and their inhibitors. *Nature Med.* 5, 1359-1364
- **FINKENZELLER, G; MARMÉ, D; WEICH, H.A; HUG, H;** 1992 Platelet - derived Growth Factor - induced Transcription of Vascular Endothelial Growth Factor Gene is mediated by Protein Kinase C. *Cancer Res.* 52: 4821-4823
- **FOLKMAN, J;** 1976 The vascularization of tumors. *Sci. Am.* 234 : 58-73
- **FOLKMAN, J;** 1995 Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and other Diseases. *Nat. Med.* 1: 27-31
- **FUKUMURA, D; ET AL;** 1998 Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94, 715-725

- **GASPARINO, G;** 1977 Antiangiogenic Drugs as a Novel Anticancer Therapeutic Strategy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 26 (3): 147-162
- **GERWINS, P; SKOLDENBERG, E; CLAESSION-WELSH, L;** 2000 Function of FGF and VEGF and their Receptors in Angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34 (3): 185-194
- **GIACCIA, A. J;** 1996 Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin. Radiat. Oncol.* 6: 46-58
- **GRIFFIOEN, A.W; MOLENA, G;** 2000 Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer. *Pharmacol rev.* 52 (2): 237-268
- **GULLINO, P. M;** 1978 Angiogenesis and oncogenesis. *J. Natl.Cancer Inst.* 61, 639-643
- **HOECKEL, M; VAUPEL, P;** 2001 Tumor hypoxia: definitions and current clinical biologic and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (4): 266-276
- **ILLANES, J; DABANCENS, A; ACUÑA, O; FUENZALIDA, M; GUERRERO A; LOPEZ, C; LEMUS, D;** 2002 Effects of betamethasone, sulindac and quinacrine drugs on the inflammatory neoangiogenesis response induced by polyurethane sponge implanted in mouse. *Biol. Res.* 35, 339-345
- **JEONG, G.B;** 1996 What is Angiogenesis. *Angiotech* 2-7
- **JOHSON, D. A; YANNUZZI, I.A; SHAKIN J.L; LIGHTMAN, D.A;** 1998 Lacquer Craks following Laser Treatment of Choroidal Neovascularization in Pathological Myopia. *Ret.* 18 (2): 118-124
- **KERBEL, R. S;** 2000 Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505-515

- **LEMUS, D; DABANCENS, A.; ILLANES, J; FUENZALIDA, M; GUERRERO, A; LÓPEZ, C;** 2001 Antiangiogenic effect of betamethasone on the chick CAM stimulated by TA3 tumor supernatant. Biol. Res. 34: 227-236
- **PATAN, S; JUN, L. L; JAIN, R. K;** 1996 Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. Microvasc. Res. 51, 260-272
- **PIKE, S. E; YAO, L; JONES K. D; CHERNEY B; APPELLA E; KAZUYASU S; NAKHASI H; TERUYA-FELDSTEIN J; WIRTH P; GUPTA G; TOSATO G;** 1998 Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. J. Exp. Med. 188 (12) 2349-2356
- **RAFII, S;** 2000 Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J. Clin. Invest.105, 17-19
- **RAMANUJAN, S; KOENIG, G; PADERA, T.P; STOLL, B. R; JAIN, R. K;** 2000 Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. Cancer Res. 60,1442-1448
- **ROBBINS, R. T; COTRAN, R; KUMAR, V; COLLINS, T;** 2000 El corazón: Patología estructural y funcional. Capítulo 13. 6° Edición. Mc Graw interamericana: 454-457
- **SÁNCHEZ, V;** 1999 La inhibición del factor angiogénico mediante anticuerpos o péptidos específicos impediría el crecimiento de diversas formas de cáncer. Cell 30: 50-51
- **SENGER, D.R;** 1996 Molecular Framework for Angiogenesis. Am J. Pathol. 149:1

- **STRAUSS, L; FUENZALIDA, M; ILLANES, J; DABANCENS, A; DÍAZ, E; LEMUS, D; GUERRERO, A;** 2002 Effect of Sulfated β -cyclodextrin, a water soluble cycloamylose, on the promotion and/or inhibition of angiogenesis. *Pathol. Oncol. Res.* 8 (1): 47-53
- **SUGARBAKER, E.V;** 1981 Patterns of metastasis in human malignancies. *Cancer Biol. Rev.* 2: 235-278
- **TANNOCK I. F; HILL R. P;** 1998 The basic science of oncology. Third Edition. 1: 1-5
- **TARIN, D; PRICE J. E; KETTLEWELL, M. G;** 1984 Clinicopathological observations on metastasis in man studied in patients treated with peritoneovenous shunts. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 288: 749-751
- **THOMAS, K. A;** 1996 Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J. Biol. Chem.* 271: 603-606
- **WEISS, L;** 1990 Metastasis inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54: 159-211
- **ZÚÑIGA, J; FUENZALIDA, M; GUERRERO, A; ILLANES, J; DABANCENS, A; DÍAZ, E; LEMUS, D;** 2003 Effects of steroidal and non steroidal drugs on the neovascularization response induced by tumor TA3 supernatant on CAM from chicken embryo. *Biol. Res.* 36 : 233-240

9. ANEXOS

9.1 Procesamiento de muestras

- 1) Toma de muestra de tejido de una zona lo más representativa posible del órgano total.
- 2) Fijación con: - Formalina neutra al 10% (acuoso)
- Dubosq Brasil (levemente alcohólico)
- 3) Lavado con agua
- 4) Deshidratación a través de alcoholes ascendentes (80°-96°-100°)
- 5) Paso por líquido intermedio (xilol)
- 6) Inclusión: embebido en parafina sólida (parafina: 40°-56°-60°)
- 7) Corte de 3-5 μ de grosor, con micrótopo de rotación, y montaje en porta objeto
- 8) Tinción con hematoxilina para núcleos y eosina para citoplasma
- 9) Deshidratación a través de alcoholes ascendentes
- 10) Aclaración con xilol
- 11) Montaje con bálsamo de Canadá

➤ **9.1.1 Técnica Inmunohistoquímica de la Bromodeoxiuridina**

Se utilizó el kit de bromodeoxiuridina de la marca Zymed, catálogo número 93-3943, diseñado para 50 cortes.

Los cortes de 3-5 μ de grosor, son montados en portaobjetos especiales (Zymed's HistoGrip) cubiertos con polilisina y secados por 30-60 minutos en horno a 60°C. Antes de usar los reactivos los cortes deben ser desparafinados, pasándolos cada uno por 5 minutos, en 2 graduaciones diferentes de xilol y luego rehidratados a través de baños en alcoholes con graduación descendente.

- 1) Sumergir cortes en solución antiperoxidasa (una parte de agua oxigenada por nueve partes de metanol puro). El volumen a preparar dependerá del número de cortes a los cuales se les aplicará la técnica. Dejar actuar 10 minutos y luego lavar con PBS 3 veces por 2 minutos.
- 2) Agregar 2 o más gotitas de tripsina a cada corte y dejar en horno a 37°C por 3-10 minutos. Lavar luego 3 veces por 2 minutos en agua destilada.
- 3) Aplicar 2 gotas o más de solución denaturante, lista para usar, a cada corte y dejar a temperatura de ambiente por 20-30 minutos. Lavar 3 veces por 2 minutos en PBS.
- 4) Aplicar 2 gotas o 100 μ l de solución bloqueadora, lista para usar, a cada corte y dejar a temperatura de ambiente por 10 minutos. Dejar secar o eliminar solución restante, sin lavar.
- 5) Aplicar 2 gotas o 100 μ l de anti-bromodeoxiuridina de ratón biotinizada a cada corte y dejar a temperatura de ambiente por 30-60 minutos. Lavar 3 veces por 2 minutos en PBS.
- 6) Aplicar 2 gotas o más de mezcla DAB (Diaminobenzidina) a cada corte, incubar por 2-5 minutos y lavar bien con agua destilada.

- 7) Teñir cortes con 2 gotas o 100 μ l de hematoxilina, dejar actuar por 1-5 minutos, lavar con agua corriente y poner en PBS hasta que los cortes viren a azul (aproximadamente 30 segundos). Lavar con agua destilada.
- 8) Deshidratar cortes a través de baños en alcoholes ascendentes en graduación y luego lavar con xilol.
- 9) Aplicar 2 gotas de histomount y cubrir corte con cubreobjeto.

Resultado: Célula en división => tinción café del núcleo

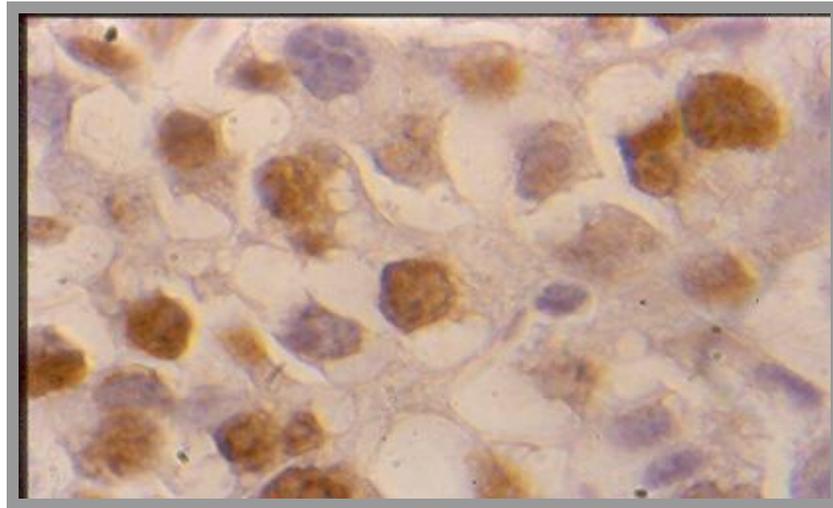


Imagen con tinción BrdU en tumor TA₃ de ratón (inmersión)

Se aprecia la coloración marrón de los núcleos de células que reaccionan a la tinción (células en fase S del ciclo celular) a diferencia de aquellas que no reaccionan y se ven con núcleo azul

➤ 9.1.2 Técnica Inmunohistoquímica Anti CD- 31

Se utilizó un kit de la marca DAKO.

Antes de empezar el protocolo desparafinar los cortes a través de baños de xilol y alcoholes descendentes en graduación, pasar luego cortes por agua corriente y agua destilada.

- 1) Recuperación de antígenos a través de la acción de la tripsina por 20 minutos a 37°C
- 2) Colocar preparados en la placa húmeda con agua destilada por 5 minutos.
- 3) Bloquear la peroxidasa endógena con DAKO S2001 durante 5 minutos a temperatura de ambiente. Lavar con agua destilada y luego PBS a pH 7,2-7,6.
- 4) Bloqueo de sitios inespecíficos con caseína al 0,25% y sumergiendo luego los cortes en DAKO X0909 durante 5-20 minutos a temperatura de ambiente.
- 5) Sin lavar se agrega 100 µl de anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-CD31 en concentración determinada y se deja actuar por 5 minutos a 37°C.
- 6) Lavar con PBS y dejar reposar en PBS por 3 minutos.
- 7) Aplicar 100 µl del anticuerpo monoclonal secundario en dilución 1:200 con DAKO S3022 y dejar actuar por 15 minutos a 37°C.
- 8) Lavar bien por 3 minutos con PBS.
- 9) Agregar ABC-HRP DAKO P0397 en dilución 1:250 con DAKO S3022 o PBS y dejar actuar por 15 minutos a 37°C.
- 10) Lavar con PBS 3 veces
- 11) Revelar la reacción con AEC DAKO o DAB

Los anticuerpos primarios anti -CD31 son determinados mediante la conjugación del anticuerpos anti-ratón secundario DAKO E0354 y el complejo de avidina-biotina/HRP DAKO P0397 (ABC standart)

Resultado: Célula endotelial => tinción roja intensa



Imagen que se esperaba obtener, si la técnica hubiese funcionado

➤ **9.1.3 Método del ácido periódico Schiff (PAS) para identificar glicosaminoglicanos de membranas basales**

Fijación: Bouin alcohólico, Gendre o Rossman a 4 °C

Soluciones:

1. Ácido Periódico: Ácido periódico 0,5 g
Agua destilada 100ml
2. Reactivo de Schiff: Fucsina básica o pararosanilina 1g
Agua destilada 200 ml
Ácido clorhídrico 1 N 20 ml
Metabisulfito de sodio o potasio 1g
Carbón activado 0,2 g

Disolver cuidadosamente la fucsina básica en el agua destilada hirviendo.

Dejar enfriar a 50 °C, filtrar y agregar el ácido clorhídrico. Enfriar a 25 °C y agregar el metabisulfito de sodio. Dejar reposar la solución en la oscuridad durante 24 hrs, agregar luego el carbón activado, agitar y filtrar.

Nota: El reactivo de Schiff, después de filtrado debe ser una solución incolora. Conservar en la oscuridad a 4 °C en frasco ámbar bien tapado.

Duración del reactivo 1 mes aproximadamente.

3. Agua sulfurosa: Agua destilada 100ml
Ácido clorhídrico 1N 5 ml
Metabisulfito de potasio al 10% 5ml

Nota: Mezclar los reactivos al momento de usar.

Procedimiento:

- a) Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- b) Sumergir en solución (1) por 10 minutos.
- c) Lavar en agua corriente por 5 minutos y luego en agua destilada.
- d) Agregar reactivo de Schiff y dejar actuar por 30 minutos a temperatura de ambiente.
- e) Lavar en agua sulfurosa recién preparada, 3 baños de 5 minutos cada uno.
- f) Lavar en agua corriente por 10 minutos.
- g) Teñir núcleos con hematoxilina (paso optativo).
- h) Deshidratar, aclara en xilol y montar en resina sintética.

Resultado: Sustancia PAS positiva => tinción rojo púrpura