

Expertos Invitados

HEMOSTASIA Y ANGIOGENESIS EN CANCER: POSIBLE NUEVO PAPEL DE LA INTERLEUQUINA 6



Columnista Experto de SIIC
Dr. Salgado Roberto

MD, Pathology

I. Perspectivas en hemostasia y cáncer

Las complicaciones tromboembólicas a menudo se asocian con elevada morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer.^{1,2} Si bien las complicaciones sistémicas de la activación de la hemostasia influyen desfavorablemente en la evolución clínica de los enfermos con cáncer, existen indicios de que la activación intratumoral de la coagulación se asocia con propiedades que promueven el crecimiento del tumor, incluso invasión y metástasis.^{3,4}

El aumento de la permeabilidad vascular en neoplasias facilita la extravasación de los factores circulantes de la coagulación y de otras proteínas como fibrinógeno.⁵

En condiciones normales, el fibrinógeno se encuentra en pequeñas cantidades en la matriz extracelular. En sujetos con cáncer se detectan niveles elevados de fibrinógeno en la circulación. Los vasos tumorales tienen mayor cinética de extravasación de fibrinógeno debido al aumento de la permeabilidad vascular tumoral que se encuentra en pacientes con cáncer. El fibrinógeno extravasado se convierte rápidamente en fibrina en el microambiente procoagulante del estroma tumoral. La matriz de fibrina se considera de especial importancia en la angiogénesis y, por lo tanto, en el crecimiento tumoral.⁶

La interacción entre los componentes de la hemostasia, fibrinólisis y crecimiento tumoral está ejemplificada en la vía del plasminógeno-plasmina. La activación de la uroquinasa-plasminógeno y del plasminógeno tisular está involucrada en los procesos celulares que se asocian con desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y crecimiento tumoral. La falta de crecimiento de tumores en ratones deficientes en PAI-1 muestra la necesidad de un delicado equilibrio entre la proteólisis de la matriz extracelular y la inhibición de la proteólisis para el crecimiento de tumores.⁷ Las pacientes con cáncer de mama expresan niveles altos de estas serinproteasas. Los niveles elevados intratumorales de componentes del sistema de la uroquinasa confieren un pronóstico más desfavorable en individuos con cáncer.⁸ La concentración intratumoral de uroquinasa-activador de plasminógeno se eleva y predice un pronóstico desfavorable en enfermos con cáncer de colon.⁹ Estas observaciones sugieren que los productos de degradación de fibrina (y fibrinógeno, PDF) más allá de reflejar la fibrinólisis intratumoral, son importantes al inducir el crecimiento tumoral. Ellos modulan el sistema inmunológico y están involucrados en la regulación del sistema plasmina-plasminógeno.^{10,11} Se han descrito propiedades angiogénicas de los productos PDF que también aumentan la síntesis de IL-6 en monocitos.^{12,13} La fibrinólisis es parte activa del remodelamiento del estroma.¹⁴ La fibrina es degradada por la plasmina derivada de tumores en varios fragmentos, entre los cuales los D-dímeros presentan mayor interés y complejidad.

En pacientes con cáncer de pulmón, los niveles altos de productos de la fibrinólisis, D-dímeros, anticipan menor supervivencia.¹⁵ En pacientes con cáncer de mama, la concentración elevada de D-dímeros predice compromiso ganglionar e invasión linfovascular y se correlaciona con el estadio clínico.¹⁶ En sujetos con cáncer colorrectal, los niveles aumentados de D-dímeros se asocian con el tamaño del tumor, con metástasis ganglionares y hepáticas, con invasión linfática y con diseminación peritoneal. La correlación entre los D-dímeros y el estadio del cáncer de colon sugiere

una relación con la carga tumoral.¹⁷ El ambiente procoagulante antes mencionado no sólo se restringe al dominio extravascular de los tumores. Las células endoteliales también muestran un fenotipo procoagulante caracterizado, por ejemplo, por mayor expresión de factor tisular que puede incrementar la adherencia y la agregación de plaquetas.¹⁸ Se ha visto que las plaquetas se adhieren y agregan en el ambiente procoagulante tumoral. Es llamativo que en ratones trombocitopénicos se observan tumores de menor tamaño. Esta observación sugiere una contribución de las plaquetas al crecimiento tumoral.

Sin embargo, aún no se tiene una prueba definitiva de que las plaquetas tengan un papel sustancial como promotoras del crecimiento tumoral. Existen pruebas en relación con la contribución de las plaquetas en la aparición de metástasis. Las células tumorales pueden promover agregación de plaquetas. Esta capacidad agregante de plaquetas de las células de tumor se correlaciona con su potencial metastásico. La adherencia de plaquetas a células tumorales circulantes las protege de la actividad lítica de las células asesinas naturales; la trombocitosis se asocia con pronóstico más desfavorable en pacientes con cáncer colorrectal y de pulmón. Estas observaciones sugieren que las plaquetas no son un simple espectador en la carcinogénesis.^{19,20} Otros investigadores y nosotros hemos acumulado pruebas acerca del papel de las plaquetas como principales transportadores del VEGF. Las plaquetas de los pacientes con cáncer tienen, en comparación con las de controles sanos, un contenido más alto de VEGF.²¹ El significado biológico de esta mayor carga de VEGF en sujetos con tumores no está claro aún. Pinedo y col. postularon un papel de las plaquetas en la inducción de angiogénesis a través de la liberación local de moléculas proangiogénicas (VEGF, bFGF, PDGF). Aunque las plaquetas tienen proteínas antiangiogénicas (TSP-1, PF-4) se ha demostrado un efecto neto a favor de la angiogénesis.^{22,23}

II. Aspectos más importantes y perspectivas futuras de "Los niveles plasmáticos de D-dímeros se correlacionan con el volumen del tumor, el índice de progresión y la supervivencia en enfermos con cáncer de mama metastásico" (Dirix y colaboradores, Br. J. Cancer, 2002)

En este estudio hemos investigado la relación entre los marcadores del metabolismo de la fibrina (D-dímeros), las variables clínicas y patológicas estándar y los niveles séricos de citoquinas angiogénicas (IL-6 y VEGF) en tres poblaciones: el grupo A (n: 30) estuvo integrado por 30 voluntarias sanas; el grupo B (n: 23) abarcó pacientes consecutivos con cáncer de mama operable, y el grupo C (n: 84) incluyó enfermas con cáncer de mama no tratado o progresivo metastásico. Los D-dímeros plasmáticos, fibrinógeno, IL-6, VEGF y el contenido calculado de VEGF en plaquetas están claramente elevados en pacientes con cáncer de mama. Los D-dímeros estuvieron incrementados en casi un 89% de las pacientes con enfermedad metastásica progresiva. El nivel de D-dímeros se correlacionó en forma positiva con la carga tumoral ($p < 0.0001$), con el número de sitios metastásicos ($p = 0.002$), con la cinética de progresión ($p < 0.0001$) y con las citoquinas relacionadas con la angiogénesis: VEGF sérico ($p = 0.0016$, correlación Spearman = 0.285); carga de VEGF calculada en plaquetas ($p < 0.0001$; correlación Spearman = 0.37) y nivel sérico de IL-6 ($p < 0.0001$, correlación Spearman = 0.59). De manera similar, los niveles de D-dímeros se correlacionaron positivamente con mayor concentración de fibrinógeno ($p < 0.0001$, correlación Spearman = 0.38). La asociación entre marcadores de la degradación de fibrina en pacientes con cáncer de mama progresivo sugiere que el nivel de D-dímeros es un indicador clínicamente importante de progresión y apunta hacia una relación entre la hemostasia y la evolución del tumor. Estas observaciones sugieren la participación de la IL-6 por su influencia sobre la angiogénesis y la hemostasia.²⁴

En un estudio posterior²⁵ medimos los factores angiogénicos circulantes (VEGF-A, IL-6 y el fragmento D-dímero de la fibrina) en vena mesentérica, vena uterina y en muestras periféricas arteriales y venosas en 21 pacientes aleatoriamente seleccionados con cáncer colorrectal operable y carcinoma cervical u ovárico para dilucidar el origen de estos factores angiogénicos que generalmente se encuentran elevados en enfermos con neoplasias. Además, se efectuó inmunohistoquímica para VEGF-A e IL-6 en tumores colorrectales de estos individuos. El VEGF-A de suero y plasma no estuvo significativamente elevado en las venas que drenan tumores a pesar de la expresión celular tumoral de VEGF-A. Por ende, el VEGF sérico no deriva en su totalidad de las células tumorales. Por el contrario, la IL-6 sérica estuvo considerablemente aumentada en las venas de drenaje tumoral en concordancia con la expresión de IL-6 en el citoplasma de las células tumorales. Se constató que en la línea celular megacarioblástica MEG-01 la expresión de VEGF-A estuvo regulada por la IL-6. Es por ello que el mayor contenido de VEGF-A en plaquetas –que se asocia con mayor nivel sérico de VEGF en pacientes con cáncer– puede obedecer en parte a la

estimulación de la expresión de VEGF-A mediada por IL-6 en el precursor plaquetario megacariocito. Luego realizamos un análisis inmunohistoquímico de plaquetas y fibrina en tumores con la finalidad de brindar más pruebas de la hemostasia intratumoral. Mediante inmunohistoquímica confirmamos que las plaquetas se adhieren y agregan en el endotelio del tumor. Proponemos que la IL-6 promueve indirectamente la angiogénesis tumoral a través de la estimulación de la carga de VEGF-A en plaquetas. Además, las correlaciones encontradas entre la IL-6, fibrinógeno y niveles de D-dímeros en sangre venosa periférica y la concentración alta de D-dímeros en las venas que drenan el tumor, en concordancia con depósitos de fibrina encontrados en el estroma tumoral, sugieren un papel importante de la IL-6 en el metabolismo extravascular del fibrinógeno. Nuestros resultados sugieren la participación crucial de la IL-6 en la conexión intrínseca entre hemostasia y angiogénesis.

III. Angiogénesis y hemostasia en cáncer: las dos caras de una misma moneda

Tal como se mencionó, los componentes de la hemostasia (por ejemplo, factor tisular, trombomodulina, trombina) tienen importante participación más allá de la simple regulación de la hemostasia. Estos factores están involucrados en situaciones fisiológicas –cicatrización de heridas y ciclo menstrual– así como en condiciones fisiopatológicas como arteriosclerosis y cáncer. La regulación de la integridad tisular se considera que no sólo depende del aporte adecuado de factores nutricionales por los vasos sanguíneos recientemente formados sino también de la correspondiente remoción de productos de desecho. Las interacciones autocrinas y paracrinas entre los factores de crecimiento producidos por los vasos sanguíneos y otras células – fibroblastos– se suman a la funcionalidad de estos procesos.^{26,27}

Existe una llamativa redundancia funcional para los factores de crecimiento asociados con angiogénesis más allá de la simple inducción de proliferación, migración y diferenciación endotelial. El VEGF-A secretado por las células tumorales no sólo ha sido involucrado en la regulación inmunológica intratumoral sino también en la inducción de un activador principal del sistema extrínseco de la coagulación: el factor tisular. Este efecto está mediado por la unión del factor de transcripción EGR-1 al sitio promotor del factor tisular inducida por VEGF. Los niveles altos de factor tisular son, independientemente de sus propiedades coagulantes, mitogénicos para las células endoteliales. La menor expresión del factor tisular en células tumorales se asocia con menor expresión de VEGF-A y con mayor expresión de trombospondina-1, que se asocia con inhibición de la angiogénesis.^{28,29} Más aun, la producción de VEGF en fibroblastos luego de la unión del factor VIIa al factor tisular parece involucrar trombina y factor Xa.³⁰ Es interesante destacar que tanto el factor VIIa como la trombina son capaces de inducir la expresión de la proteína de la matriz extracelular Cyr61 y de factor de crecimiento del tejido conectivo.³¹

Estos ejemplos ilustran que la hemostasia y la angiogénesis son dos caras de una misma moneda, involucradas en forma simultánea en el remodelamiento tisular. Ambas están intrínsecamente conectadas e, *in vivo*, no pueden ocurrir en forma separada.

La activación de la hemostasia y de la angiogénesis está causada por la influencia recíproca de distintas células: tumorales, macrófagos mononucleares, plaquetas y células del estroma, como fibroblastos y células endoteliales, con la correspondiente activación en la superficie celular de factores de la coagulación. Proponemos un modelo celular de activación de la hemostasia y angiogénesis intratumoral en el contexto de la inducción del crecimiento tumoral (Figura 1). Las propiedades que promueven el crecimiento asociadas con la activación de la hemostasia intratumoral surgen por la interacción de la hemostasia y la angiogénesis involucradas en 1) efectos asociados con células tumorales como proliferación, invasión y supervivencia; 2) efectos sobre el remodelamiento del estroma como la formación de una matriz provisoria de fibrina asociada con la migración y supervivencia celular; 3) mayor formación de vasos nuevos y 4) participación del VEGF derivado de plaquetas en la inducción de angiogénesis.

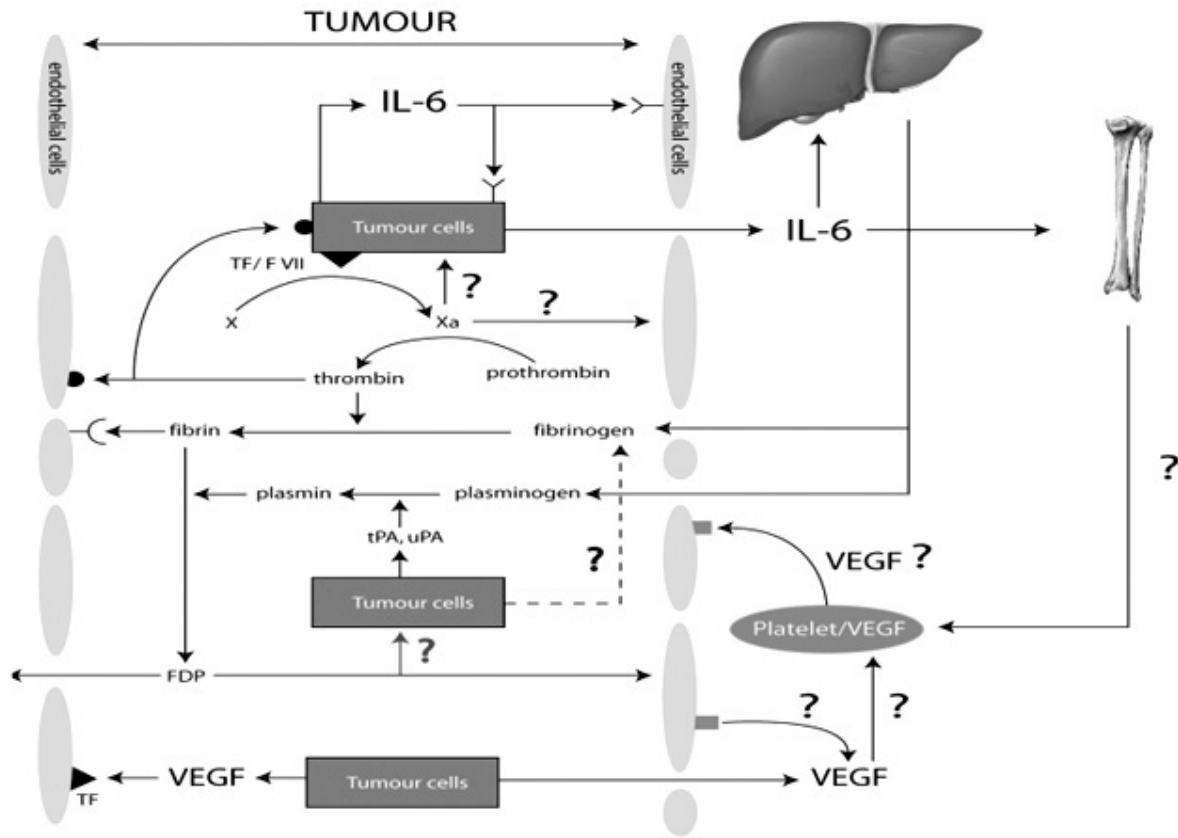


Figura 1. Visión general de las interacciones hipotéticas entre hemostasia y angiogénesis en el crecimiento tumoral. Debe hacerse hincapié en que las células del estroma (fibroblastos, células de músculo liso, macrófagos) también contribuyen con la activación de la coagulación y la angiogénesis. Estas células no se ilustran por motivos de espacio. La interleuquina (IL) 6 producida por el tumor se asocia con elevación de los niveles circulantes de fibrinógeno al inducir su expresión y secreción en células hepáticas. Debido a que el VEGF-A aumenta la permeabilidad vascular en los vasos del tumor hay extravasación de proteínas circulantes (ejemplo, factores de la coagulación, vitronectina y fibrinógeno). El fibrinógeno-fibrina se metaboliza y se producen productos de degradación de la fibrina (fibrinógeno) que pueden influir en el crecimiento del tumor a través de un efecto directo o indirecto sobre las células endoteliales o tumorales. Hay adherencia, agregación y posiblemente extravasación de plaquetas y estas células liberan su contenido de VEGF-A sobre el endotelio y las células tumorales. El VEGF-A puede originarse por endocitosis de VEGF-A producido por las células tumorales o puede derivar de la mayor expresión del factor inducida por IL-6 en los precursores plaquetarios: megacariocitos. El VEGF-A proveniente de plaquetas y de células tumorales puede contribuir, por ejemplo, a aumentar la expresión del factor tisular, con la activación de la coagulación y celular (endotelial) por factores de coagulación (por ejemplo, factor X o trombina). El VEGF en la circulación que deriva del tumor o que es liberado por plaquetas puede ser depurado por estas mismas células o por receptores solubles para VEGF-A liberados por células endoteliales. La interacción recíproca entre la modulación mediada por la IL-6 en la hemostasia y angiogénesis en tumores primarios podría generar un ambiente propicio para la migración, proliferación y pasaje intravasculares de células tumorales en áreas con densidad vascular relativamente alta.

Se vio que la hipoxia es de importancia máxima en el contexto de los procesos de hemostasia y angiogénesis intrínsecamente conectados. Varias moléculas de hemostasia (PAI-1, uPA, uPAR, TF) y angiogénesis (angiogenina, angiopoyetina-2, VEGF, VEGF-B) son estimuladas por la hipoxia.^{32,33} La hipoxia induce la expresión de VEGF, factor tisular (TF) e IL-6 en una variedad de células. El VEGF induce la expresión de TF y viceversa. La IL-6 induce TF y VEGF y este último es en definitiva capaz de modular la expresión de IL-6. Por este motivo, la IL-6 representa un claro ejemplo de molécula de conexión entre la hemostasia y la angiogénesis en el crecimiento tumoral inducido por hipoxia.

IV. Papel de la IL-6 en la conexión de la angiogénesis y la hemostasia en cáncer: el concepto de regulación local y a distancia del crecimiento tumoral

Uno de los puntos más importantes de la investigación actual tiene que ver con la regulación endocrina de la angiogénesis tumoral.^{34,35} Esto puede generar un importante cambio en el concepto de que el crecimiento de los tumores no sólo está regulado en forma local sino también por moléculas generadas en sitios distantes. Un ejemplo de actividad endocrina de células tumorales es la observación de una mayor proliferación de células endoteliales en la córnea de

pacientes con tumores sólidos en comparación con la proliferación de endotelio en enfermos sin tumores sólidos.³⁶ Más aun, la expresión de estas moléculas tumorales con acción a distancia, que en definitiva pueden aumentar el crecimiento de los tumores o de las metástasis –como un mecanismo de retroalimentación positiva– no sólo es un hecho novedoso sino que también puede tener consecuencias significativas en la producción de agentes antitumorales y en la evaluación de la respuesta antitumoral en ensayos clínicos que estudian productos antiangiogénesis.

Nuestros resultados indican que los niveles circulantes de IL-6 –pero no de VEGF– A– derivan del tumor. La observación no descarta la posibilidad de que la IL-6 y el VEGF no estén involucrados en la regulación intratumoral de la angiogénesis; más bien indica que la biodisponibilidad del VEGF y de la IL-6 producidos por los tumores en la matriz extracelular puede ser distinta. Los miembros de la familia del VEGF-A tienen afinidades diferentes, por ejemplo, por los proteoglicanos de heparán sulfato en la matriz extracelular y, por lo tanto, pueden ser menos susceptibles a ser liberados a la circulación. Esto no significa que no se libere VEGF en la circulación; sugiere que la mayor parte del VEGF circulante proviene de una fuente distinta.

Los resultados sugieren que el VEGF circulante deriva en parte de la mayor expresión de VEGF en precursores plaquetarios, megacariocitos, mediada por IL-6. Esto indica una relación intrínseca entre el tumor y la médula ósea. Un ejemplo ilustrativo de las interacciones entre el tumor primario y la médula ósea es la observación anecdótica de que en un paciente con carcinoma de células renales y mieloma múltiple, la progresión de este último declinó luego de la resección de la neoplasia renal.³⁷ Se sabe que el carcinoma de células renales produce y libera grandes cantidades de IL-6 en la circulación sistémica.³⁸ Debido a que la evolución del mieloma múltiple es dependiente de IL-6, el fenómeno podría indicar que la IL-6 circulante es biológicamente activa y capaz de modular la progresión de los tumores de la médula ósea.

Este hallazgo podría sugerir que la IL-6 derivada de la neoplasia es activa y capaz de modular la expresión de VEGF en megacariocitos. Las plaquetas de los enfermos con cáncer adquieren mayor contenido de VEGF durante la progresión del tumor. Varios autores han demostrado que el VEGF contenido en plaquetas es activo biológicamente y capaz de modular el comportamiento de las células endoteliales.^{22,39,40} La mayor cantidad de VEGF en plaquetas se asocia con peor pronóstico en pacientes con cáncer renal.⁴¹ Esta es una simple observación estadística, ya que los autores no brindaron datos convincentes para explicar el hallazgo. La importancia de la cantidad plaquetaria de VEGF puede deducirse a partir de la adherencia y la agregación local de plaquetas en los sitios procoagulantes. Dicho ambiente promotor de la coagulación se encuentra en los tumores. Las plaquetas pueden adherirse y agregarse sobre el endotelio del tumor y esto se asocia invariablemente con la liberación local de VEGF, inducida por IL-6, encontrado en los gránulos α de las plaquetas. La liberación local de VEGF podría, así, promover la angiogénesis y, por ende, el crecimiento del tumor y brindaría una explicación parcial de por qué la rápida duplicación del tamaño tumoral se asocia con el recuento de plaquetas y con un contenido plaquetario alto de VEGF. También podría explicar el pronóstico más desfavorable relacionado con mayor carga plaquetaria de VEGF en pacientes con cáncer renal cuya progresión depende, en parte, de la IL-6. El ejemplo de la IL-6 derivada de tumores capaz de modular el contenido de VEGF en plaquetas de médula ósea de pacientes con cáncer, con un estímulo adicional para la angiogénesis intratumoral, ilustra el concepto de interacciones endocrinas positivas dinámicas entre el tumor y los órganos distantes (Figura 1).

Los datos que comienzan a surgir en términos de la contribución de células endoteliales y sus precursores derivados de la médula ósea en la vascularización intratumoral coinciden con nuestras observaciones y sugieren una comunicación entre el tumor y la médula ósea.

La asociación entre la carga plaquetaria de VEGF y el VEGF de suero generó considerable discusión acerca de si la medición de VEGF en plasma podría reflejar mejor que el VEGF en suero la angiogénesis en curso en pacientes con cáncer. Pensamos que la respuesta debe estar en concordancia absoluta con el modelo propuesto. La angiogénesis en curso está modulada localmente y en forma distante; la determinación del nivel sérico de VEGF que refleja el VEGF adherido a células y el VEGF libre o el de lisados de sangre entera podría ser más sencilla que la valoración de VEGF en plasma. Más aun, la medición en plasma puede estar sesgada si no se utiliza una metodología rigurosa en el procesamiento de la muestra que evite la activación de plaquetas.

Por el momento, sin embargo, no puede darse una respuesta definitiva. Deben realizarse estudios prospectivos y de buen diseño para comparar el VEGF en lisados de sangre entera, suero y plasma con la finalidad de optimizar la metodología y discernir qué parámetro es más útil para obtener información pronóstica y predictiva reproducible en pacientes con cáncer.

El concepto de que el crecimiento del tumor aumenta la expresión de factores en sitios distantes que, en definitiva, modulan el crecimiento de la neoplasia no se limita a interacciones entre el tumor y la médula ósea.

Se sabe que la IL-6 afecta los niveles circulantes de fibrinógeno. Incrementa la expresión de fibrinógeno en células hepáticas.⁴² Debido a que el VEGF que deriva de las células tumorales, del estroma o de plaquetas es capaz de aumentar la permeabilidad vascular de los tumores puede ocurrir extravasación del fibrinógeno circulante y de otros factores de la coagulación. La fibrinólisis es parte integral del remodelamiento del estroma asociado con el tumor; hay degradación de fibrina con liberación de productos de degradación (PDF) en la circulación. Por su parte los productos de degradación de la fibrina que derivan de la fibrinólisis intratumoral se asocian con una cinética de crecimiento tumoral rápido y pronóstico más desfavorable.

Existen varias observaciones que relacionan la simple formación y presencia de PDF con la modulación de la angiogénesis, inmunidad y fibrinólisis, entre otras. Así, la IL-6 es capaz de modular la carga de VEGF en plaquetas de pacientes con cáncer que se adhieren y liberan VEGF en el endotelio tumoral con aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de fibrinógeno circulante mediada por IL-6. En un estudio previo (observaciones no publicadas) no encontramos consumo masivo de plaquetas en tumores, a juzgar por la medición del marcador de recambio de plaquetas glucocalicina en sangre venosa eferente de tumores de colon. La falta de consumo masivo de plaquetas en tumores es compatible con algunos modelos animales en los cuales no se demuestra adhesión masiva de plaquetas en la vasculatura de injertos tumorales. La mayor circulación de plaquetas debida a reducción de las interacciones entre endotelio y plaquetas fue el principal hallazgo en este modelo.⁴³ Mediante inmunohistoquímica observamos adherencia de plaquetas sobre el endotelio tumoral, probablemente reflejado en la mayor exposición y unión de plaquetas en el tejido subendotelial en vasos hiperpermeables de tumores humanos. Sin embargo, ambos hallazgos, la ausencia de consumo masivo y la adherencia y agregación local, pueden reconciliarse. En primer lugar, las plaquetas se adhieren pero no se agregan y promueven la sobrevivencia de las células endoteliales de los vasos recientemente formados. En este caso no sería evidente la agregación masiva de plaquetas. En segundo lugar, en áreas con aumento de la permeabilidad vascular y con endotelio que promueve la coagulación, las plaquetas podrían adherirse, agregarse y liberar su contenido angiogénico en el ambiente.

La importancia de la permeabilidad microvascular tumoral se corrobora con hallazgos recientes que demuestran que el bloqueo del péptido celular permeable derivado de caveolina-1, cavtratina, reduce significativamente la hiperpermeabilidad de los tumores y retrasa su crecimiento en ratones.⁴⁴

Debido a que la IL-6 y el VEGF aumentan la expresión de TF y, por lo tanto, la coagulación, se genera trombina que permite la formación de fibrina con la subsiguiente fibrinólisis intratumoral. Por este motivo, la IL-6 es crucial en las interacciones endocrinas entre tumor y médula ósea y entre tumor e hígado que permiten la formación de VEGF y de fibrinógeno, esenciales en el proceso de remodelamiento del estroma que se asocia con el crecimiento del tumor (Figura 1). Las observaciones comentadas previamente pueden explicar en parte el pronóstico menos favorable que se asocia con niveles circulantes altos de IL-6 y de D-dímeros en pacientes con cáncer de mama.

V. ¿Es el fenómeno Trousseau el talón de Aquiles del cáncer?

Nuestra observación de que la hemostasia es importante para el crecimiento del tumor no es nueva. Varios trabajos han demostrado la participación de la hemostasia en la progresión de la neoplasia. Estos hallazgos motivaron estudios clínicos con factores antihemostáticos, ejemplo heparina, en pacientes con cáncer con la finalidad de mejorar el pronóstico.^{45,46} Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios. Esto refleja no sólo lo inadecuado de las metodologías usadas –la mayoría de los trabajos fueron retrospectivos– sino también el perfil hemostático distinto de los diversos tumores.

La importancia de la angiogénesis para el crecimiento del tumor tampoco es nueva. Varias investigaciones pusieron de manifiesto el valor predictivo y pronóstico de la medición de la angiogénesis en tumores. Esto también motivó interés por la producción de agentes antiangiogénicos.⁴⁷ Nuevamente, los resultados han sido conflictivos. El fenómeno podría reflejar nuestro conocimiento incompleto de la angiogénesis en general y de los blancos en particular. Nuestros resultados muestran que la regulación endocrina de la angiogénesis involucra la modulación de la hemostasia y la angiogénesis. Con el tumor como blanco local podría reducirse la producción de IL-6 localmente con menor inducción a distancia de otros factores como VEGF y

fibrinógeno que pueden afectar el crecimiento del tumor en el sitio primario.

El concepto propuesto de modulación a distancia del proceso de crecimiento tumoral local también tiene importancia para la medición de factores circulantes, ejemplo VEGF en suero, como indicador de la respuesta a la terapia no sólo local sino también como reflejo de una menor inducción distante por el propio tumor, por ejemplo en el caso de estudios clínicos de antiangiogénesis.

Nuestros datos sugieren que si se tiene la angiogénesis como blanco, por ejemplo con inhibidores de la tirosinquinasa del receptor de VEGF, podría afectarse la hemostasia; con la hemostasia como blanco, por ejemplo con heparina, se podría alterar la angiogénesis directa e indirectamente.

A partir de la información disponible hasta el momento no se puede saber si al actuar sobre ambos blancos en forma simultánea –mediante la combinación del agente antiangiogénico TNP-470 y de un inhibidor de la agregación de plaquetas– podría obtenerse una potencia mayor que la que se logra con la terapia única. La producción exitosa de agentes antihemostáticos y antiangiogénicos dependerá del conocimiento exacto de los blancos involucrados y del diseño de trabajos

adecuados. Aún debe establecerse si es posible considerar la IL-6 como blanco. Dado que nuestro conocimiento en relación con la IL-6 en el crecimiento tumoral es incompleto, por ahora no parece ser una opción apropiada. En varios modelos animales se ha visto que la inhibición de la IL-6 promueve, inhibe o no genera efecto alguno sobre el crecimiento de tumores trasplantados. En la mayoría de los tumores en el hombre tampoco se conoce con precisión del papel de la IL-6.

Aún quedan varias preguntas sin respuesta: ¿En qué punto de la progresión del tumor se estimula la producción de IL-6? ¿Pueden extrapolarse los resultados de nuestro estudio a todos los tumores?

¿Aumenta la carga de VEGF en plaquetas de pacientes con tumores que no producen grandes cantidades de IL-6? ¿En qué momento de la progresión de la neoplasia se activa la hemostasia?

¿En todos los tumores es importante la hemostasia? ¿Cómo participa la IL-6 en los diferentes modelos de vascularización descritos hasta ahora? ¿Cuál es el efecto pronóstico de agregar IL-6 a la depresión plaquetaria inducida por quimioterapia y, de ser así, cuál es la fisiopatología?

¿Influyen las plaquetas en la progresión de las micrometástasis a metástasis clínicamente detectables? ¿Dependen las metástasis de la hemostasia y de la angiogénesis en forma comparable a lo que ocurre con el tumor primario? Todos estos interrogantes deben ser resueltos antes de que pueda considerarse la inhibición de la IL-6 en la modificación de la naturaleza sistémica de la neoplasia.

Los autores no manifiestan conflictos

BIBLIOGRAFÍA

1. Rickles FR, Levine M, Edwards RL. Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:237-248.
2. Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol* 2001;106:6-12.
3. Dvorak HF. Thrombosis and cancer. *Hum Pathol* 1987;18:275-284.
4. Dvorak H. Abnormalities of Hemostasis in malignant disease. *Hemostasis and Thrombosis: Principles and Clinical Practice*. In: Colman R, Hirsh, J., Marder, VJ., Salzman, EW. ed. Philadelphia: Lippincott; 1994
5. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132.
6. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev* 1983;2:41-73.
7. Bajou K. NA, Gerard RD., Masson V., et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor-1 prevents cancer invasion and vascularisation. *Nat Med* 1998;4:923-928.
8. Foekens JA. PH, Look M., Portengen H., et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:636-643.
9. Skelly MM. TA, Duffy MJ., Mulcahy HE., et al. Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin Cancer Res* 1997;3:1837-1840.
10. Liu J. GV. Promotion of tissue plasminogen activator and pro-urokinase-induced plasminogen activation by fragments of D and E-2 of fibrin. *J. Clin. Invest.* 1991;88:2012-2017.
11. Girmann G. PH, Schwarze G., Scheurlen PG. Immunosuppression by micromolecular fibrinogen degradation products. *Nature* 1976;259:399-401.
12. Robson SC. SE, Kirsch RE. Fibrin degradation product D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1, IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. *Br J Haematol* 1994;86:322-326.
13. Thompson WD. SE, Stirk CM., Stout AJ., et al. Factors relevant to stimulatory activity of fibrin degradation products in

- vivo. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990;1:517-520.
14. Bell WR. The fibrinolytic system in neoplasia. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:459-478.
 15. Taguchi O, Gabazza EC, Yasui H, et al. Prognostic significance of plasma D- dimer levels in patients with lung cancer. *Thorax* 1997;52:563-565.
 16. Blackwell K, Haroon Z, Broadwater G, et al. Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. *J Clin Oncol* 2000;18:600-608.
 17. Oya M. AY, Akao S., Ishikawa H. Plasma D-Dimer levels in patients with colorectal cancer: its role as a tumor marker. *Surgery Today* 1998;28:373-376.
 18. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988;53:505- 518.
 19. Honn KV, Tang DG, Chen YQ. Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:392-415.
 20. Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:325-351.
 21. Salgado R, Benoy I, Bogers J, et al. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4:37-43.
 22. Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K, et al. Vascular endothelial growth factor- stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* 2000;96:4216-4221.
 23. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352:1775-1777.
 24. Dirix LY, Salgado R, Weytjens R, et al. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2002;86:389-395.
 25. Salgado R BI, Weytjens R, Hoylaerts M, et al. Arterio-venous gradients of IL-6, plasma and serum VEGF and D-dimers in human cancer. *Br J Cancer* 2002;87:1437-1444.
 26. Carmeliet P, Collen D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 1998;91:255-285.
 27. Preissner KT, Nawroth PP, Kanse SM. Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol* 2000;190:360-372.
 28. Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holzmuller H, et al. Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* 1999;93:3811-3823.
 29. Zhang Y, Deng Y, Luther T, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994;94:1320-1327.
 30. Ollivier V. CJ, Herbert JM., Hakim J., et al. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1374-1381.
 31. Pendurthi UR. AK, Ezban M., Rao LV. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signalling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2000;275:14632-14641.
 32. Denko NC, Giaccia AJ. Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndrome (carcinoma-induced coagulopathy) and metastasis. *Cancer Res* 2001;61:795-798.
 33. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 2000;60:883-887.
 34. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2:689-692.
 35. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149-153.
 36. Ronkina TI, Iavisheva TM, Luzhetskii AS, et al. Activation of corneal endothelial proliferation in cancers of various sites. *Arkh Patol* 1993;55:66-69.
 37. Sakai A, Kawano M, Kuramoto A. Interleukin-6 produced by renal-cell carcinoma cells and progression of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1991;324:1893-1894.
 38. Blay JY, Schemann S, Favrot MC. Local production of interleukin 6 by renal adenocarcinoma in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:238.
 39. Pipili-Synetos E, Papadimitriou E, Maragoudakis ME. Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel. *Br J Pharmacol* 1998;125:1252-1257.
 40. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, et al. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:892-897.
 41. O'Byrne KJ, Dobbs N, Harris AL. Serum vascular endothelial growth factor load and interleukin-6 in cancer patients. *Br J Cancer* 2000;82:1895-1896.
 42. Gauldie J, Northemann W, Fey GH. IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J Immunol* 1990;144:3804-3808.
 43. Manegold P. HJ, Pahernik S., Messmer K., et al. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003;101:1970-1976.
 44. Gratton JP. LM, Yu J., Weiss E., Jiang Z., et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell* 2003;4:31-39.
 45. Hejna M, Raderer M, Zielinski CC. Inhibition of metastases by anticoagulants. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:22-36.
 46. Zacharski LR, Ornstein DL. Heparin and cancer. *Thromb Haemost* 1998;80:10- 23.
 47. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000;190:330-337.

OXIDO NITRICO SINTASA, CICLOOXIGENASA Y ARGINASA ESTAN INVOLUCRADAS EN LA PROGRESION TUMORAL A TRAVES DEL PROCESO ANGIOGENICO



Columnista Experto de SIIC
Dra. Lilia Elena Davel

Jefe Sección Inmunidad Celular, Area Investigación Campo de especialización: Oncología

Introducción

Las investigaciones realizadas en los últimos 30 años establecieron que la angiogénesis es una etapa esencial en la progresión tumoral. Si bien en un principio se pensó que la angiogénesis era el resultado directo de la acción de un factor soluble sobre las células endoteliales, hoy se sabe que en la iniciación del proceso de neovascularización intervienen múltiples factores que actúan en diferentes niveles induciendo el crecimiento de los vasos sanguíneos.¹ El estímulo que provoca la iniciación del proceso angiogénico puede ser también indirecto, a través de las células del sistema inmune del huésped: macrófagos, linfocitos, mastocitos.

La Arg puede escindirse en citrulina y NO debido a la acción de una familia de isoenzimas: óxido nítrico sintasa neuronal (NOS1), endotelial (NOS3) e inducible (NOS2). El NO liberado está involucrado en la regulación de importantes funciones fisiológicas y patológicas y es un importante componente del microambiente tumoral ya que puede ser producido por las propias células tumorales, por las células endoteliales de la microvasculatura tumoral o por los macrófagos y células del estroma tumoral. Nosotros determinamos el papel que desempeña el NO sobre el crecimiento tumoral al actuar como parte de la cascada de señales que desencadenan el proceso angiogénico.² La Arg es el sustrato común de NOS y de arginasa (A) y esto significa que a partir de un mismo aminoácido, según cuál fuere la enzima que está disponible, se pueden obtener diferentes productos como la molécula reactiva NO (en el caso de las distintas isoformas NOS) o urea y ornitina (cuando actúan las isoformas AI y AII). La ornitina es un aminoácido precursor de poliaminas esenciales en el proceso de proliferación celular, o sea que, de alguna manera, los productos de estas enzimas están involucrados en la progresión tumoral. Las PG, que también regulan el desarrollo tumoral, son una serie de compuestos en cuya síntesis participan las isoformas COX-1 y COX-2. Su producción se vincula con la liberación de NO, lo que indica la existencia de interacciones entre las vías de señalización de ambas enzimas, COX y NOS. Nosotros demostramos que en las células tumorales LMM3, derivadas de un adenocarcinoma mamario murino, la PGE₂ modula positivamente la actividad de NOS, mientras que, por el contrario, el NO ejerce una retroalimentación negativa sobre la actividad COX.³

En numerosos estudios de biología tumoral, tanto experimentales como clínicos, se demostró que el NO, producido de manera endógena, promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Por otro lado, también se ha demostrado su participación en la inducción de apoptosis (muerte celular programada) tanto de células del sistema inmune como de células tumorales.⁴ Estos efectos opuestos del NO, contra el huésped o contra el tumor, dependen de dos variables de gran importancia: el nivel de producción de NO y la carga genética de las células tumorales.^{5,6} Nosotros pudimos determinar que las células tumorales de diferentes líneas de adenocarcinomas murinos producen diferentes cantidades de NO y mostramos que existe una correlación inversa entre los niveles de NO y la citotoxicidad mediada por NO.⁷

Por otra parte, en la respuesta inmune antitumoral, es de crucial importancia la actividad regulatoria que ejercen los nódulos linfáticos regionales de un portador de tumor que puede conducir a un desequilibrio dependiente de la respuesta celular T.^{8,9} Los macrófagos son importantes componentes del infiltrado leucocitario en los tumores, el papel que cumplen en la progresión tumoral es contradictorio, ya que pueden ser reguladores positivos al promover el crecimiento tumoral o reguladores negativos por su acción citotóxica contra el tumor y ambas acciones se ejercen a través de la vía metabólica de la Arg.¹⁰

La participación aparentemente contradictoria del NO, las PG y las poliaminas en la relación huésped-tumor sugiere gran complejidad de su función sobre la biología tumoral y, por lo tanto, constituye un enorme desafío para profundizar su estudio.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c, de 8 a 12 semanas de edad, criados en el bioterio de nuestro Instituto. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con los procedimientos indicados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH 1986).

Tumores

El tumor S13 es un adenocarcinoma mamario débilmente metastásico que apareció espontáneamente en ratones BALB/c y que se mantiene por trasplantes subcutáneos (s.c.). Los implantes del tumor S13 se realizan en el flanco izquierdo, con un trócar, para evaluar el crecimiento tumoral y las metástasis posquirúrgicas. Cuando se realizó la prueba de Winn se inoculó una suspensión enzimática de 1.5×10^4 células tumorales en la almohadilla plantar de ratones normales.

La línea de células tumorales LMM3 se obtuvo previamente a partir de un adenocarcinoma mamario singeneico MM3. Los cultivos celulares se mantienen en monocapas a 37°C con 5% de CO₂ en medio de cultivo F15 suplementado con 5% suero fetal bovino y su viabilidad se determina con azul Trypan, se utilizan suspensiones con más del 90% de viabilidad.

Los ratones portadores de tumor se obtienen por inoculación subcutánea en flanco de 4×10^5 células LMM3. Para la obtención de células peritoneales, los animales se sacrifican a los 7 días de portación del tumor.

Crecimiento tumoral

El crecimiento del tumor s.c. se expresa como diámetro promedio geométrico del tumor en mm, midiendo los dos diámetros perpendiculares de la masa tumoral que se determinan mediante un calibre Vernier 3 veces por semana.

Las metástasis pulmonares posquirúrgicas (operados el día 10) se observan al momento del sacrificio (25 días postrasplante) con una lupa. La incidencia metastásica se determina como porcentaje del número de animales que presentan metástasis con respecto al total de los animales operados.

Test de Winn

Este ensayo de neutralización *in vivo* consiste en inocular en la almohadilla plantar 1.5×10^6 células del GLDT junto con 1.5×10^4 células del tumor S13 en 0.05 ml de medio. El crecimiento del tumor se determina midiendo el grosor de la pata por medio de un calibre Mitutoyo, tres veces por semana, hasta el sacrificio de los animales.

Purificación de macrófagos

Las células de la cavidad peritoneal de animales normales y portadores de tumor LMM3 de 7 días se obtienen por lavado con medio de cultivo MEM suplementado con 10% de SFB. Los Mf normales (MfN) y Mf de portadores de tumor (MfT), se purifican por la técnica de adhesión al plástico durante 2 hs a 37°C. Luego de realizar 2 lavados con PBS, los Mf adheridos se recuperan por raspado y se resuspenden en medio de cultivo. La viabilidad de las células se determina por el ensayo de exclusión con azul Trypan, siendo siempre superior al 95%. *Ensayo de angiogénesis*
Ratones hembras normales de la cepa BALB/c se inoculan por vía i.d. en ambos flancos con: 2×10^5 células LMM3 solas o cocultivadas con MfN o MfT (2×10^3), 2×10^5 células S13 o 4×10^6 células de GLDT, en un volumen total de 0,1 ml de medio MEM con azul Trypan para localizar el sitio de inoculación. Luego de 5 días, los animales se sacrifican y la respuesta vascular se observa en la cara interna de la piel con la ayuda de un microscopio de disección WILD. El método utilizado para cuantificar la respuesta angiogénica se basa en la determinación de la densidad de vasos, expresada como número de vasos/mm² de piel. Para ello se fotografían los sitios de inoculación, se proyectan sobre una cuadrícula y se cuenta el número de vasos. La densidad de vasos (δ) se determina por la fórmula:

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

Determinación de la actividad de NOS

Los MfN y MfT ($10^5/200$ μ l de medio) se siembran en placas de plástico de 96 hoyos y se cultivan

por 24 hs a 37°C. La concentración de nitrito en el sobrenadante libre de células se determina por la reacción colorimétrica de Griess. Brevemente, se mezclan iguales volúmenes de sobrenadante del cultivo con reactivo de Griess (1% de ácido sulfanílico en 30% de ácido acético en agua con 0.1% de cloruro de N-1-naftiletildiamina en ácido acético al 60%). A los 15 minutos se lee la absorbancia a 590 nm con un lector de ELISA. La concentración de nitrito se determina con respecto a una curva estándar de nitrito de sodio diluido en medio. Los resultados se expresan en micromolar de NO_2^- por 10^6 células ($\mu\text{M}/10^6$ cél.).

Determinación de la actividad arginasa

La actividad de arginasa se determina en lisados celulares según el método descrito por Modolell. Brevemente, 10^5 MfN y MfT se lisan con 0.5 ml de *buffer* Triton X-100 al 0.1%. Después de 30 minutos se agregan 0.5 ml de Tris-HCl 25 mM conteniendo MnCl_2 5 mM, pH 7.4. La enzima se activa por calentamiento a 56 °C durante 10 minutos. La hidrólisis de arginina se realiza incubando 25 μl del lisado activado con 25 μl de arginina 0.5 M, pH 9.7, a 37°C por 60 minutos. La reacción se detiene en medio ácido y la concentración de urea se determina a 540 nm, después de agregar 25 μl de α -isonitrosopropiofenona 9% (disuelta en etanol 100%). Los resultados se obtienen por extrapolación con una curva de urea, y se expresan en μmoles de urea/ 10^6 cél.hora.

Determinación de la actividad de COX

Los Mf (2×10^6) se incuban por 90 minutos a 37°C en 1 ml de medio con o sin el agregado de indometacina (INDO) 10^{-6} M. Los sobrenadantes se congelan a -80°C hasta la determinación de PGE_2 por radioinmunoensayo (RIA) de acuerdo con el método de Granstrom. Brevemente, 100 μl de muestras o estándares se mezclan con 500 μl de antisuero anti- PGE_2 hecho en conejo. Posteriormente, se agrega 100 μl (5 pg) de [^3H]- PGE_2 en cada tubo. Luego de la incubación se agrega una suspensión de carbón-dextrán para separar la fracción libre de la unida. La radiactividad presente en los sobrenadantes se determina con un contador de centelleo líquido utilizando solución centelleadora biodegradable. Los resultados se expresan en picogramos por 10^6 células (pg/ 10^6 cel.).

Detección de las isoformas de NOS por Western blot

Los Mf (10^7) se lavan con PBS frío y luego se agrega 1 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8, 100 mM NaCl conteniendo EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%, PMSF 10 mM, aprotinina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor de tripsina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El lisado celular se centrifuga a 10 000 g por 20 min. Los sobrenadantes se conservan a -80°C hasta su uso. La concentración proteica se determina por el método de Lowry. Las muestras se siembran en minigeles de SDS-poliacrilamida junto con estándares de peso molecular conocido. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se lavan con agua destilada. Las membranas de nitrocelulosa se bloquean con *buffer* Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 (0.05%) con 5% de leche descremada (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incuban con anticuerpos policlonales anti-nNOS, anti-iNOS o anti-eNOS en TBST por 24 hs. Después de varios lavados con TBST, se incuban con el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón o conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:4 000 en TBST) a 37°C durante 1 h. Las bandas se revelan con una mezcla de cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato-p-toluidina (NBT/BCIP). Las bandas se cuantifican por medio de un densitómetro computarizado conectado a un analizador de imágenes.

Detección de isoformas de arginasa por Western blot

Los MfN o MfT purificados se lavan 2 veces con PBS frío y se resuspenden con 300 μl de *buffer* de lisis: Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y PMSF 0.1 mM. La lisis se completa por sonicado. Las muestras (25 μg por calle) son sometidas a electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa por el método semilíquido. Después de varios lavados con agua destilada, se bloquean los sitios inespecíficos con *buffer* TBST con 5% de leche descremada, se incuban con el anticuerpo monoclonal anti-A I o con un anticuerpo de conejo anti-A II durante 18 hs a 4°C y luego 1 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón o de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las bandas se visualizan con una mezcla NBT/BCIP. La cuantificación se realiza por densitometría en un analizador de imágenes computarizado.

Detección de CD31 (PECAM-1) por Western blot

Se obtienen muestras de piel del sitio angiogénico desprovistas de pelo y se las homogeneiza a 4°C en 4 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor de tripsina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH:7.4. Los homogenatos se centrifugaron a 4°C, 10 000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes se guardan a -80°C y la concentración de proteína se determinó por el método de Lowry. Las muestras fueron sometidas a

electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, sembrándose aproximadamente 30 µg de proteína por calle. Luego, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa por el método semi- líquido. Después de varios lavados con agua destilada se las incuban con TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Se incuba durante 18 hs. con un anticuerpo policlonal anti-PECAM-1. Luego de 4 lavados con TBS-T se agrega el segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina disuelto en TBS-T. Las bandas se visualizan con una mezcla NBT/BCIP. La cuantificación se realiza por densitometría en un analizador de imágenes computarizado.

Drogas

Todas las drogas fueron provistas por SIGMA-Aldrich, salvo otra especificación. Las soluciones se prepararon en el momento de cada ensayo. Se utilizó como inhibidor de NOS: N^ω nitro-L arginina metil ester (L-NAME) 10⁻³ M y como inhibidor de COX: indometacina (INDO) 10⁻⁶ M; para interferir la vía de la arginasa se utilizó L-valina (Val) 5x10⁻² M.

Estadística

Todos los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces obteniéndose resultados comparables. La significación de los ensayos se determinó utilizando el test "t" de Student, el de ANOVA o el de Mann-Withney, utilizando el programa STAT Primer. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando p < 0.05. Los resultados son expresados como promedio ± E.S.

Resultados y discusión

Uno de los objetivos de este estudio fue identificar el papel que cumplen los GLDT S13 sobre el crecimiento tumoral. Confirmamos la participación del NO como promotor de la angiogénesis y de la progresión tumoral. Así observamos que animales tratados *in vivo* con un inhibidor no selectivo de NOS (L-NAME) presentan una disminución de la respuesta angiogénica, el crecimiento tumoral y la incidencia de metástasis (Figuras 1, 2 y 3). Se ha propuesto que la continua generación endógena de bajas concentraciones de NO por parte de las células tumorales contribuye al aumento de la respuesta angiogénica asociada al crecimiento tumoral.

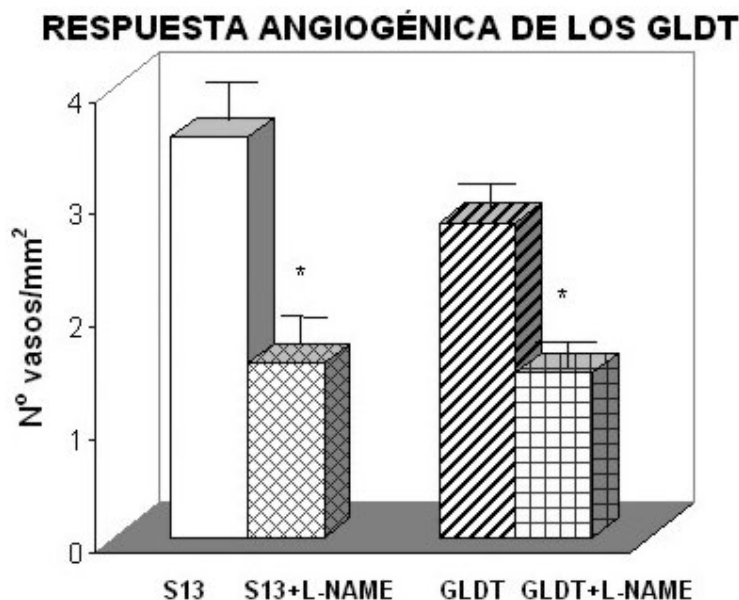


Figura 1. Las células S13 (2x10⁵/0.1 ml) se inocularon en forma i.d. en ambos flancos de ratones normales no tratados o tratados con L-NAME (50 mg/kg día i.p.) durante los 5 días que dura el ensayo. De igual forma se inocularon 4x10⁵ células de ganglio drenante del tumor S13 (GLDT) provenientes de portadores no tratados o tratados con L-NAME (1 g/l en el agua de bebida) durante el tiempo de portación del tumor. Los valores son promedios ± E.S. de 6 determinaciones, * p < 0.0001.

CRECIMIENTO DEL TUMOR S13

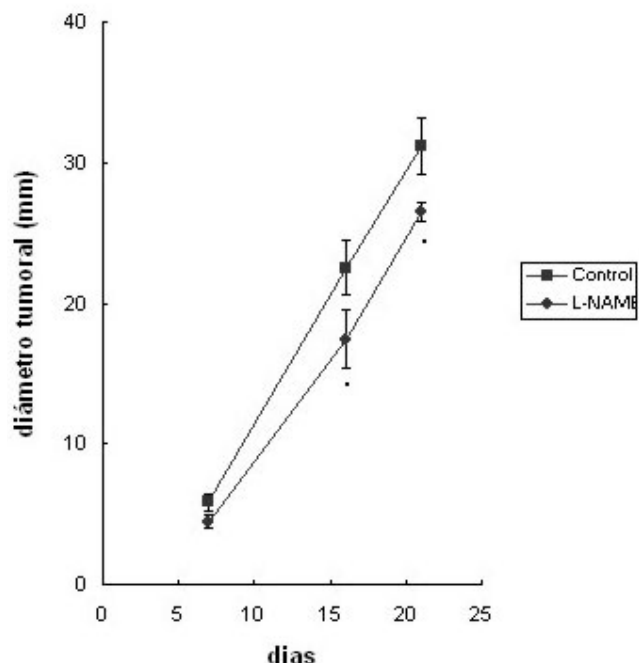


Figura 2. El tumor S13 se implantó en forma s.c. por trócar en el flanco izquierdo de ratones normales no tratados o tratados con L-NAME (1 g/l en el agua de bebida) durante el tiempo de portación del tumor. Los diámetros tumorales (largo y ancho) se midieron tres veces por semana con un calibre Vernier y se graficó el diámetro geométrico promedio vs. días de progresión tumoral. Los valores son promedios \pm E.S. de 10 determinaciones, * $p < 0.001$.

INCIDENCIA DE METÁSTASIS

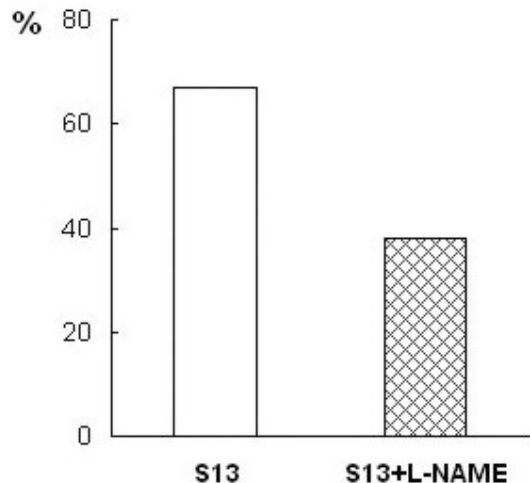


Figura 3. El tumor S13 se implantó en forma s.c. por trócar en el flanco izquierdo de ratones normales no tratados o tratados con L-NAME (1 g/l en el agua de bebida) durante el tiempo de portación del tumor. La cirugía del tumor primario se realizó a los 10 días de portación y las metástasis pulmonares se observaron al momento del sacrificio de los ratones. La incidencia de metástasis se expresa como porcentaje con respecto al número total de ratones inoculados.

Cuando se extirparon los GLDT, observamos un aumento de tamaño debido a la presencia de histiocitos pero no de células tumorales. Esta observación se corroboró *in vivo*, pues cuando los GLDT se transplantaron a ratones normales no hubo evidencia de crecimiento tumoral, lo que indica la ausencia de células tumorales. Para estudiar la presencia de células inmunes efectoras (inhibidoras del tumor) o exaltadoras (promotoras del tumor) en los GLDT, se realizó el ensayo de Winn. Esta prueba de neutralización *in vivo* consiste en la coinoculación de las células tumorales con las células de los GLDT, en este caso se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral, comparado con el control (Figura 4).

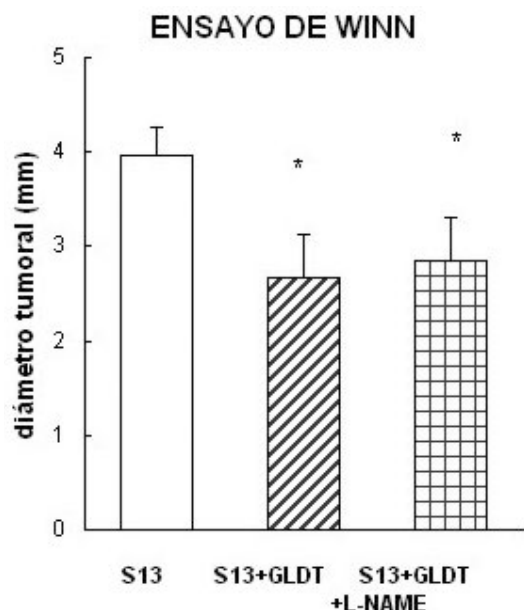


Figura 4. Se inocularon 1.5×10^6 células de ganglio drenante del tumor S13 (GLDT) con 1.5×10^4 células S13 en la almohadilla plantar de ratones normales no tratados o tratados con L-NAME (1 g/l en el agua de bebida) hasta el momento del sacrificio (16 días). El grosor del tumor se midió tres veces por semana con un calibre Mitutoyo. Los valores son promedios \pm E.S. de 10 determinaciones.

Los linfocitos de los GLDT indujeron una fuerte respuesta angiogénica que se correlacionó directamente con la actividad NOS (aumento del 35% en la actividad enzimática con respecto a los normales). En la figura 1 se observa que este efecto se anula con el tratamiento del inhibidor de NOS, L-NAME.

Como la producción y liberación de PG, de la misma manera que el NO, está asociada al desarrollo de la respuesta angiogénica,¹⁶ determinamos los niveles de producción de PGE₂ en los GLDT. Sorpresivamente, la síntesis de PGE₂ disminuyó en un 50% comparada con la liberación de PGE₂ en los nódulos linfáticos normales. El aumento de la actividad NOS explica, en parte, el aumento de la respuesta angiogénica, pero ¿cómo se explica la disminución en la liberación de PGE₂? ¿Será que esta disminución se relaciona con el efecto protector de los ganglios que se detectó por el ensayo de Winn? Efectivamente, el efecto antitumoral de los ganglios drenantes del tumor no fue afectado por la inhibición de NOS que, en cambio, sí disminuyó la respuesta angiogénica. Por lo tanto, los bajos niveles de PGE₂ en los GLDT pueden correlacionarse con su mayor actividad antitumoral (mecanismo independiente del NO) a pesar de su capacidad para estimular la angiogénesis (mecanismo dependiente del NO).

Algunos autores han demostrado que los Mf activados por la presencia de un tumor en crecimiento podían llevar a la muerte de las células tumorales a través de la inducción de apoptosis por mecanismos independientes y dependientes del NO.¹⁷

Nosotros estudiamos la modulación de la angiogénesis tumoral por MfT y observamos que cuando las células tumorales LMM3, que producen respuesta angiogénica, son coinoculadas con MfN no se modifica la respuesta neovascular producida por las células tumorales. En cambio, cuando se coinoculan con MfT (en una relación 100:1, con baja cantidad de Mf que por sí solos no inducen angiogénesis) se produce un fuerte incremento de la actividad angiogénica de las células tumorales (Figura 5). La inoculación de los MfT solos, a dosis mayores (equivalentes a las utilizadas en las células tumorales), promueve la angiogénesis, mientras que los MfN, a todas las dosis estudiadas, son incapaces de evocar una respuesta angiogénica (datos no mostrados).

**RESPUESTA ANGIOGÉNICA DEL COCULTIVO
LMM3+MACRÓFAGOS**

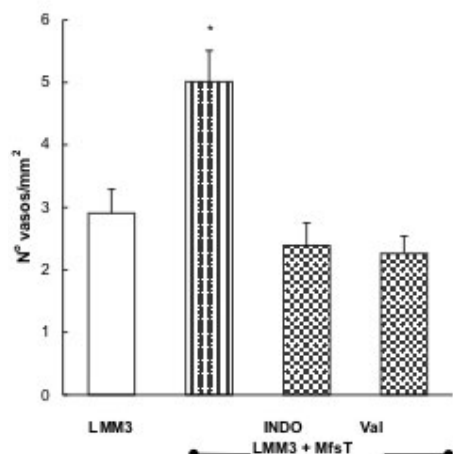


Figura 5. las células LMM3 (2×10^5) cocultivadas en MFT (2×10^3) se inocularon en forma i.d. En ambos flancos de ratones normales. Los Mft fueron tratados con 10^{-6} M de indometacina y 5×10^{-2} M de L-valina (Val). Los valores son promedios \pm E.S. de 10 determinaciones.

La respuesta angiogénica cuantificada *in vivo*, por el número de vasos por mm^2 de piel, fue corroborada con la detección de CD31, que es una molécula que se expresa en el endotelio de todos los tipos de vasos y es empleada como marcador de vasos sanguíneos, particularmente al comienzo de la neovascularización. Por un ensayo de *Western blot* se detectó que la expresión de CD31, negativa en piel normal, es evidente en animales inoculados con células tumorales y esta expresión aumenta en la piel de animales coinoculados con células LMM3 y MFT (Figura 5). Al estudiar la expresión de las isoformas de NOS y de A en las distintas poblaciones de Mf, se determinó que los MfN y MFT expresan constitutivamente las isoformas iNOS y nNOS, es mayor la expresión de éstas en MfN que en MFT.¹⁰ Estos resultados concuerdan con la observación que los MfN producen más NO que los MFT (Tabla I). Por otro lado, los MfN y MFT expresan constitutivamente las isoformas AI y AII, es mayor la expresión de ambas en MFT, lo que también concuerda con el hecho que los MFT producen más urea (producto de la acción de A sobre la Arg) que los MfN. Por lo tanto, la capacidad de los MFT para regular positivamente la angiogenicidad de las células tumorales estaría vinculada a la actividad de las isoformas de A.

Tabla I – Actividad de las enzimas NOS, Arginasa y COX en Macrófagos

	MfsN	MfsT
NOS ($\text{NO}^-_2 \mu\text{M}/10^6 \text{cel.}$)	126,0 \pm 11,0	89,9 \pm 10,9
Arginasa (urea $\mu\text{M}/10^6 \text{cel.}$)	74,4 \pm 6,5	419,0 \pm 18,0
COX ($\text{PGE}_2 \text{ pg}/10^6 \text{cel.}$)	424,0 \pm 22,0	28,3 \pm 3,3

La producción de NO, medida como NO^-_2 se determinó en sobrenadantes libres de células utilizando el reactivo de Griess; la actividad de arginasa se cuantificó en lisados celulares por un método enzimático colorimétrico y la actividad de COX se midió cuantificando la síntesis y liberación de PGE_2 por RIA. Los valores son promedios \pm E.S. de 4 experimentos.

Entonces, podemos concluir que los MFT, lejos de ejercer una acción tumoricida, cuando se presentan en bajas dosis, contribuyen a estimular la cascada angiogénica, a través de la vía de A. Los MfN, a pesar de que poseen mayor actividad NOS y mayor expresión de las isoformas inducible y neuronal de dicha enzima, son incapaces de inducir angiogénesis.

Por todo lo expresado podemos concluir que en los mecanismos que conducen al desarrollo de la actividad angiogénica, a pesar de que siempre está involucrado el metabolismo de la Arg, algunas veces la regulación se realiza vía NOS y otras vía A. De acuerdo con nuestros resultados, en el

caso de los ganglios linfáticos la promoción de la angiogénesis es mediada por NOS y en los MFT se realiza un "switch" en la vía metabólica de la Arg desde NOS a A, disminuyendo los niveles de NO y proveyendo, probablemente los precursores de poliaminas necesarios para la progresión tumoral. Ambos tipos de células inmunocompetentes de un portador de tumor contribuyen a la progresión tumoral a través de la cascada de eventos que estimulan la respuesta neovascular. Los autores no manifiestan conflictos

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Davel, M. Miguez, E.S. de Lustig. Angiogenesis induction by lymphocytes from tumor-bearing mice in a syngeneic combination. *Transplantation* 1984, 37(3): 327-328.
2. Jasnis MA, Giri J, Davel L. Nitric oxide is involved in stimulation of tumor growth. *Oncol. Reports* 1997; 4: 1107-11.
3. L.Davel, A.D'Agostino, A.Español y col. Nitric oxide synthase-ciclooxigenase interactions are involved in tumor cell angiogenesis and migration. *J.Biol.Reg.Homeos.Ag.* 2002, 16 (3), 181-189.
4. Xie K, Dong Z, Fidler IJ. Activation of NOS gene for inhibition of cancer metastasis. *J.Leukoc. Biol.* 1996, 59:797-803.
5. Ziche M, Morbidelli L, Masini E y col. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promote by substance P. *J.Clin.Invest.* 1995, 94: 2036-2044.
6. Pipili-Synetos E, Papageorgious A, Sakkoulas E y col. Inhibition of angiogenesis, tumor growth and metastasis by the NO-releasing vasodilators, isorbide mononitrate and dinitrate. *Br.J.Pharmacol.* 1995, 116: 1829-1834.
7. Eijan AM, Davel L, Rueda H y col. Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumor cell lines. *Int.J.Mol.Med.* 1998, 2: 625-30.
8. Wiers K, Wright MA, Vellody K y col. Failure of tumor-reactive lymph node cells to kill tumor in the presence of immune-suppressive CD34⁺ cells can be overcome with vitamin D3 treatment to diminish CD34⁺ cell levels. *Clin.Exp.Metastasis* 1998, 16: 275-282.
9. Bauer H, Jung T, Tsikas D y col. Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1 and T-helper 2 associated cytokines. *Immunology* 1997, 90: 205-211.
10. Davel LE, Jasnis MA, de la Torre E y col. Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor induced angiogenesis by macrophages. *FEBS Lett.* 2002, 532:216-220.
11. Benacerraf B, Unanue E. Tumor Immunology. En: *Textbook of Immunology*. Williams & Wilkins Company (ed) Waverly Press, Baltimore, 1980, 204-205.
12. Davel L, Puricelli L, Vidal M y col. Soluble factors from target organ enhance tumor cell angiogenesis. Role of laminin SIKVAV sequence. *Oncol. Reports* 1999, 6: 907-911.
13. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediated glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9030-9033.
14. Granstrom E, Kindhal H. Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes. En: *Prolich, JC ed. Advances in Prostaglandins and Thromboxanes Research*. New York: Raven Press, 1978, 119-210.
15. Davel L, Rimmaudo L, Español A y col. Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines. *Angiogenesis* 2004 (en prensa).
16. Davel L, Miguez M, de Lustig ES. Evidence that indomethacin inhibits lymphocyte-induced angiogenesis. *Transplantation* 1985, 39(5): 564-565.
17. Cui S, Reichner JS, Mateo RB y col. Activated murine macrophages induced apoptosis in tumor cell through nitric oxide-dependent or independent mechanisms. *Cancer Res.* 1994, 54: 2462-2467.