

CONCEPTE I EPIDEMIOLOGIA DEL MELANOMA
MALIGNE CUTANI.

El melanoma maligne és la neoplàsia maligna constituïda per melanocits. Tot i l'existència de melanocits lluny de la pell, la gran majoria de melanomes es desenvolupen a nivell cutani.

El melanoma maligne cutani és el càncer que està augmentant més a la raça blanca. Aquest augment s'ha acompanyat a més d'un increment, encara que no tan notable, de la mortalitat. Donada la manca de tractaments efectius als estadis avançats, els principals esforços sanitaris avui en dia es dirigeixen cap a la prevenció primària i secundària (Barnhill, 1993). Respecte a la prevenció primària, el més important és canviar els hàbits de fotoexposició. Quant a prevenció secundària, inclús les campanyes de detecció precoç no han aconseguit evitar que molts melanomes es diagnostiquin en estadis avançats (de Rooij, 1996; Lipsker, 1998).

INCIDÈNCIA.

El melanoma constitueix el 3% de tots els càncers, exclouint el càncer de pell no melanoma (Barnhill, 1993). Les dades sobre l'evolució de la seva incidència són alarmants: Ha anat augmentant un 4 a 8% cada any, de manera que cada 10-15 anys dobla la seva incidència. Des del 1930, la incidència ha pujat un 1800%, augmentant actualment als USA més que cap altre càncer. És el vuitè càncer més habitual, ara, i és el càncer més freqüent a dones de 25 a 29 anys. Es calcula als USA que 1 de cada 105 nascuts el 1990 tindrà un melanoma. Des del 1950 és quan aquest augment d'incidència es nota més (Barnhill, 1993; Katsambas, 1996; Koh, 1996; Rigel, 1996; McKie, 1998-I).

Cal comentar que aquest augment en la incidència no és propi de països concrets, sinó que és universal, com demostren diferents estudis: Països com Noruega, Austràlia, Escandinàvia, parts de Nord-Amèrica, Escòcia i Alemanya, han doblat la seva incidència durant els anys 70-80 (McKie, 1998-I; McKie, 1992). Les àrees de major incidència són les que combinen poblacions amb fototipus més baix junt a major grau de fotoexposició. Així, a Austràlia i Nova Zelanda es calculen 40 casos per 10^5 habitants/any (McKie, 1998-I), i a Sudàfrica 24.4 casos per 10^5 habitants/any, als habitants de raça blanca (Saxe, 1998). El menor nombre de casos incideix a països de raça no blanca; per exemple, un estudi a la Martinique demostra una incidència de 0.75 casos per 10^5 habitants/any a dones i de 0.51 per 10^5 habitants/any a homes (Boisseau-Garsaud, 1998); països com Algèria (Boudghene-Stambouli, 1997) i Japó (Kato, 1996) mostren incidències similars.

EPIDEMIOLOGIA

A Europa, la incidència global és de 12 casos per 10⁵ habitants/any a les dones, i de 6 casos per 10⁵ habitants/any a homes (McKie, 1998-I). A Catalunya, el melanoma suposa un 1.2% de tots els càncers als homes i el 1.6% a les dones. A Tarragona, on hi ha el registre més antic, s'observa que hi ha un increment anual del 6.2% (Institut Català d'Oncologia, 1997).

L'únic grup de població on aparentment no s'ha incrementat la incidència de melanoma maligne cutani és als menors de 14 anys (Berg, 1997; Ruiz-Maldonado, 1997). La mitjana d'edat d'aparició del melanoma volta els 50 anys a pràcticament tots els registres, i predomina al sexe femení en una proporció aproximada de 2:1 front el masculí (McKie, 1998-I).

L'espectacular augment de la incidència respecte a les altres neoplàsies ha provocat nombroses teories per tractar d'explicar-ho. Potser la que més s'ha sostingut és la referent als canvis en els patrons de fotoexposició, de forma que les exposicions agudes i intermitents, pròpies de l'època actual, incrementarien sobremanera el risc. Una millor eficiència dels recomptes del càncer en general no l'explica, doncs altres càncers estan minvant. Tampoc és justificable l'increment per major vigilància per part dels metges; si fos així, la incidència hauria de baixar a posteriori, a l'anar extirpant els tumors, cosa que no ha estat així. No s'ha demostrat tampoc que la depleció a la capa d'ozó expliqui aquest increment, tot i que aquest és un terreny més discutit. S'ha comprovat que els criteris anatomo-patològics a l'avaluar lesions pigmentades no han canviat per justificar un major nombre de diagnòstics actualment. Si fos així, la mortalitat no tindria per què haver augmentat, i sí ho ha fet. (Barnhill, 1993; Rigel, 1996; Rigel, 1997; van der Esch, 1991).

MORTALITAT.

El melanoma maligne cutani és la primera causa de mortalitat a Dermatologia. Constitueix l' 1% de les morts per càncer. L'augment de la incidència s'ha acompanyat també d'un increment en la mortalitat, encara que no tan gran, essent, darrera el càncer de pulmó, la neoplàsia maligna on més ha augmentat (Barnhill, 1993; Rigel, 1997; Koh, 1996).

La supervivència ha pujat en el decurs dels anys: el 1940, era del 40% als 5 anys; el 1975, del 67% als 5 anys, i el 1983, de 85% als 5 anys, al melanoma en estadi clínic I (Barnhill, 1993). Altres estudis fora els USA són una mica menys optimistes, com el d'Estrasburg, amb una supervivència als 5 anys del 68% (Lipsker, 1998) o el d'Escòcia, amb 71% als 5 anys (McKie, 1992).

FACTORS DE RISC PER AL MELANOMA MALIGNA CUTANI.

Latitud i exposició solar.

En valors absoluts, s'accepta que els dos terços de casos de melanoma es poden atribuir a excés d'exposició solar (Koh, 1996). Dintre un mateix país, està demostrada la correlació inversa de la incidència del melanoma amb la latitud. Quan la fotoexposició intensa es produeix en edats joves, s'incrementa més el risc. Per a una mateixa edat, produeix major risc l'exposició intensa i intermitent, pròpia de les activitats vacacionals i de lleure, que no la prolongada i contínua (Katsambas, 1996; Barnhill, 1993; McKie, 1998-I). Hi ha variants de melanoma en les que la relació amb la fotoexposició és menor o inexistent, com el melanoma nodular o el melanoma acral.

Evidències indirectes del paper de l'exposició solar a la gènesi del melanoma venen dels estudis on es demostra un major risc de melanoma als pacients tractats amb *PUVA* per a altres patologies, bé en diversos casos aïllats, bé en estudis més amplis (Stern, 1997).

Hi ha estudis que plantegen la possibilitat d'un major risc als usuaris dels *fotoprotectors*: la falsa sensació de seguretat indueix a un major temps d'exposició; a més, els fotoprotectors no poden bloquejar totalment els raigs UV-A, i poden produir una disminució de la síntesi de vitamina D, els metabolits de la qual inhibeixen el creixement *in vitro* de les cèl.lules de melanoma (Garland, 1992).

L'exposició a làmpares de sol artificial també s'ha demostrat de risc significatiu per al melanoma en alguns estudis, amb un risc relatiu respecte a la població de 1.88 a homes i 1.45 a dones (Walter, 1990). Fins i tot s'ha plantejat un possible risc a partir de l'exposició a làmpares de llum fluorescent (Walter, 1992), tot i que d'altres estudis no ho recolzen (McKie, 1998-I).

Fototipus.

EPIDEMIOLOGIA

És un factor de risc demostrat. El major risc és als fototipus baixos: cabell ros o roig, pell blanca o pàl·lida, ulls blaus o verds, tendència a l'aparició d'efèlides, tendència a eritema i cremada solar, poca capacitat de bronzejat i origen ètnic Nord-Europeu. El més important sembla ser el color del cabell (Barnhill, 1993). Algun estudi remarca que és més important el fototipus que no els hàbits de fotoexposició. Recolzen això estudis com el d'Algèria, on tot i ser una àrea molt assolellada, la incidència és baixa (Boudghene-Stambouli, 1997).

Els europeus del Sud ténen menor risc. El melanoma és un càncer propi de la raça blanca majoritàriament, tot i existir a d'altres races (de fet a la raça japonesa també està augmentant, essent en aquesta el melanoma més freqüent l'acral, que té molt poca relació amb la fotoexposició) (Kato, 1996).

Melanoma familiar.

El 6-12% de melanomes són familiars, essent la relació més sovint la de pare-fill. La naturalesa familiar del melanoma va ser detectada el 1952 per Cawley. Sembla ser que els pacients amb melanoma familiar presenten també un major nombre de nevi melanocítics, nevi displàstics, i major risc de melanomes cutanis primaris múltiples. El risc relatiu de melanoma múltiple vindria a ser de 337 respecte a la població general (Barnhill, 1993; Kamb, 1996; Marghoob, 1996).

Actualment hi ha una activitat molt gran a la investigació de les bases genètiques del melanoma. El gen més estudiat és el gen p16 o CDKN2A, situat al cromosoma 9p21, que actua com un gen supressor tumoral (Meyer, 1994; MacKie, 1998-II).

Nevi melanocítics.

Aproximadament un terç dels melanomes malignes cutanis apareixen sobre nevi melanocítics, congènits o adquirits. Malgrat discussions en molts aspectes, sembla clar que hi ha un risc, determinat principalment per la superfície total de nevi melanocítics, essent aquesta directament proporcional al risc de melanoma. Apart d'aquestes dades quantitatives, també n'hi ha de qualitatives, centrades sobretot en l'aspecte dels nevi, considerant-se de major risc els nevi displàstics o atípics (assimètrics, vores irregulars, heterocròmics i de diàmetre major de 6 mm).

Avui no se sap el paper exacte dels factors qualitatiu i quantitatiu. De tota manera, el 70% dels

melanomes no surten sobre un nevus melanocític previ. (Barnhill, 1993; McKie, 1998-I).

Sexe, factors reproductius i hormonal.

Hi ha un predomini al sexe femení, que es va perdent quan l'edat augmenta. S'havia defensat que els anticonceptius orals podrien incrementar el risc de melanoma, tot i que actualment es considera que aquest risc, si és que existeix, és mínim (Barnhill, 1993; McKie, 1998-I; Gefeller, 1998).

Miscel·lània.

Ocupació i estat social. Alguns estudis demostren que el risc és major a les classes socials altes, tot i possibles biaixos com la raça, diferents activitats vacacionals... (Barnhill, 1993; McKie, 1996).

Tints no permanents per al cabell. Un estudi lliga l'aparició del lentigo maligne amb l'ús d'aquest tipus de tints (Holman, 1993).

Levodopa. S'han aixecat dubtes teòrics sobre una possible relació entre l'administració de levodopa per a la malaltia de Parkinson i l'augment de risc del melanoma. Aquesta és una qüestió avui en dia no resolta, tot i que la seva rellevància no serà en tot cas mai molt gran. (Pfützner, 1997).

INTRODUCCIÓ.

ANGIOGÈNESI.

Concepte d'angiogènesi.

Es defineix *angiogènesi* com la neoformació de vasos sanguinis a partir d'altres vasos sanguinis o cèl.lules endotelials pre-existents. És diferent de la *vasculogènesi*, que consisteix en la formació de vasos sanguinis a partir de cèl.lules endotelials que han derivat del teixit mesenquimal (D'Amato, 1994). La vasculogènesi és pròpia de la vida embrionària, tot i que no exclusiva (Ribatti, 2003).

L'angiogènesi és pròpia de la vida embrionària i fetal. El terme angiogènesi va ser emprat per primera vegada el 1935 per a descriure la formació de nous vasos a la placenta (Folkman, 1987-I). A l'adult, l'angiogènesi és present de forma fisiològica a molt pocs processos, com el cicle menstrual, la curació de les ferides, la mamella alletant, el cicle del pèl i la resposta immune (Ribatti, 2002).

Hi ha situacions patològiques que generen angiogènesi. L'exemple més paradigmàtic és l'angiogènesi present al desenvolupament de les neoplàsies malignes. D'altres no relacionades amb el càncer serien els vasos col.laterals generats després de la isquèmia cardíaca, la neovascularització ocular a processos com la retinopatia diabètica, els hemangiomes infantils, el pannus vascular sinovial a les artritis, la psoriasi, l'úlcer duodenal, el botriomicoma, l'esclerosi sistèmica progressiva i l'arteriosclerosi (Folkman, 1995-I; Barnhill, 1987; Ribatti, 2002; Mazure, 2003).

La cascada angiogènica.

A l'angiogènesi, com a qualsevol altre procés fisiològic o patològic, s'esdevé una seqüència d'aconteixements, la cascada angiogènica, tots ells fonamentals per a la generació final dels nous vasos sanguinis. En resum (Figura 1) (Marcoval, 1998; Ríos, 1995; Pepper, 1996; Folkman, 1987-I), aquests aconteixements s'inicien amb vasodilatació i congestió dels vasos pre-existents. Posteriorment, aquests vasos s'elonguen i es converteixen en sinuosos. Llur membrana basal es dissol. Després de la seva dissolució, es produeix expansió de l'endoteli al teixit circumdant

INTRODUCCIÓ

mitjançant el desenvolupament de projeccions sòlides a partir de les cèl.lules endotelials. El pas següent és la transformació de les projeccions sòlides de les cèl.lules endotelials en veritables llums vasculars. Finalment, es produeix l'anastòmosi amb altres vasos i el desenvolupament de la circulació sanguínia, amb el restabliment de les membranes basals.

Moltes vegades el resultat final són vasos més tortuosos que els normals, les membranes basals no són completes, i resulten més permeables. Les diferències entre els vasos tumorals i els vasos normals són les següents: als vasos tumorals hi ha un gran recanvi o “turnover” de cèl.lules endotelials, hi ha més forats o “gaps”, el nombre de pericits és menor, l'organització és caòtica, hi ha anastòmosis arterio-venoses, la permeabilitat està augmentada, hi ha un cert grau de coagulació intravascular, la pO_2 és menor, i el pH és també menor (Pötgens, 1995-I).

Totes les passes intermitges d'aquesta cascada angiogènica venen regulades per diversos factors, estimuladors i inhibidors, l'equilibri dels quals és el que delimita el procés. Aquests factors reguladors els veurem amb detall més endavant.

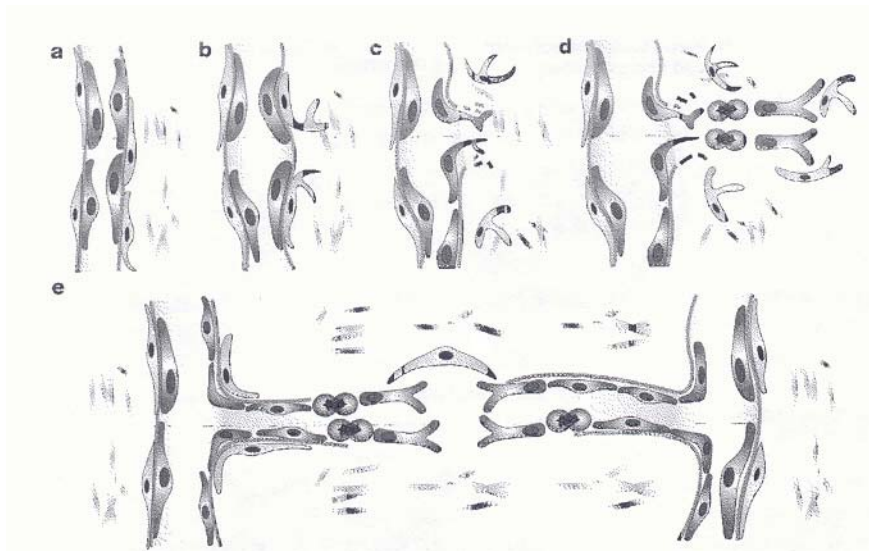


Figura 1: La cascada angiogènica: a) els neovasos sorgeixen a partir de vasos pre-existents; b) separació de pericits i dilatació vascular; c) migració de les cèl.lules endotelials a l'espai perivascular atretes per l'estímul angiogènec produït pel tumor; d) proliferació cel.lular endotelial; e) formació de nous llums vasculars, formació de noves membranes basals, fusió dels neovasos.

ANGIOGÈNESI I CÀNCER.

L'angiogènesi, o formació de vasos sanguinis a partir d'altres vasos pre-existents, és un pas imprescindible per al desenvolupament del càncer i les metàstasis (Folkman, 1989; Folkman 1990). Sense ella, el tumor no podrà créixer més enllà d'un determinat volum al mancar-li nutrients, i no tindrà capacitat per produir metàstasis al no poder accedir al torrent vascular. De fet, la hipòtesi que els tumors sòlids precisen de l'angiogènesi ha adquirit ja un paper central en oncologia (Leenders, 2002).

Aquesta dependència que ténen els tumors sòlids de l'angiogènesi, unida a la seva absència als teixits adults, han fet de l'angiogènesi un punt d'estudi molt important en la recerca antitumoral, doncs teòricament podriem incidir sobre el càncer sense afectar cap funció fisiològica vital, amb una toxicitat per tant molt baixa. Tots els tumors sòlids serien teòricament susceptibles de ser tractats amb aquest sistema, l'arribada del tractament seria més efectiva doncs la diana són els mateixos vasos sanguinis, i no existiria el risc teòric de mutacions que fessin la neoplàsia resistent, ja que l'endoteli no és el neoplàstic (Folkman, 1995-II; Hanahan, 1996, Hayes, 1999).

Moltes revisions donen gran èmfasi al paper de les estratègies antiangiogèniques en el futur del tractament del càncer (Folkman, 1995-I; Folkman, 1995-II; Arbiser, 1996; Le-Querrec, 1993; Bikfalvi, 1995; Folkman, 1987-I; Korpelainen, 1998; Hayes, 1999; Rosen 2002; Tosetti 2002).

Paper de l'angiogènesi a la cascada metastàtica.

Ja per al creixement del tumor primari, l'angiogènesi és fonamental. S'ha demostrat que per a què un tumor pugui créixer més enllà de 2 mm en qualsevol de les tres direccions, és necessària la formació de nous capil.lars sanguinis (Folkman, 1989; Galardy, 1994; Pötgens, 1995-I). Aquest volum correspon a 1 milió de cèl.lules (Folkman, 1995-II).

Per a poder metastatitzar, tot tumor necessita seguir 5 passes, repetitives a tot procés metastàtic (Figura 2) (Liotta, 1990; Poste, 1980):

INTRODUCCIÓ

- 1.- Angiogènesi
- 2.- Adhesió a la membrana basal vascular
- 3.- Proteòlisi local
- 4.- Migració dintre i fora la xarxa vascular
- 5.- Proliferació a les zones secundàries

1.- Angiogènesi.

Els capil·lars de nova formació sorgeixen de capil·lars o vènules pre-existents, mai d'artèries, arterioles o venes (Ríos, 1995).

La seqüència de l'angiogènesi ja ha estat comentada a la secció anterior (Folkman, 1987-I):

- 1.1.- Vasodilatació i congestió del llit vascular
- 1.2.- Elongació dels vasos amb canvis estructurals
- 1.3.- Dissolució de la membrana basal vascular
- 1.4.- Formació de brots endotelials (“sprouting”) al teixit circumdant
- 1.5.- Migració distal de les projeccions sòlides de l'endoteli amb mitosis proximals
- 1.6.- Formació de llums a través de mecanismes intra i extracel·lulars
- 1.7.- Anastòmosis amb altres brots endotelials
- 1.8.- Desenvolupament de la circulació
- 1.9.- Maduració i evolució

2.- Adhesió de la cèl·lula tumoral a la membrana basal vascular.

Una vegada produïts els neovasos, la cèl·lula tumoral s'ha d'adherir a l'endoteli. Aquesta adhesió ocorre a través de diverses proteïnes, com per exemple col·làgen IV, fibronectina i laminina (Ríos, 1995).

3.- Proteòlisi local.

A l'adhesió a l'endoteli, li segueix la proteòlisi; aquesta proteòlisi està regulada per la producció d'enzims degradadors, segregats per la cèl·lula endotelial durant l'angiogènesi. Aquests enzims es poden catalogar segons l'especificitat de substrate, com les col·lagenases intersticials, gelatinases

i estromelisinés. La presència d'aquests enzims li proporciona al tumor una major capacitat invasiva, i la seva absència pot aturar la capacitat metastàtica (Ríos, 1995). Els mateixos factors angiogènics poden provocar la major expressió d'aquests enzims, o bé una disminució dels inhibidors.

4.- Migració dintre i fora la xarxa vascular.

Una vegada la cèl.lula tumoral ha assolit el torrent vascular, pot produir metàstasis de forma selectiva a algun òrgan concret, de forma no selectiva o aleatòria, o bé per proximitat anatòmica, cadascuna d'elles regulada per diferents mecanismes (Ríos, 1995).

5.- Proliferació a les zones secundàries.

És el darrer pas a la cadena metastàtica. No tota cèl.lula tumoral és capaç d'assolir-lo. Precisa de la presència de factors de creixement locals, la sensibilitat de les cèl.lules tumorals a aquests, la producció de factors autocrins, i la capacitat de produir angiogènesi (Folkman, 1995-I; Zetter, 1990; Fidler, 1996).

Així, si examinem les passes de la cascada metastàtica, comprovarem que l'angiogènesi és fonamental a totes elles, ja des de la limitació al creixement tumoral primari, passant per controlar el pas de les cèl.lules tumorals al torrent sanguini, fins a delimitar la capacitat de supervivència als llocs d'implantació secundaris (Folkman, 1995-I).

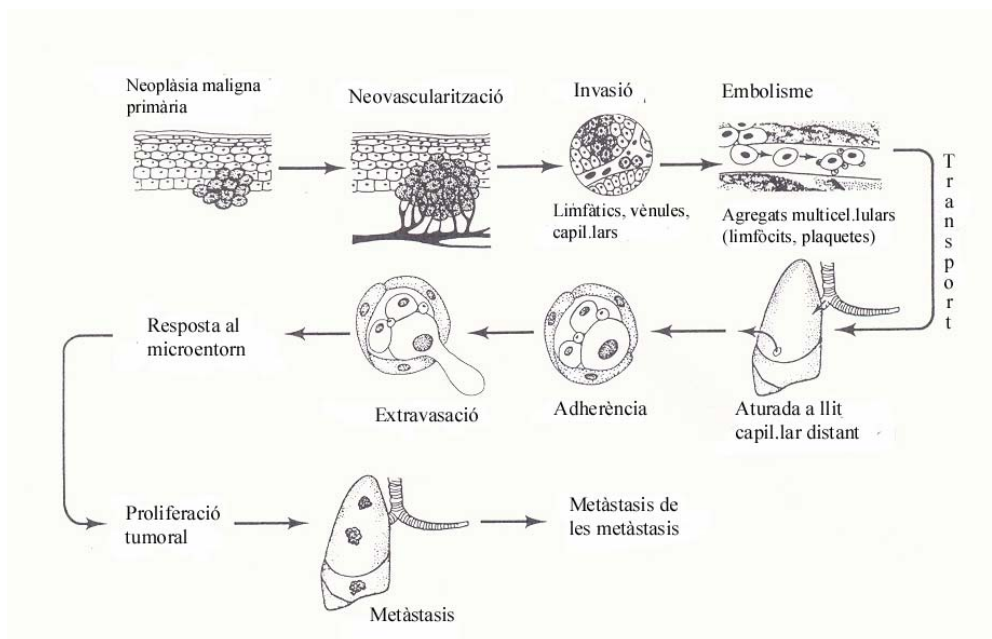


Figura 2: La cascada metastàtica.

L'Angiogènesi i el "switch" o "interruptor" o "eclipsi" maligne.

El principi que l'angiogènesi és essencial per a la ràpida expansió de la massa tumoral, va aixecar una sèrie de qüestions: quan s'activa l'angiogènesi durant la tumorigènesi? És simplement una conseqüència inevitable que acompanya el creixement tumoral, o més aviat hi ha un "interruptor" angiogènic que quan es dispara permet el desenvolupament tumoral? (Hanahan, 1996). Per tots és conegut un fenomen que eventualment s'observa al càncer, i és que ocasionalment una neoplàsia pot permanèixer estable o "adormida" (Folkman, 1995-I) durant períodes prolongats de temps, tot i tenir la teòrica maquinària molecular suficient per desenvolupar les metastasis. En un moment donat, la neoplàsia es "desperta" i adquireix els atributs necessaris per desenvolupar metastasis. És el que s'ha vingut a denominar "switch" o "gallet" o eclipsi maligne.

Hi ha diferents teories que intenten explicar aquest estat "adormit" (Fidler, 1994). Controlar aquests mecanismes ens podria proporcionar una major comprensió i una arma amb la que, si bé no podríem curar el càncer, sí el podríem retre aturat.

Una de les teories amb més base actualment per explicar aquest eclipsi és l'angiogènica: en el moment que un tumor primari desenvolupa capacitat angiogènica, podria iniciar la cascada metastàtica ja sense impediments. Hi ha diferents evidències experimentals que recolzen això (Fidler, 1994; Folkman, 1995-I; Skobe, 1997). La progressiva acumulació d'alteracions genètiques durant la progressió tumoral es veu acompanyada de forma paral·lela per un canvi en la competència angiogènica de les cèl·lules tumorals, resultant en un canvi fenotípic consistent amb una major agressivitat i capacitat invasiva (Rak, 1996).

Igualment com un tumor primari pot restar en estat adormit, també ho poden fer les metastasis. De fet hi ha molts tumors que fan metastasis tempranes, però aquestes permaneixen amagades fins i tot durant anys. Hi ha moltes teories per explicar-ho (Fidler, 1994), i alguns estudis recolzen fortament que la presència de factors antiangiogènics circulants té un paper més que rellevant al manteniment d'aquest estat adormit. Interessantíssim en aquest sentit és l'estudi d'O'Reilly i cols. el 1994. Els autors ens recorden el fenomen que eventualment es produeix, i és que un tumor primari pot inhibir les seves pròpies metastasis, de forma que al desaparèixer el primari, les

metàstasis comencen a créixer (és a dir, les manté quiescents o "adormides"). En el seu estudi demostren, amb el càncer de pulmó de Lewis xenoempeltat a ratolins atímics, que el tumor primari produeix un pèptid que és el que actua d'inhibidor de les metàstasis; no evita que aquestes es produeixin, però sí que creixin; aconseguen aïllar-lo, i l'anomenen *Angiostatina*. Demostren que, injectat endovenós, inclús en absència ja del tumor primari, l'angiostatina inhibeix el creixement de les metàstasis mitjançant inhibició de l'angiogènesi, sense alterar l'activitat mitòtica de les cèl.lules tumorals. Analitzat, l'angiostatina resulta ser un fragment intern del plasminogen. Així, donen un gran recolzament a la teoria angiogènica sobre el seu paper al creixement de les metàstasis.

D'altres estudis (Holmgren, 1995) demostren que l'estat adormit és per la combinació de la presència d'agents antiangiogènics junt a una major taxa d'apoptosi a les micrometàstasis, essent aquesta taxa d'apoptosi dependent de la presència d'aquests agents antiangiogènics.

Angiogènesi i càncer: Estudis observacionals.

Ja hem vist que l'angiogènesi és fonamental des del punt de vista fisiopatològic a la cascada metastàtica. Ja ha estat comentat també el paper significatiu de l'angiogènesi a l'eclipsi invasor i metastàtic. Igualment, a la literatura mèdica hi ha un gran volum de publicacions que lliguen l'angiogènesi amb multiplicitat de neoplàsies malignes.

Així, per exemple, Weidner i cols. (1991), estudiant el *càncer de mamella* humana, correlacionen la presència d'angiogènesi amb el pronòstic. Bosari i cols. (1992), també al *càncer de mamella* humana, van més enllà, trobant no solament correlació entre angiogènesi i estadiatge, i entre angiogènesi i metàstasis posteriors al seguiment, sinó que demostren que l'angiogènesi és un factor independent predictiu del pronòstic.

Al cas del *melanoma*, tots els autors semblen estar d'acord amb la presència d'angiogènesi en aquest tumor, tot i que és debatuda la seva significació pronòstica (Busam, 1995; Marcoval, 1996).

Bossi i cols. (1995) estudien *càncer de còlon*, comparant-lo amb els adenomes i el còlon normal. No troben que l'angiogènesi correlacioni amb el pronòstic, però sí demostren la presència d'angiogènesi, defensant que el seu paper és més important a les fases tempranes de la malaltia.

Tahan i cols. (1995) demostren la presència d'angiogènesi al *carcinoma escatós de llavi*, tot i que en el seu estudi no correlaciona amb el pronòstic.

INTRODUCCIÓ

Pötgens (1995-I), en una revisió, enumera els diferents tumors on s'ha correlacionat la presència d'angiogènesi amb el pronòstic: melanoma, *pròstata*, mamella, *germinals*, *pulmó no cèl.lula petita*, i *cerebrals*.

Moltes altres revisions incideixen en la relació demostrada entre angiogènesi i càncer i angiogènesi i pronòstic (Folkman, 1995-II; Craft, 1994).

D'altra banda, també hi ha moltes publicacions que estudien la relació entre el grau de disseminació d'un càncer i la presència de factors angiogènics en el sèrum dels pacients. En general, la presència del factor angiogènic en sang perifèrica és indicador del grau de disseminació del tumor, i per tant del pronòstic (Fukisaki, 1998; Dirix, 1997).

Angiogènesi i càncer: Estudis experimentals.

Paral·lelament a les diferents observacions que s'han anat fent, s'ha anat consolidant també experimentalment el coneixement de l'angiogènesi tumoral en múltiples estudis. Així, diversos estudis amb factors afavoridors de l'angiogènesi han demostrat un avantatge per al creixement tumoral. Per exemple, Bonfil i cols. (1994), evidencien que el Matrigel (un complex proteic conegut pel seu paper estimulador del creixement tumoral), incrementa el creixement tumoral mitjançant mecanismes angiogènics. Fridman i cols. (1991) demostren que tumors injectats a ratolins immunodeprimits, que normalment no reeixirien, al coinjectar-los amb Matrigel sí creixen i sobreviuen. Topley i cols (1993), publiquen quelcom similar.

Encara són més els estudis que, amb diverses estratègies antiangiogèniques, aconsegueixen inhibir el creixement tumoral, donant més força als tractaments antiangiogènics al camp de l'Oncologia. A títol d'exemple en podem comentar alguns:

Davies i cols (1993) aconsegueixen inhibir el creixement de *càncer d'ovari* humà xenoemplantat a ratolins atímics amb el batimastat, un inhibidor de metal·loproteïnases i de l'angiogènesi. Recordem que les metal·loproteïnases són enzims degradadors de la matriu extracel·lular, imprescindibles per a què un tumor pugui envair els teixits a on està situat. Wang i cols. (1994) aconsegueixen el mateix en un model de *càncer de còlon* humà implantat al còlon de ratolins atímics.

Ensoli i cols. (1994), inhibeixen el creixement del *Sarcoma de Kaposi* humà mitjançant manipulació genètica, introduint en antisentit el gen d'un factor de creixement vascular, en concret el bFGF (factor de creixement fibroblàstic bàsic).

Millauer i cols. (1994), en una línia de *glioblastoma multiforme*, aconsegueixen inhibir l'angiogènesi i el creixement mitjançant la inhibició del sistema VEGF/flk-1, sistema fonamental a l'angiogènesi de la majoria de tumors, com ja veurem més endavant.

Teicher i cols. (1994), utilitzant el TNP-470 junt a minociclina, tots dos coneguts com a antiangiogènics, combinats amb ciclofosfamida, aconsegueixen major activitat antitumoral i supervivència en animals xenoempeltats amb línies de *fibrosarcoma* i de *càncer de pulmó de Lewis*. Holmgren i cols (1995) mantenen les metàstasis de fibrosarcoma, carcinoma de pulmó de Lewis i *melanoma* en estat quiescent amb el TNP-470.

Fotsis i cols. (1994) inhibeixen l'angiogènesi i el creixement tumorals amb un metabolit estrogènic endogen, el 2-metoxiestradiol.

Angiogènesi i càncer: dels models experimentals a l'aplicació clínica.

La investigació mèdica, partint de l'observació del fenomen angiogènic, ha desenvolupat múltiples models experimentals en animals per a demostrar no tan sols el seu paper patogènic, sinó també la seva aplicabilitat terapèutica. Hi ha un cert optimisme, inclús entusiasme, degut d'una banda a la multiplicitat teòrica de dianes per als tractaments antiangiogènics (llogands circulants, receptors tirosin-kinases, integrines, marcadors d'adhesió cel.lular, proteases) front l'escàs nombre de dianes de la quimioteràpia convencional (DNA, topoisomerases, microtúbuls) (Sledge 2002-I), i de l'altra a l'enorme quantitat d'agents antiangiogènics que han anat sortint els darrers anys i el seu èxit en models animals.

Hi ha de fet al moment actual múltiples agents antiangiogènics en assaigs clínics per al càncer (es pot trobar a: www.angio.org). No solament això, sinó que a molts dels agents quimioteràpics en us actualment se'ls ha descrit activitat antiangiogènica: alquilants (ciclofosfamida, edelfosina, estramustina, melfalan), antimetabolits (5-fluorouracil, metotrexate, mercaptopurina, UFT, tegafur, uracil, citarabina), antibiòtics (bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, mitoxantrone), inhibidors de la topoisomerasa (camptotecina, irinotecan, etopòsid, topotecan), taxans (docetaxel, paclitaxel) i alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina) (Ribatti, 2002).

Malgrat tot, la complexitat inherent a l'aplicació en oncologia humana, la manca de coneixement d'esquemes de dosificació i administració ideals, l'escàs domini dels perfils angiogènics dels diferents tumors i els mecanismes de fugida dels tractaments antiangiogènics ja descrits en alguns

INTRODUCCIÓ

tumors dificulten l'aplicabilitat. De fet, no hi ha encara en el moment actual cap tractament antiangiogènic aprovat com a tal per al seu us al càncer (www.angio.org).

Un dels futurs terapèutics pot ser el que s'ha vingut a denominar "teràpia metronòmica": petites dosis, administrades de forma prolongada, amb intenció "angiostàtica". No es tracta d'eliminar metàstasis ja presents, sinó d'evitar que aquestes creixin, tornant el càncer una malaltia crònica, controlable. Aquí radica una de les dificultats fonamentals dels assaigs clínics: els "endpoints" dels assaigs no són la tradicional reducció del volum tumoral com a la quimioteràpia convencional, sinó la supervivència i la reducció de l'activitat angiogènica, en malalts amb poc volum tumoral residual ("tumor burden") (Sledge 2002-I; Herbst 2002; Rosen 2002; Tosetti 2002).

A la següent taula, podem veure la multiplicitat d'agents en assaig clínic per al càncer, demostrant el gran interès que el tema desperta.

A6	Ac anti-integrina $\alpha 5\beta 1$	ABT-510
Actimid	Angiocol	Angiostatina
Angiozima	Aplidina	Aptosyn
ATN-161	Avastin (bevacizumab)	AVE8062A
Benefin	BMS275291	Carboxiamidotriazol
CC4047	CC7085	CDC801
Celecoxib	CEP-7055	CGP-41251/PKC412
Cilengitida	Combrestastatin A4P	CP-547, 632
CP-564, 959	Dexrazoxane	Didemnina B
DMXAA	EMD 121974	Endostatina
Flavopiridol	GBC-100	Genisteïna
Extracte de Tè Verd	Interleukina 12	INGN 201
Interferon alfa	Iressa	LY317615
Ac monoclonal huJ591	Medi-522	Suramina
Metastat (Col-3)	Neovastat	NM-3
NPe6	Octreotide	Oltipraz
Paclitaxel	Panzem (2ME2)	Penicil.lamina
PI-88	PSK	PTK787/ZK222584
Revimid	Ro317453	Squalamine
SU11248	SU6668	Temptostatina

Tetrathiomol	Thalomid	UCN-01
VEGF Trap	Vioxx	ZD6126
ZD6474		

Agents antiangiogènics actualment en assaig clínic per al càncer (font: www.angio.org, juny 2004).

ANGIOGÈNESI I MELANOMA.

L'angiogènesi i el "switch" o eclipsi maligne al melanoma maligne cutani.

Ja hem parlat al capítol anterior del “switch” o eclipsi maligne: un tumor localitzat / temprà, a partir d'un moment donat, i gràcies a l'adquisició d'un nou fenotip concret, tindrà la capacitat d'envair i de produir metàstasis. Aquest fenomen també s'ha estudiat al melanoma maligne cutani (Denijn, 1993; Kerbel, 1996; Du Pont Guerry, 1998). De tots és sabut que els melanomes cutanis primaris amb un nivell de Breslow menor de 0.76 mm ténen una probabilitat molt baixa de fer metàstasis. S’han suggerit raons anatòmiques, per la dificultat que té un melanoma d'aquesta mida per arribar als vasos sanguinis.

Malgrat tot, les raons anatòmiques no són suficients: melanomes de fet més primers poden fer metàstasis, i d’altres molt més gruixuts poden no haver-les produït. L'adquisició d'aquest fenotip metastàtic coincideix amb un canvi substancial en la capacitat de producció d'algunes citocines, mentre que d'altres factors reguladors o supressors desapareixen. Una de les adquisicions que dóna el fenotip metastàtic és la capacitat d'induir angiogènesi tumoral (Folkman, 1987-II; Kerbel, 1996; Marcoval, 1997). En aquest eclipsi maligne no hi entra només l'angiogènesi; Rak i cols. (1994) demostren com les cèl.lules de melanoma, conforme avança la progressió tumoral, van canviant llur fenotip de forma que progressivament perden la sensibilitat als inhibidors del creixement tumoral derivats de l'endoteli.

Barnhill i cols. (1992) demostren que l'angiogènesi ja és present a fases tan tempranes com al

INTRODUCCIÓ

melanoma "*in situ*", podent així aquesta angiogènesi intervenir a l'eclipsi maligne. De fet, el seu estudi valora la presència d'angiogènesi des del nevus melanocític normal, passant pel nevus displàstic, el melanoma "*in situ*", el melanoma invasor, i fins a les metàstasis. Troben cada vegada més angiogènesi, conforme s'avança a cada pas (tot i que no fan cap estudi pronòstic). En certa manera demostren "gràficament" que l'angiogènesi acompanya el melanoma ja de seguida que el seu fenotip es torna maligne i invasor, probablement tenint-hi un valor ja a les fases tempranes de la malaltia.

El mateix grup de treball (Barnhill i cols, 1998) demostra que en les micrometàstasis ganglionars de melanoma l'angiogènesi és menor al comparar-la amb les macrometàstasis. La manca d'angiogènesi seria el que provocaria l'estat adormit de les micrometàstasis segons els autors.

Angiogènesi i melanoma: Estudis observacionals.

Tots els autors semblen acceptar actualment una relació entre el melanoma maligne cutani primari humà i l'angiogènesi. Ja ha estat comentat que l'angiogènesi és imprescindible per al creixement del tumor primari més enllà d'un volum concret i per al desenvolupament de les metàstasis. És molt interessant l'article de Barnhill i cols (1992) comentat a la secció anterior.

El que no queda clar és si el grau d'angiogènesi pot servir com a valor pronòstic (Craft, 1994). El nostre mateix grup de treball va efectuar un estudi de supervivència al melanoma maligne introduint la densitat vascular com a variable en un estudi multivariant (Marcoval, 1996). Es demostrava la presència d'angiogènesi en el melanoma, però sense trobar correlació amb la supervivència.

Ja tan lluny com el 1983, Marasà i cols. (1983) correlacionen l'angiogènesi amb el curs clínic al melanoma cutani primari humà. Aquests primers indicis es veuen reforçats per d'altres estudis, com els de Srivastava i cols. en dues ocasions (1988; 1989) i el de Fallowfield i cols. (1991), defensant tots l'angiogènesi com de gran valor pronòstic. Malgrat tot, no tots els estudis posteriors confirmen el paper pronòstic de l'angiogènesi, tot i seguir acceptant el seu paper a la progressió tumoral al melanoma. Mentre alguns autors no troben correlació entre angiogènesi i pronòstic al melanoma (Carnochan, 1991; Busam, 1995; Marcoval, 1996) altres segueixen defensant el seu valor pronòstic (Folberg, 1992; Vacca, 1993; Folberg, 1993; Graham, 1994).

També hi ha estudis adreçats a explorar el paper de l'angiogènesi al "switch" o eclipsi maligne al melanoma. Srivastava (1986), mitjançant estudi de fluxometria amb Doppler, demostra que la majoria de melanomes amb Breslow de més de 0.9 mm ténen flux detectable, mentre que és

habitualment absent als més primers; la interpretació que se'n pot fer (Folkman, 1987-II) és que aquells melanomes incipients que s'han fet més gruixuts han estat capaços de generar angiogènesi, podent d'una banda nodrir-se millor i de l'altra metastatitzar amb facilitat. En un moment encara més temprà de la tumorigènesi, en concret en el pas de la fase radial a vertical, el nostre grup de treball (Marcoval, 1997) i altres (Erhard, 1997) han demostrat que en el melanoma maligne cutani primari humà el pas de fase radial a vertical s'associa amb l'aparició d'angiogènesi: la densitat microvascular a la base del tumor era significativament superior en els melanomes amb fase de creixement vertical respecte aquells en creixement radial (Marcoval, 1997).

Angiogènesi i melanoma: Estudis experimentals.

Igual que a d'altres tumors, diversos experiments *in vitro* i *in vivo* han demostrat que, alterant l'angiogènesi, podem alterar el comportament del melanoma maligne.

Fridman i cols. (1991), coinjectant melanoma amb Matrigel (complex proteic estimulador de l'angiogènesi), demostren un major creixement tumoral per l'efecte angiogènic del Matrigel. Kibbey i cols. (1992) aconseguen també estimular el creixement i vascularització al coinjectar a ratolins una línia de melanoma junt a un pèptid angiogènic conegut.

Zabrenatzky i cols. (1994) troben que la presència d'una proteïna inhibidora de l'angiogènesi, la *Trombospondina*, correlaciona amb un fenotip menys maligne al melanoma. Jansen i cols. (1995), amb una estratègia antisentit anti-factor de creixement vascular (bFGF) aconseguen també inhibir el creixement tumoral i l'angiogènesi. Holmgren i cols. (1995) inhibeixen amb TNP-470, un inhibidor de l'angiogènesi, el creixement de les micrometàstasis pulmonars de melanoma post-extirpació del tumor primari. Wang i cols. (1997) redueixen el creixement i inclús fan regressar melanomes amb un tractament antisentit anti-bFGF i anti-receptor pel bFGF, de forma semblant a Jansen i cols. el 1995.

Angiogènesi i melanoma: aplicació clínica.

INTRODUCCIÓ

Al càncer en general ja hem vist que hi ha un nombre considerable d'assaigs clínics antiangiogènics. Al cas del melanoma, podem recordar que l'únic tractament adjuvant aprovat per a la malaltia en estadis avançats és l'interferó α . Entre els mecanismes d'acció de l'interferó hi figura una activitat antiangiogènica demostrada (Fidler, 1994; Folkman, 1995-II).

Actualment hi ha al melanoma diversos assaigs basats en agents antiangiogènics (troable a: <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/>): carboxiamidotriazol, marimastat, prinomastat, talidomida, hidralacina + interferó α , suramina, bevacizumab, SU5416.

LES BASES MOLECULARS DE L'ANGIOGÈNESI.

L'angiogènesi és fonamental tant per a la progressió tumoral com per a la formació de metàstasis. Aquest fet s'ha demostrat a molts tipus de tumors, entre ells el melanoma maligne cutani.

L'angiogènesi ve regulada a nivell molecular per una sèrie de factors, l'efecte dels quals provoca la neoformació de vasos sanguinis. Aquests factors són múltiples, i poden actuar com a activadors o inhibidors, alguns de forma directa incidint sobre els vasos sanguinis, i d'altres indirectament, influïnt sobre d'altres factors. El balanç del complicat equilibri entre uns i altres donarà com a resultat final aquesta angiogènesi o la seva inhibició (Figura 3) (Fidler, 1994; Folkman, 1995-I; Pepper, 1996):

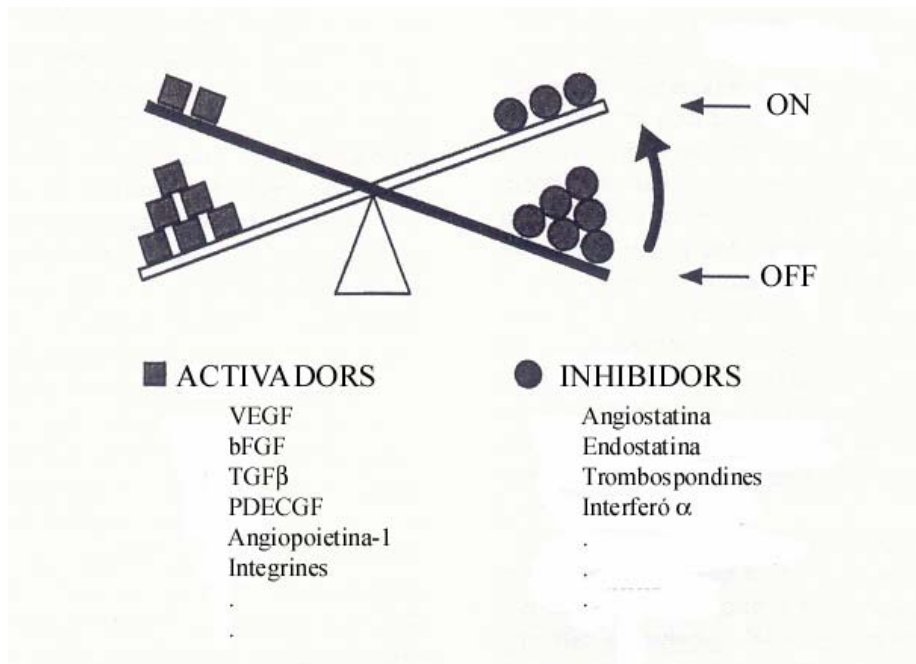


Figura 3: el balanç angiogènic, resultat de l'equilibri de forces entre factors pro i anti-angiogènics.

Per entendre l'angiogènesi i plantejar-se d'actuar sobre ella, és imprescindible l'estudi i coneixement d'aquests factors. Continuadament se'n descriuen de nous, i la importància real de cadascun d'ells és difícil de determinar. A cada tumor es descriuen diferents factors (Wellstein, 1996): cada tumor té el seu particular "perfil angiogènic" (Fidler, 1994); com a exemple, Relf i cols, el 1997, descriuen al càncer de mamella primari humà els següents factors angiogènics, cadascun amb el seu paper: VEGF, aFGF, bFGF, TGF β-1, PDEC GF, PlGF i Pleiotropina. Descripcions com la de Relf ens demostren la complexitat del procés angiogènic a nivell molecular.

El factor angiogènic que més interès ha despertat, reconegut en el moment actual com el principal, és el factor de creixement de l'endoteli vascular (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF), eix d'aquesta Tesi Doctoral.

AGENTS ANGIOGÈNICS.

El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF).

Avui en dia es considera el principal factor angiogènic per diversos motius. Molts dels altres factors pro i antiangiogènics, de fet, el que fan és influenciar indirectament en el VEGF més que en l'angiogènesi pròpiament. Serà àmpliament tractat més endavant.

El factor de Creixement Fibroblàstic – Fibroblast Growth Factor (FGF).

El factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF) és dels que ténen més implicacions a l'angiogènesi (Bikfalvi, 1995). La família dels FGF està constituïda per nou membres als mamífers. Els prototípics són el FGF 1 (àcid) i el FGF 2 (bàsic). Està demostrada la seva activitat angiogènica fisiològica al desenvolupament fetal i la curació de ferides. Són mitogènics, modulen la motilitat cel.lular, la diferenciació, l'extensió de les neurites i la supervivència cel.lular. No se sap com es secreten, sembla que ho fan quan el plasmalemma està compromès, com per exemple en situacions de dany cel.lular / necrosi tissular. De tota manera, s'han descrit altres mecanismes secretors, com l'alliberament per shock amb calor (Mason, 1994).

Els seus receptors són tirosin-kinases transmembrana. En interaccionar amb el FGF 2, aquests s'activen mitjançant dimerització, fet que resulta en llur autofosforilació i posterior reclutament de proteïnes de senyal intracel.lulars. A nivell intracel.lular, s'han descrit interaccions entre els receptors del FGF i la fosfolipasa C- γ , la subunitat reguladora de la fosfatidilinositol-3-quinasa, Shc, Grb-2 i Tyr-461; l'especificitat de la resposta a l'activació d'un receptor serà determinada per la suma de dominis SH2, per altres molècules citoplàsmiques de senyal que puguin ser reclutades, pels patrons d'expressió específics de teixit i per l'antagonisme de tirosin-fosfatases intracel.lulars. S'ha vist també que els receptors ténen funcions al nucli, doncs s'hi han trobat, i s'ha vist que al cicle cel.lular el pas de G0 a G1 coincideix amb l'entrada de FGF al nucli. Al desenvolupament, ténen un paper fonamental, per exemple, a la formació del mesoderm, a la diferenciació del sistema nerviós central, a la formació de l'arbre bronquial i de la pròstata (Mason, 1994).

Hi ha un gran nombre d'estudis que recolzen el seu paper fonamental a l'angiogènesi. Fallon i cols. (1994) demostren que el FGF-2 (bFGF) és el principal candidat per al creixement de l'extremitat durant la seva formació. A partir dels seus estudis, D'Amato i cols. (1994) postulen que el mecanisme teratogènic de la talidomida podria ser aquest, doncs demostren que la

talidomida és antiangiogènica via inhibició de l'angiogènesi induïda pel FGF. El bFGF, aplicat damunt d'una ferida, la fa epitelitzar més de pressa. S'ha demostrat que a l'acondroplàsia hi ha un defecte al receptor de tipus 3 per al bFGF (Arbiser, 1996). Ensoli i cols. (1994) demostren el paper fonamental del bFGF a l'angiogènesi al Sarcoma de Kaposi. Reed i cols. (1994) observen la seva major presència al melanoma maligne cutani humà invasiu en comparació al melanoma “*in situ*” i al nevus melanocític. Asahara i cols. (1995) demostren que l'activitat angiogènica del VEGF es veu incrementada de forma sinèrgica quan a més hi és present el bFGF.

El bFGF era el millor candidat com a factor angiogènic principal (Folkman, 1987-I), fins que es va descriure el VEGF. El principal problema és que no té un pèptid senyal hidrofòbic requerit per al transport extracel·lular d'acord amb les vies secretòries clàssiques: és segrestat dintre les cèl·lules, i no té accés aparent a les cèl·lules diana (Leung, 1989; Jayson, 1994; Pepper, 1996). De tota manera, s'han proposat alguns models d'alliberament de FGF: després del dany cel·lular, en alguns tumors s'esdevé mort cel·lular i necrosi en certs estadis, i per aquesta via els FGF podrien arribar a les cèl·lules endotelials (Bikfalvi, 1995). Hi ha d'altres arguments que fan desestimar el bFGF com a principal factor angiogènic (Pepper, 1996): estimula altres cèl·lules apart de les endotelials i, sobretot, el fet que hi ha receptors per a ell en alguns teixits normals, però no a la microvasculatura de teixits on hi ha molta angiogènesi.

El Matrigel.

El Matrigel no és un compost que existeixi com a tal als éssers vius, però està constituït per elements presents a les membranes basals imitant els seus efectes, resultant així un model experimental d'aquestes. Els darrers anys s'ha començat a descriure el paper de les membranes basals a la regulació del procés angiogènic (Kalluri, 2003).

El Matrigel és un complex proteic constituït fonamentalment per laminina, entactina, col·lagen IV i heparan sulfat. Aquests són components presents a les membranes basals, i de fet l'aspecte del Matrigel al Microscopi Electrònic és similar a una membrana basal. D'aquests constituents, el que exerceix més funcions és la laminina. De fet, el nombre de receptors que ténen les cèl·lules tumorals per a la laminina correlaciona amb la capacitat metastàtica. El Matrigel, quan és coinjectat amb tumors, afavoreix el seu creixement, o bé aconseguix que es desenvolupin tumors que inoculats sols no serien capaços de fer-ho (Fridman, 1991; Topley, 1993).

Hi ha diverses teories que intenten explicar aquest efecte afavoridor del creixement tumoral per

INTRODUCCIÓ

part del Matrigel: la consistència del gel adquirida per la temperatura de l'hoste una vegada inoculat permetria l'ensamblatge de les cèl.lules tumorals; això augmentaria la concentració de factors de creixement, que podrien actuar de forma autocrina; alternativament, components majors de les membranes basals com la laminina, col.lagen IV, entactina, fibronectina i heparan sulfat, a l'interaccionar amb les cèl.lules tumorals, poden estimular el creixement; també el matrigel condiciona una protecció contra el sistema immunològic per la dificultat d'arribar a les cèl.lules tumorals (Topley, 1993; Bonfil, 1994); de tota manera, la que té més acceptació és la teoria angiogènica (Bonfil, 1994), segons la qual la major tumorigenicitat és per un efecte estimulador de l'angiogènesi.

El Factor de Creixement Transformador β (Transforming Growth Factor β - TGF β).

És un membre de la superfamília de les citocines TGF β , que comprèn més de 25 membres. Hi ha 3 tipus descrits als mamífers, i 3 receptors descrits també als mamífers. Un dels seus receptors és l'endogleïna (CD 105), agent angiogènic recentment descrit amb importància pronòstica en alguns tumors (Duff, 2003). Les cèl.lules endotelials expressen TGF β com a precursor inactiu, en forma d'homodímer junt a dos propèptids; el gran pes molecular d'aquest complexe no li permet interaccionar amb el receptor. Per a esdevenir actiu, el TGF β ha de ser activat al medi extracel.lular. Per a aquesta activació, el complex ha d'interaccionar amb les superfícies cel.lulars i amb proteases. L'activació del complexe es pot dividir en dos mecanismes, un plasmina-depenent, i l'altre plasmina-independent (Rifkin, 1993; Bikfalvi, 1995).

L'angiogènesi induïda pel bFGF i el VEGF es veuen influïdes per la presència de TGF β -1. Diferents concentracions de TGF β -1 incrementen o decrementen aquesta angiogènesi, en un efecte bifàsic (Pepper, 1996). Aquest efecte bifàsic és degut d'una banda a què les cèl.lules endotelials estimulades per factors angiogènics, com el FGF 2, augmenten la producció de TGF β per la via plasmina-depenent, i de l'altra a què els nivells alts de TGF β incrementen els nivells d'inhibidor de l'activador del plasminogen (Bikfalvi, 1995). Així, a baixes concentracions és angiogènic, i a altes concentracions antiangiogènic.

De fet, tots els estudis recolzen la seva activitat angiogènica de forma indirecta regulant els altres factors angiogènics directes (Pertovaara, 1994; Bikfalvi, 1995; Arbiser, 1996; Kim, 1998-I).

Angiogenina.

És una proteïna, amb certa activitat RNAsa (necessària per a l'angiogènesi), de la que no es coneix exactament el mecanisme d'acció, a la que se li ha demostrat activitat angiogènica indirecta o permissiva (Arbiser, 1996; Folkman, 1987-I; Passaniti, 1992; Fidler, 1994; Folkman, 1995-II). Inicialment es va aïllar del medi condicionat d'una línia d'adenocarcinoma humà, i posteriorment s'ha trobat present a molts teixits i amb l'envelliment (Arbiser, 1996).

Factor de Necrosi Tumoral α (Tumor Necrosis Factor α - TNF α).

Tot i inhibir *in vitro* el creixement cel.lular endotelial, *in vivo* és proangiogènica, encara que lleugerament. Es pensa que ho fa indirectament, induïnt la producció de reguladors positius (Pepper, 1996; Folkman, 1995-II) i per la inducció d'inflamació secundària (D'Amato, 1994). Augmenta, entre altres, la producció de bFGF (Ríos, 1995).

Angiopoietina-1.

La seva importància queda remarcada sobretot pels seus receptors tirosin-kinasa Tie-1 i Tie-2. Estudis amb ratolins "knockout" demostren que l'absència de cadascun d'aquests receptors porta a la letalitat, a l'igual com passa amb els receptors per al VEGF. El Tie-2 juga un paper a l'organització tridimensional vascular, i el Tie-1 està implicat a l'intercanvi de fluids entre els capil.lars (Sledge 2002-I, Liu 2002). Existeix també l'Angiopoietina-2, que té un 60% d'homologia amb l'Angiopoietina-1, i que actua com a antagonista: desestabilitza els vasos madurs desplaçant l'Angiopoietina-1 del Tie-2 (Bhushan, 2002).

Els macròfags.

Intervenien a diferents moments de l'angiogènesi, tant inflamatòria com tumoral, gràcies al seu repertori de productes secretats, entre els que es troben el VEGF i el bFGF (Sunderkotter, 1994).

Els mastocits.

Els mastocits són pro-angiogènics amb múltiples vies d'actuació: secreten directament VEGF, bFGF, TGF β , TNF α i IL-8. Secreten proteinases i heparina; l'efecte d'aquestes proteinases és alliberar factors pro-angiogènics lligats a l'heparina a les superfícies cel·lulars i a la matriu extracel·lular. Produeixen histamina i certs mediadors derivats de lípids que, junt al VEGF, incrementen la permeabilitat vascular. Efectuen un reclutament quimiotàctic de monòcits, macròfags i limfòcits, que contribueixen novament amb factors angiogènics. Activen les plaquetes, que aporten també els seus propis factors angiogènics. Estimulen de forma autocrina i paracrina altres mastocits. A més, ténen capacitat de ser atrets per certs factors, com el VEGF, el bFGF i el TGF β (Norrby, 2002; Hiromatsu, 2003).

Els mastocits s'acumulen dintre i envoltant el tumor; s'ha vist un nombre incrementat de mastocits al càncer de còlon, mamella, pulmó, carcinoma basocel·lular i melanoma. La injecció de mastocits a tumors a models animals accelera la progressió tumoral (Hiromatsu, 2003).

El PDECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor).

A l'igual que el FGF, té un problema com a factor angiogènic: és sintetitzat, però no secretat, mancant d'un pèptid senyal (Arbiser, 1996; Leung, 1989). S'ha correlacionat la seva presència amb l'angiogènesi al càncer gàstric humà (Takahashi, 1998), al càncer de bufeta (O'Brien, 1995) i al carcinoma escatós de cèrvix (Tokumo, 1998).

Les integrines.

Són molècules heterodimèriques de superfície, que modulen el contacte amb diversos substrats. Novament el seu paper a l'angiogènesi és permissiu, essent necessària la seva presència per a l'angiogènesi induïda pel bFGF. No solament modulen l'angiogènesi induïda pel bFGF, sinó que aquest mateix regula la seva expressió, induïnt la presència d'unes i l'absència d'altres, demostrant així la complexitat en els mecanismes de l'angiogènesi. La integrina $\alpha_v\beta_3$ és la que ha rebut més atenció (Brooks, 1994; Sepp, 1994; Mitjans, 2000). Juga un paper crític a l'angiogènesi, les

metàstasis i la resorció òssia mitjançada pels osteoclasts (Kumar, 2003). La integrina $\alpha_v\beta_3$ s'hiper-expressa a les cèl.lules endotelials que proliferen, i un anticòs contra ella bloqueja l'angiogènesi, sense afectar els vasos pre-existents. La integrina $\alpha_v\beta_3$ inicia la migració de les cèl.lules endotelials per una via de senyalització calci-depenent. Molts inhibidors endògens de l'angiogènesi (endostatina, angiostatina, tumstatina) semblen actuar sobre el sistema de les integrines (Kumar, 2003; Sudhakar, 2003). A més, les integrines funcionen en concert amb el VEGF per a la supervivència de les cèl.lules endotelials, i faciliten la interacció entre el VEGF i les cèl.lules endotelials independentment dels receptors del VEGF (Sledge, 2002-I; Hutchings, 2003).

Endogleïna (CD 105).

És una glicoproteïna homodimèrica de membrana cel.lular de 180 kDa expressada a les cèl.lules endotelials en proliferació, i induïble per la hipòxia. La mutació al gen de l'endogleïna és responsable de la teleangiectàsia hemorràgica hereditària tipus 1. Actua com a receptor per al $TGF_{\beta-1}$ i el $TGF_{\beta-3}$. La microdensitat vascular mesurada mitjançant tinció immunohistoquímica amb Ac anti-CD 105 ha demostrat ser un factor pronòstic independent, i s'especula sobre el seu potencial com a diana per al tractament antiangiogènic.

Es troba també a la sang perifèrica dels pacients amb càncer, i els seus nivells correlacionen amb la presència de metàstasis. En estudis "knockout" amb ratolins atímics, aquests moren *in utero* per manca d'angiogènesi quan són nuls per a l'endogleïna (Duff, 2003; Fonsatti, 2003).

Endotelina-1.

L'endotelina-1 actua directament sobre les cèl.lules endotelials, modula diferents estadis de neovascularització, inclòint proliferació, migració, invasió, producció de proteases i morfogènesi. A més a més, modula també indirectament l'angiogènesi a través de la inducció del VEGF. La família de les endotelines està constituïda per tres membres, ET-1, ET-2 i ET-3, i ténen 2 receptors coneguts, ET_A i ET_B . El receptor ET_A ha estat involucrat en el mimetisme vascular o "vascular mimicry", descrit per Maniotis i cols (1999), fenomen mitjançant el qual diferents

INTRODUCCIÓ

tumors, entre ells el melanoma, aconseguen generar espais "pseudovasculars" entre les cèl·lules tumorals en absència d'endoteli, creixent així d'una forma angiogènesi - independent. L'interès en aquest receptor és precisament el coneixement d'una teòrica diana terapèutica si es vol lluitar contra aquest mimetisme vascular; de fet, existeix ja un inhibidor via oral, denominat ABT-627 (Bagnato, 2003).

Factor angiogènic estimulador de les cèl·lules endotelials (Endothelial cell Stimulating Angiogenesis Factor - ESAF).

És una petita molècula no peptídica, dialitzable, amb activitat angiogènica potent. El seu efecte angiogènic s'atribueix a la capacitat d'activació dels precursors de les metalloproteïnases de la matriu majors i a la reactivació del complex metalloproteïnasa - inhibidor de metalloproteïnasa (McLaughlin, 1996).

S'ha implicat a la neovascularització ocular extraretiniana (Taylor, 1989), al creixement capil·lar al cor durant l'entrenament d'endurança (Hudlicke, 1995), a l'angiogènesi produïda a la curació de fractures (Wallace, 1990; Kurdy, 1996), a la retinopatia proliferativa (Weiss, 1998) i a la psoriasi (Bhushan, 1999).

Factor de creixement hepatocitari (Hepatocyte growth factor / scatter factor - HGF/SF).

Juga un paper important a la majoria de tumors sòlids humans; a més a més, la seva major expressió s'associa a mal pronòstic (Zhang, 2003; Aref, 2002). Actua a través del receptor Met. El potencial maligne del senyal HGF/SF-Met s'ha atribuït bàsicament a les propietats mitogèniques i invasives. Indueix però també l'angiogènesi (Zhang, 2003).

Se sap que, *in vitro*, indueix l'expressió de VEGF. A més, disminueix de forma dramàtica l'expressió de Trombospondina-1 (un important agent antiangiogènic, com veurem), identificant-se així com un interruptor clau a l'angiogènesi tumoral (Zhang, 2003). D'altra banda, és capaç també d'induir l'angiogènesi per una via independent de l'estimulació de la producció del VEGF (Sengupta, 2003).

Altres agents angiogènics.

Hi ha tota una sèrie d'altres factors amb activitat angiogènica. El paper exacte de cadascun d'ells no és ben conegut, afegint-s'hi a més a més de forma continuada la descripció de nous factors, amb major o menor rellevància.

El PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, o CD31) és una glicoproteïna d'adhesió intercel.lular, present al plasmalemma de plaquetes, leucòcits i cèl.lules endotelials. Als cultius endotelials és a les vores de les cèl.lules, tot i que *in vivo* a la pell humana envolta tota la cèl.lula endotelial. Berger i cols. (1993) suggereixen que el PECAM-1 és important per imposar a les cèl.lules endotelials la polaritat que han de seguir a l'angiogènesi. Està en estudi com a mediador de l'angiogènesi d'altres molècules angiogèniques (seria com un segon missatger).

La Pleiotropina és un factor de creixement purificat a partir de sobrenedants de cultius de cèl.lules de càncer de mamella. Té una activitat biològica molt semblant a la del bFGF (Czubayko, 1995).

Diversos Pèptids amb una seqüència concreta poden demostrar-se com a estimuladors de l'angiogènesi. Així, per exemple, Kibbey i cols. (1992) demostren l'activitat estimuladora de l'angiogènesi tumoral de la seqüència SIKVAV (Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val).

Zhang i cols. (1994) relacionen la presència del Factor tissular amb l'angiogènesi i el creixement tumorals a cèl.lules de sarcoma, actuant aquest factor per via indirecta, amb major expressió del VEGF i menor d'un inhibidor de l'angiogènesi, la Trombospondina. Recordem que el Factor tissular és el principal iniciador de la coagulació *in vivo*; així, s'estableix un altre lligam entre les vies angiogènica i hemostàtica. Koomagi i cols. (1998) lliguen el Factor tissular amb l'angiogènesi i el pronòstic al càncer de pulmó humà no cèl.lula petita.

Múltiples Altres factors angiogènics són enumerats a les diverses revisions sobre el tema, la majoria amb efectes indirectes i inclús alguna vegada contradictoris, que demostren la complexitat del procés de l'angiogènesi: monobutirina, angiotropina, productes de degradació de l'àcid hialurònic, productes finals de glucosilació relacionats amb l'edat (Passaniti, 1992), heparinasa, IL-8, factor de creixement de la placenta, prostaglandines E1 i E2, factor de creixement transformador α (transforming growth factor α) (Fidler, 1994), factor estimulador de les colònies (G-CSF), proliferina (Folkman, 1995-II), oncostatina M, factor de creixement semblant a l'EGF portador d'heparina, IL-6 (Arbiser, 1996), IL-1, factor de creixement epidèrmic, interferó, factor plaquetari 4, lípids adipocitaris, ions de coure (Pepper, 1996), nicotinamida,

INTRODUCCIÓ

adenosina, ceruloplasmina (Ríos, 1995), IL-4, eritropoetina, àcid hidroxiieicosatetraenoic (Le Querrec, 1993), Del-1, fol.listatina, leptina, Midkine (Rosen, 2002), timidin-fosforilasa, HER-2/neu, Hypoxia Inducible Factor HIF 1 α , ciclooxigenasa-2 (Sledge 2002-I).

AGENTS ANTIANGIOGÈNICS.

L'Angiostatina.

Descoberta per O'Reilly i cols. (1994), en un article allionador, ha assentat les bases per a tota una sèrie de teories sobre els inhibidors endogens de les metàstasis produïts pels tumors primaris, mantenint aquestes en l'estat "adormit". Demostren la presència d'aquesta proteïna al càncer de pulmó de Lewis a ratolins. La presència de l'angiostatina, produïda pel tumor primari, inhibeix el creixement de les metàstasis, i no del tumor primari, via inhibició de l'angiogènesi. Extirpat el tumor primari, les metàstasis creixen i, a l'injectar novament l'angiostatina en absència ja del tumor primari, aconseguix inhibir aquest creixement. A més, a l'esbrinar la seva seqüència, troben que coincideix amb un fragment intern del plasminogen. L'angiostatina es generaria per proteòlisi selectiva del plasminogen per diferents enzims capaços de degradar-lo; a nivell conformacional, unes estructures anomenades "kringles" són fonamentals per a la seva acció (Figura 4) (Félez, 2000).

L'angiostatina indueix directament l'apoptosi de les cèl.lules endotelials de forma dosi dependent, i no afecta la proliferació ni l'apoptosi de les cèl.lules tumorals d'origen no endotelial. L'apoptosi de les cèl.lules endotelials induïda per l'angiostatina s'associa amb l'increment d'activitat de la FAK (Focal Adhesion Kinase); aquesta activació de la FAK resulta en trastorns d'adhesió entre les cèl.lules endotelials, conduint finalment a la seva apoptosi. Inhibeix també l'activació mitjançada pel bFGF i el VEGF de les ERK-1 i 2 (extracellular signal-regulated kinase) i d'altres fosfoproteïnes per desfosforilació transitòria a les cèl.lules endotelials. A més, s'ha descrit l'aturada de la mitosi a les cèl.lules endotelials a la fase del cicle cel.lular G2/M. També s'ha postulat que inhibeix el creixement tumoral baixant la capacitat d'invasió cel.lular (Sim, 2000).

El model de l'angiostatina ha generat un considerable volum de publicacions a la literatura oncològica, essent utilitzada la seva existència per a justificar les metàstasis ocorregudes post-extirpació dels tumors primaris (Fidler, 1994; Folkman, 1995-II). L'angiostatina inhibeix la

proliferació endotelial i indueix l'apoptosi de les cèl.lules endotelials *in vitro*, i del creixement tumoral *in vivo* en models pre-clínic. El seu paper al càncer humà està poc documentat (Sledge 2002-I). Actualment és en assaigs clínics en fase I per valorar la seva seguretat, i en fase II per a avaluar l'eficàcia combinat amb radioteràpia (Soff, 2000).

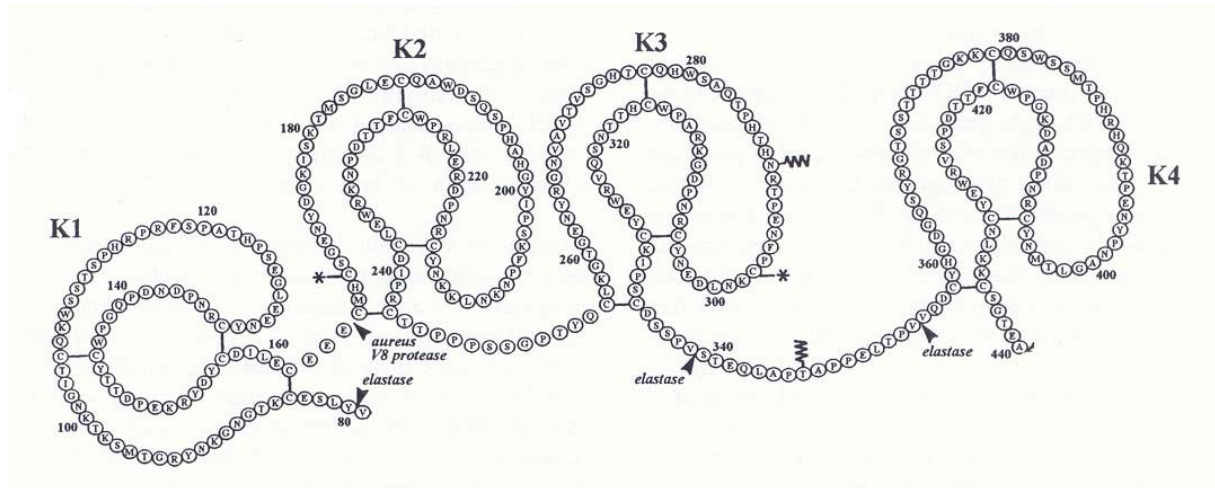


Figura 4: Estructura de l'angiostatina k1-4 (kringle 1-4).

Endostatina.

Descrita per l'equip de Judah Folkman, es va aïllar del sobredant d'una línia cel.lular d'hemangioendotelioma murí. Una vegada seqüenciada, es va comprovar que és el fragment C-terminal amb domini globular del col.lagen XVIII, de 20 kDa, amb 184 aminoàcids. Altera els senyals intracel.lulars del VEGF i el bFGF i afavoreix l'apoptosi de les cèl.lules endotelials. No se sap gaire el seu paper al càncer humà (Sledge, 2002-I). S'ha localitzat a la paret i membrana basal dels vasos. Es pensa que es genera igual que l'angiostatina, per proteòlisi selectiva. S'ha aïllat a la sang i teixits de gent normal. A models animals, l'endostatina sistèmica inhibeix el creixement tumoral. *In vitro*, no afecta cap altre tipus cel.lular fora de les cèl.lules endotelials, multiplicant per 15 a 30 la taxa d'apoptosi d'aquestes via inhibició de l'expressió de Bcl-2 i Bcl-x_L (Sim, 2000; Bachelot, 2003).

Ja s'han publicat els resultats d'assaigs en fase I, demostrant la seva baixa toxicitat, tot i que

INTRODUCCIÓ

l'eficàcia de moment no ha acomplert les expectatives (Bachelot, 2003).

Tumstatina.

És un fragment de la cadena alfa 3 del col.lagen IV, i és present a la circulació. La seva absència es relaciona amb una major angiogènesi i creixement tumorals en models animals. Inhibeix la proliferació de les cèl.lules endotelials i en promou l'apoptosi. Per a suprimir l'angiogènesi, precisa de la presència de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en els vasos patològics angiogènics. També té relació amb metal.loproteïnases, ja que la MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) és la que cliva el col.lagen IV per a generar tumstatina (Hamano, 2003; Sudhakar, 2003).

Interferó α .

Dintre els inhibidors fisiològics de l'angiogènesi, és el més estudiat. S'ha utilitzat a baixes dosis per al tractament dels angiomes gegants que proliferen, i per al tractament del Sarcoma de Kaposi. Baixa l'expressió del mRNA del bFGF (Fidler, 1994; Folkman, 1995-II) i inhibeix la invasió i formació de tubs per part de les cèl.lules endotelials induïdes pel bFGF (Pepper, 1996), essent així un factor antiangiogènic indirecte.

Actualment és l'únic fàrmac que ha demostrat una certa eficàcia al tractament del melanoma maligne avançat, i l'únic aprovat per la FDA per a tal fi, podent atribuir almenys part del seu efecte a la seva activitat antiangiogènica.

Els interferons β i γ també s'han descrit com a antiangiogènics (Rosen, 2002-I).

Les Trombospondines.

Les trombospondines són glicoproteïnes, presents a la matriu extracel.lular, amb diferents funcions (interaccions amb l'heparina, fibronectina, integrines, i diverses cèl.lules). Són secretades també per cèl.lules tumorals i endotelials (Sledge, 2002-I). La Trombospondina-1 és el

membre prototípic d'una família que comprèn 5 membres. Dels 5, només les Trombospondines 1 i 2 ténen capacitat angiostàtica. Les Trombospondines 1 i 2 s'estructuren com a trímers d'uns 600 kDa. Ténen una gran diversitat de respostes biològiques, explicades per la multiplicitat de receptors als que es poden lligar (fins al moment, s'han identificat 8 receptors diferents que poden lligar amb la Trombospondina-1) (Vailhé, 2003). Regulen l'adhesió, proliferació i mobilitat de molts tipus cel.lulars. Inhibeixen la fibrinolisi. Afavoreixen les relacions entre les cèl.lules tumorals i les plaquetes. Poden modular negativament l'angiogènesi a través del seu efecte a l'adhesió de les cèl.lules endotelials, creixement i motilitat (Zabrenatzky, 1994). Antagonitzen el bFGF (Fidler, 1994). Es dipositen a la membrana basal dermoepidèrmica, contribuint a què l'epidermis sigui avascular (Velasco, 2002).

Zabrenatzky i cols. (1994) descriuen a diferents línies tumorals que la seva presència correlaciona negativament amb el comportament maligne. Campbell i cols. (1998) troben que al càncer de bufeta la producció endògena de Trombospondina-1 es veu molt reduïda (junt a un augment del VEGF).

Els inhibidors tissulars de les metal.loproteïnases.

Les metal.loproteïnases són una sèrie de proteïnes la funció de les quals és la de degradar la matriu extracel.lular. La presència d'aquestes proteïnes en els tumors acostuma a correlacionar amb una major agressivitat local i capacitat metastàtica. A més a més, faciliten l'activitat angiogènica per part del tumor.

La seva inhibició suposa una disminució tant de la capacitat angiogènica com de les possibilitats metastàtiques. S'ha vist que inhibidors de les metal.loproteïnases exerceixen ambdós efectes. Per exemple, amb el *Batimastat* (BB-94), Wang i cols. (1994) inhibeixen el creixement i disseminació del càncer de còlon humà xenoempeltat a ratolins nus; Davies i cols. (1993) inhibeixen el creixement tumoral i prolonguen la supervivència a carcinoma d'ovari humà xenoempeltat a ratolins nus; Galardy i cols. (1994) inhibeixen l'angiogènesi corneal produïda per un carcinosarcoma implantat a la còrnia de ratolí. Johnson i cols. (1994) aconseguixen, amb el *TIMP-1* (Inhibidor tissular de la metal.loproteïnasa I), bloquejar la resposta angiogènica del bFGF *in vivo*, atribuint-se l'efecte, almenys en part, a la inhibició de la migració de les cèl.lules endotelials. Els darrers inhibidors de metal.loproteïnases sintètics (Prinomastat i Marimastat) han entrat ja de fet en assaigs clínics (Herbst, 2002).

INTRODUCCIÓ

De tota manera, la complexitat de tots aquests mecanismes es demostra quan recordem per exemple que l'efecte d'algunes metal·loproteïnases és antiangiogènica, al generar agents antiangiogènics endògens tal com fa la MMP-9 al clivar el col·lagen IV i generar tumstatina (Hamano, 2003). S'ha descrit també alguna metal·loproteïna (ADAMTS1) amb activitat antiangiogènica (Iruela-Arispe, 2003).

Esteroides Angiostàtics.

Hi ha esteroides amb capacitat angiostàtica (Arbiser, 1996). Això pot explicar la seva utilitat als angiomes proliferants, i en part a la psoriasi i a l'eczema.

Yamamoto i cols. (1994) demostren l'activitat angiostàtica a la còrnia de conill de diversos esteroides (acetat de medroxiprogesterona i derivats). Igualment Fotsis i cols, el 1994, descriuen un metabolit estrogènic endogen, el 2-metoxiestradiol, com a inhibidor de la neovascularització dels tumors sòlids a ratolins administrat via oral, aconseguint així inhibir el creixement tumoral. Forma part també d'algun assaig clínic antiangiogènica (www.angio.org).

Altres.

Igual que amb els factors angiogènics, es descriuen múltiples agents endògens amb activitat antiangiogènica, com el factor plaquetari 1, pèptids de la laminina, l'heparina, difluorometilornitina, derivats de la quitina sulfatats (Passaniti, 1992), l'inhibidor derivat del cartílag, heparinasa, interferó β , factor plaquetari 4, un fragment de la prolactina de 16 kDa, protamina (Fidler, 1994), el receptor soluble del bFGF, la proteïna relacionada amb la proliferina de la placenta, la IL-8 (Folkman, 1995-II), IL-12 (Arbiser, 1996), vitamina D3 (Majewski, 1996), fragment de 140 kDa de la Trombospondina, IL-1 (Le Querrec, 1993), antitrombina III antiangiogènica, fragment del complement CD59, fragment de fibronectina, Gro- β , fragment hexasacàrid d'heparina, hCG, IP-10 (proteïna induïble per l'interferó), kringle 15 (fragment de plasminogen), inhibidor de la ribonucleasa placentària, inhibidor de l'activador del plasminogen, retinoides, tetrahidrocortisol-S, TGF β , vasculostatina, vasostatina (fragment de calireticulina) (Rosen, 2002), angiopoietina-2, troponina, PSA (Sledge, 2002-I).

Veiem doncs la complexitat que hi ha al darrera dels mecanismes reguladors de l'angiogènesi,

amb factors que encara no coneixem, d'altres amb efectes indirectes sobre altres factors, i inclús alguns que certs autors referencien com a pro, i altres com a anti-angiogènics, depenent de les condicions en què es facin els estudis.

Aquests factors, uns i altres, es van produïnt, i també es poden secretar de forma immediata. Al cas dels factors angiogènics típicament estan lligats a la matriu extracel.lular; en canvi, de forma característica els antiangiogènics formen part de proteïnes més grans com el plasminogen, el col.lagen IV i el col.lagen XVIII, i en un moment determinat es pot disposar d'ells mitjançant la proteòlisi selectiva d'aquestes proteïnes (Hanahan, 1996).

EL FACTOR DE CREIXEMENT DE L'ENDOTELI **VASCULAR** **(VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR).**

El Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) juga un paper crucial entre tots els factors coneguts que influencien en l'angiogènesi. De fet, molts reguladors de l'angiogènesi en són a través de la regulació indirecta del VEGF. És actualment el factor angiogènic considerat clau i principal.

Història.

El VEGF va ser aïllat per Senger el 1983, a partir d'ascitis tumoral. El va descriure com un dímer constituït per dues subunitats de 20-23 kDa, al que va anomenar Factor de Permeabilitat Vascular - Vascular Permeability Factor - VPF, ja que no va descobrir les seves propietats angiogèniques, però sí les augmentadores de la permeabilitat (Shibuya, 1995).

Leung, el 1989, identifica un factor de creixement de l'endoteli vascular que lliga heparina a partir de medi condicionat de cèl.lules pituitàries fol.liculars o fol.liculoestrellades. Pesa 45 kDa i té dues unitats de pes idèntic, de 23 kDa. Aquest Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular coincideix amb el Factor de Permeabilitat Vascular descrit per Senger el 1983. Ferrara, també el 1989 i de forma independent, l'aïlla en un altre sistema, i l'anomena VEGF (Shibuya, 1995).

El VEGF i l'eclipsi angiogènic.

Ja hem parlat en seccions anteriors de l'eclipsi maligne o "switch". Una neoplàsia maligna, quiescent per diversos motius, en un moment donat es podria "despertar" o sortir de la fase de quiescència. La teoria angiogènica ha anat prenent cada vegada més força en els darrers anys com la responsable d'aquest eclipsi. Diversos estudis argumenten que el mediador molecular d'aquest eclipsi podria ser el VEGF (Weindel, 1994). Sugihara i cols. (1994) ho suggereixen en un estudi *in vitro*, demostrant la presència de VEGF durant la transformació maligna de fibroblasts murins. Al carcinoma de mamella és detectable des de la hiperplàsia atípica cap al carcinoma *in situ*, suggerint que la seva presència precedeix la invasió i metastasis; de manera similar es troba a l'èsòfag de Barrett pre-neoplàstic (Sledge, 2002-I) i, a nivell del còlon, a la seqüència adenoma - carcinoma *in situ* - carcinoma invasor (Hanrahan, 2003; Takahashi, 2003).

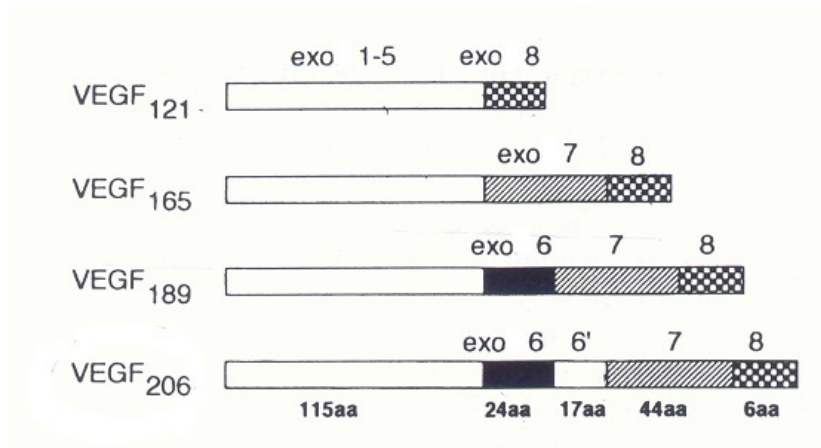
En general s'accepta que el VEGF no juga un paper transformador de la cèl.lula normal a neoplàstica (Claffey, 1996). Fa uns anys es defensava que el VEGF actuava bàsicament com a factor paracrí, no autocrí. Malgrat tot Liu i cols (1995), *in vitro*, demostraven que a l'afegir quantitats mínimes de VEGF a una línia de melanoma humà (A375P), aquesta creixia en més d'un 40%, suggerint doncs un paper autocrí; la presència de VEGF a l'eclipsi angiogènic del melanoma maligne cutani primari podria així, a més de facilitar el creixement i les metastasis, estimular de forma autocrina el creixement del tumor. Darrerament, la descripció del receptor per al VEGF neuropilina-1 en alguns tipus cel.lulars tumorals argumenta a favor també d'aquest paper autocrí (Harmey, 2002).

El Gen del VEGF.

El gen humà del VEGF s'assigna al cromosoma 6p12-p21 (Uthoff, 2002). La comparació de les seqüències de nucleòtids del DNA complementari (cDNA) amb les derivades del VEGF genòmic humà indica que el gen del VEGF està inclòs en 8 exons, i que les varies isoformes surten per enllaçament o "splicing" alternatiu. La forma de 165 aminoàcids manca dels residus codificats per l'exó 6, i la 121 manca els exons 6 i 7. La seqüència bàsica, els 8 exons, codifica el VEGF de 189. El VEGF de 206 aminoàcids resulta de la "donació" d'un exó 7 de 17 aminoàcids, que s'inserta entre els exons 6 i 7 (Figura 5). L'anàlisi del promotor del VEGF demostra que només té un punt

d'engegada, que és a prop d'un lligam potencial per al factor de transcripció sp1 (Tischer, 1991; Uthoff, 2002).

Figura 5: Estructura de la família VEGF-A.



Expressió del gen del VEGF.

A l'*embriogènesi*, a l'estadi d'embrió petit, hi ha molt mRNA del VEGF a la placenta, i no al mateix embrió. Més endavant, augmenta a la zona del cor, i posteriorment a d'altres.

Als *teixits adults normals*, hi ha mRNA del VEGF normalment al pulmó, ronyó, glàndules adrenals, cor, ovari, a la pars distalis de la hipòfisi, múscul llis, fetge, estómac, macròfags peritoneals, cèl.lules de l'epiteli retinià, cèl.lules mare, megacariocits i plaquetes. El paper en aquestes zones és dubtós, perquè no hi ha angiogènesi, i es pensa que potser jugui un paper a la regulació de la permeabilitat (Shibuya, 1995; Pötgens, 1995-I; Katoh, 1995). Al cas de les plaquetes, Banks i cols. (1998) defensen que podria jugar un paper a l'adherir-se aquestes a les cèl.lules tumorals, podent ser la font inicial de VEGF. Segons Pepper (1996), potser les funcions del VEGF en aquests teixits corresponen al manteniment del trofisme i supervivència de les cèl.lules endotelials, manteniment de l'estructura microvascular, o potser és que hi hagi en realitat angiogènesi continuada a tot arreu.

Expressió del gen del VEGF a la fisiopatologia no tumoral.

No solament a l'estudi del càncer és important el VEGF. Tot i que el camp de l'Oncologia és el que més ha estudiat el factor, paral·lelament s'ha anat descobrint el seu paper en altres processos diversos.

Charnok-Jones i cols. (1993) demostren amb Northern blot la presència de mRNA del VEGF a les diferents fases del *cicle endometrial*, demostrant que els nivells d'aquest van canviant segons el moment del cicle. El mateix grup de treball (1994) descriu la presència de VEGF i els seus receptors a la *placenta* ja al primer trimestre de l'embaràs. Ferrara i cols (1998) defensen que el VEGF té un paper fonamental a l'angiogènesi del *cos luti*, i també als processos patològics a aquest nivell que van amb angiogènesi.

Al camp de la *Dermatologia* no neoplàstica també s'han fet molts descobriments. Balleun i cols. (1995), mitjançant Hibridació *in Situ*, demostren que tots els *queratinocits* en cultiu fan mRNA del VEGF, suggerint així un paper del factor tant a la fisiologia com a la patologia cutànies. Efectivament, Brown i cols. (1995-I), a *malalties ampolloses autoimmunes* i mitjançant Hibridació *in Situ*, demostren mRNA del VEGF a l'epidermis, relacionant-lo amb l'edema papil·lar i l'augment de la permeabilitat dels microvasos. Claffey i cols. (1996) també han especulat sobre el seu paper a la *psoriasi*. Lachgar i cols. (1996) evidencien que el VEGF fa de factor de creixement autocrí a les cèl·lules de la papil·la fol·licular; posteriorment, el mateix grup de treball (Lachgar, 1998) troba que el minoxidil incrementa l'expressió del mRNA del VEGF a la papil·la fol·licular. També s'ha involucrat al VEGF amb la gènesi de l'*eritema* induït per la radiació ultravioleta (Longuet-Perret, 1998).

També hi ha grans esperances en quant al possible paper terapèutic del VEGF a les *patologies isquèmiques*. Mülhauser i cols. (1995) demostren el paper terapèutic potencial del VEGF a la patologia vascular isquèmica. En el seu estudi ho fan mitjançant transferència genètica del VEGF a través d'un vector víric. Takahashi i cols. (1994), amb una injecció intra-arterial única de VEGF a una extremitat isquèmica, milloren la vascularització de forma significativa. Resultats similars obténeren Bauters i cols. (1995). Així, el VEGF pot esdevenir un agent terapèutic molt important a malalties tan significatives com la isquèmia miocàrdica i perifèrica (Henry, 1999).

Aiello i cols. (1994) defensen que el VEGF pot ser el regulador de la neovascularització ocular a processos isquèmics com la *retinopatia diabètica*. Pierce i cols. (1995) demostren una major expressió del mRNA del VEGF provocada per la hipòxia a l'ull, coincidint amb la neoangiogènesi ocular.

També s'ha descrit el paper del VEGF a d'altres sistemes. Kuroda i cols. (1995) troben la presència de mRNA del VEGF a les cèl.lules beta del *pàncreas*, suggerint un possible paper a la regulació de la permeabilitat. Ergun i cols. (1997) demostren la presència de VEGF al *testicle*, en concret als tubs seminífers, cèl.lules de Leydig i cèl.lules de Sertoli. Takahashi i cols. (1997-I) descriuen la presència de VEGF al marge de l'*úlcera gàstrica*, podent així aquest jugar un paper a la curació d'aquesta patologia.

Hi ha també altres condicions patològiques on s'ha aïllat mRNA del VEGF:

- als queratinocits que estan a prop d'una *ferida en curació*
 - a l'*ascitis* que de vegades es produeix en els tractaments d'inducció de l'ovulació
 - al teixit sinovial a l'*artritis reumatoide*
 - a la tiroides a la malaltia de *Graves-Basedow*
- (Shibuya, 1995; Pötgens, 1995-I).

Expressió del gen del VEGF a la patologia tumoral.

Els darrers anys s'ha demostrat la implicació del VEGF a l'angiogènesi i / o al pronòstic de múltiples neoplàsies malignes. De fet, a la majoria de tumors on es mira, hi és (Claffey, 1996; Dvorak, 1995; Pötgens, 1995-I). Es pensa que el produeixen les cèl.lules neoplàstiques, i que als endotelis l'únic que fa és acumular-se (Dvorak, 1995).

Weindel i cols. (1992), mitjançant Northern blot, demostren en cultiu que les cèl.lules del *Sarcoma de Kaposi* associat al Sida expressen VEGF, en molta major quantitat que les cèl.lules endotelials normals.

Charnok-Jones i cols. (1993) troben mRNA del VEGF al *carcinoma d'endometri*. El mateix grup (Charnok-Jones, 1994) l'aïlla posteriorment al *coriocarcinoma humà*.

Toi i cols. (1994) demostren mitjançant Hibridació *in Situ* la presència de mRNA del VEGF al *càncer de mamella*, correlacionant a més l'expressió del VEGF tant amb la densitat vascular com amb el pronòstic. Zhang i cols (1995), al transfectar el gen del VEGF a una línia de càncer de mamella humà, demostren que aquesta línia adquireix la capacitat *in vivo* de créixer millor i amb més angiogènesi. Brown i cols. (1995-II) descriuen la presència del mRNA del VEGF al càncer de mamella ductal infiltrant, i no al càncer de mamella lobular, suggerint que té a veure la seva presència amb la desmoplàsia.

Takahashi i cols. (1994) evidencien la presència de mRNA del VEGF al *carcinoma renal*. A més

INTRODUCCIÓ

a més, demostren que els tumors menys vascularitzats expressaven menys mRNA del VEGF. No troben malgrat tot correlació entre l'expressió del VEGF i la mida del tumor, estadi o grau. Nicol i cols. (1997), mitjançant Rt-PCR, demostren la presència de VEGF al carcinoma renal.

Una de les àrees de major estudi sobre el paper del VEGF són els diversos *Tumors cerebrals*. Plate i cols. (1994) demostren la presència de mRNA del VEGF i dels seus receptors als *gliomes* de baix i alt grau, i el relacionen amb l'angiogènesi. Weindel i cols. (1994) evidencien l'expressió de mRNA del VEGF a diferents patologies tumorals cerebrals, benignes (*meningiomes i astrocitomes pilocítics*), i malignes (gliomes). Suggerixen que el VEGF pot ser el responsable de l'edema peritumoral que s'observa als tumors cerebrals, i que la presència de VEGF als tumors cerebrals podria tenir valor pronòstic. Samoto i cols. (1995) tornen a examinar el VEGF, junt a d'altres factors angiogènics (bFGF, TGF α i TGF β) a gliomes i meningiomes, *hemangioblastomes, neurinomes i metàstasis cerebrals de càncer de pulmó*; troben que l'únic que correlaciona amb l'angiogènesi és el VEGF. Wizimag-Voos i cols. (1995), mitjançant Northern blot i Hibridació *in situ*, reforcen altre cop el paper del VEGF al demostrar un increment del seu mRNA als hemangioblastomes cerebrals al comparar amb el teixit cerebral normal i amb l'estroma tumoral. Hatva i cols. (1995), mitjançant Hibridació *in situ*, troben VEGF a *metàstasis cerebrals de melanoma*. Tsai i cols. (1995) igualment demostren el paper del VEGF a diverses línies de glioma humà. Leung i cols. (1997) novament l'evidencien a l'astrocitoma pilocític, un tumor molt vascular i que forma molts quists.

També al *melanoma maligne* multitud de publicacions demostren la presència i el paper del VEGF. Així, Liu i cols. (1995) detecten a 15 línies de melanoma, *in vitro*, la producció de VEGF. A part, a tres d'elles troben a més a més la presència del receptor del VEGF anomenat kdr. Pötgens i cols. (1995-II) demostren la presència de VEGF en el melanoma, tot i que no aconsegueixen correlacionar la seva presència ni amb l'angiogènesi ni amb les metàstasis. Claffey i cols. (1996) proven que en una línia de melanoma humà xenoempeltada a ratolins atímics la transfecció del VEGF afavoreix el creixement tumoral i les metàstasis, i que contràriament la transfecció en antisentit el que fa és inhibir tant el creixement com les metàstasis pulmonars. Pötgens i cols. (1996), en un experiment similar, també aconsegueixen augmentar el creixement i les metàstasis al xenoempeltar línies de melanoma humà transfectades amb VEGF a ratolins.

Boocock i cols. (1995), mitjançant Hibridació *in situ*, descriuen la presència de mRNA del VEGF al *càncer d'ovari*.

Warren i cols. (1995) troben el mRNA del VEGF aquesta vegada a *metàstasis hepàtiques de càncer de còlon*, a les cèl.lules tumorals. Tokunaga i cols. (1998) correlacionen l'expressió del

VEGF al càncer de còlon amb el mal pronòstic.

Viglietto i cols. (1995) l'aïllen a *tumors tiroïdals*, i correlacionen la seva presència amb major malignitat.

Katoh i cols. (1995) descriuen la presència de VEGF a, entre d'altres, cèl.lules de *leucèmia*. Fielder i cols. (1997), en aproximadament un terç dels casos de Leucèmia Mieloide Aguda que examinen, aïllen VEGF. Foss i cols. (1997) demostren la presència de VEGF a *limfomes i malaltia de Castleman*.

Al *retinoblastoma*, Peer i cols. (1997) associen la presència de mRNA del VEGF amb l'angiogènesi als ulls afectats pel tumor.

Takanami i cols. (1997) correlacionen la presència del VEGF amb l'angiogènesi i la supervivència a l'*adenocarcinoma de pulmó*, en un estudi amb 118 pacients. Fontanini i cols. (1997), a càncer de pulmó, lliguen la mutació de la p53 amb l'angiogènesi i el pronòstic, amb un alt grau de correlació. Associen també l'expressió del VEGF amb l'angiogènesi, implicant-lo com a mediador de l'efecte de la mutació de p53.

Jackson i cols. (1997), a *càncer de pròstata*, mitjançant PCR, demostren la presència de VEGF.

Kilic i cols. (1997) aïllen el VEGF a les cèl.lules dels *tumors de cèl.lules de Leydig* humans.

Denhart i cols. (1997) troben un increment del VEGF a les displàsies i al *carcinoma escatós de boca i laringe*, correlacionant-lo amb l'angiogènesi.

Regulació de l'expressió del gen del VEGF.

Es coneixen múltiples factors que influencien l'expressió del gen del VEGF (Figura 6) (Koura, 1996; Neufeld, 1999). Probablement el més estudiat i defensat és *la hipòxia*. A la majoria de tumors es produeixen situacions d'hipòxia relativa, que en un moment donat podria limitar el creixement del tumor. El tumor respon generant més vasos sanguinis, i ho fa a través del VEGF. Waleh i cols. (1995) demostren la hiper-regulació de l'expressió del mRNA del VEGF per part de la hipòxia, en un model d'esferoides tumorals multicel.lulars. Shweiki i cols. (1995), també mitjançant esferoides, que el que fan és simular un medi avascular, evidencien que tant la hipòxia com el dèficit de glucosa (el qual és resultat de la hipòxia) augmenten l'expressió del VEGF a cèl.lules de glioma. Stavri i cols. (1995) responsabilitzen la hipòxia i el PDGF-BB com a incrementadors de l'expressió del VEGF a les cèl.lules musculars llises vasculars. Claffey i cols. (1996) i Pötgens i cols. (1996) defensen que la hipòxia juga un paper important *in vivo*, fent que

INTRODUCCIÓ

línies que *in vitro* produeixen poc VEGF, en canvi *in vivo* en facin molt. Minchenko i cols. (1994) troben també que el VEGF s'expressa més a zones més necròtiques del tumor i demostren que això és per la hipòxia, la qual probablement estimula aquesta major expressió mitjançant una proteïna contenint el grup hemo. La transcripció de mRNA del VEGF per la hipòxia es deu almenys en part al lligam del "hypoxia-inducible factor 1" (HIF-1) a una zona de lligam localitzada al promotor del VEGF (Neufeld, 1999; Choi, 2003). El mecanisme d'activació de la producció de VEGF a través del HIF-1 no és exclusiu de la hipòxia; l'oncogen v-src pot induir també l'expressió del HIF-1. Hi ha alguns factors addicionals semblants al HIF-1 que regulen l'expressió del VEGF, però aquests factors no estan ben caracteritzats (Neufeld, 1999); s'ha observat recentment que certs factors de creixement, a través de les MAPKs p42/p44 (mitogen-activated protein kinases), activen d'una banda el promotor del VEGF, i de l'altra fosforilen el HIF-1 α conduint a un increment de la seva activitat sobre el VEGF (Mazure, 2003). La hipòxia, a més d'induir la transcripció, promou l'estabilització de mRNA del VEGF; les protein kinases d'estrés (stress-activated protein kinases - SAPK) contribueixen a aquesta estabilització (Mazure, 2003).

També s'ha relacionat l'expressió del VEGF amb diversos *oncogens*, presentant-se aquests com a reguladors. Mukhopadhyay i cols. (1995) descriuen al glioblastoma el paper regulador del p53 sobre el VEGF (el p53 muta quan l'astrocitoma passa a glioblastoma). De tota manera, no tothom està d'acord amb el paper del p53 com a inhibidor del VEGF (Neufeld, 1999). Rak i cols. (1995) hi impliquen l'oncogen *ras*: en el càncer de còlon (on d'una banda s'han descrit mutacions del *ras*, i de l'altra s'ha descrit relacionat amb el VEGF) evidencien el possible paper del *ras* mutat a la hiperproducció de VEGF.

Múltiples *factors angiogènics* en són de forma indirecta, influint de fet en l'expressió de factors angiogènics més directes com el VEGF. Així, Pertovaara i cols. (1994) descriuen a dues línies tumorals que el TGF és un factor angiogènic indirecte a través de la regulació de l'expressió del VEGF. Brogi i cols. (1994) demostren que dos factors angiogènics, el PDGF-BB i el TGF β -1, en són mitjançant l'estimulació de l'expressió dels gens del VEGF i del bFGF a les cèl.lules musculars llises. Li i cols. (1995) troben que la IL-1 β indueix l'expressió del gen del VEGF. Tsai i cols. (1995) novament evidencien que el VEGF és la via final de molts processos angiogènics, al demostrar que es veu estimulat per l'EGF, el PDGF-BB i el bFGF. També a patologia no tumoral, Jackson i cols. (1997) descriuen que el VEGF es veu hiper-regulat per la hipòxia i per la IL-1 β als fibroblasts sinovials dels malalts amb artrosi i artritis reumatoide.

D'*altres* factors s'han trobat també que indueixen una major expressió de mRNA del VEGF.

Entre ells el ionòfor del calci A23187, l'AMPc, l'estimulació de la via de la protein-kinasa C, estradiol, prostaglandines (Shibuya, 1995), la hiperglucèmia (Williams, 1997), el $\text{TNF}\alpha$, el KGF (keratinocyte growth factor), la IL-6, el peròxid d'hidrògen produït pels neutròfils presents a la curació de les ferides, la radiació UVB, l'òxid nítric (contribuint a més a l'efecte augmentador de la permeabilitat vascular) (Neufeld, 1999) i el "insulin-like growth factor" (Kim, 1998). També hi ha citocines inhibidores de l'alliberament del VEGF, com la IL-10 i la IL-13 (Neufeld, 1999).

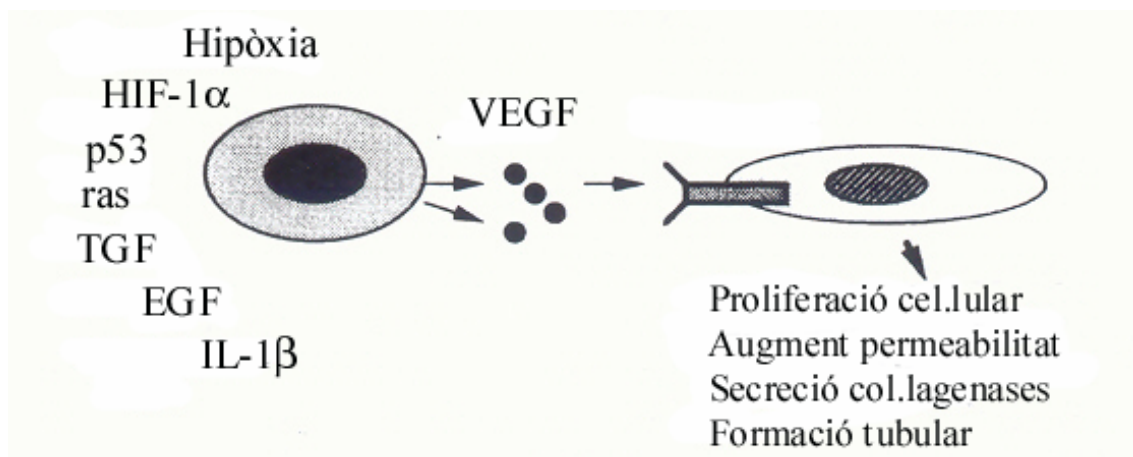


Figura 6: Factors reguladors de l'expressió de VEGF.

La proteïna VEGF - Característiques estructurals.

El VEGF és una glicoproteïna; la glicosilació és necessària no per a l'activitat biològica, sinó per a l'estabilitat i secreció eficients (Shibuya, 1995). El VEGF té varies isoformes, que es constitueixen a partir de l'enllaçament alternatiu (és a dir, a partir de les diferents combinacions entre els 8 exons). Les isoformes més conegudes són el VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 i VEGF 206 (Robinson, 2001).

El VEGF 121 és el majoritari a la placenta. No té un domini bàsic, necessari per lligar-se a l'heparina, a diferència dels altres VEGF (Shibuya, 1995).

El VEGF 165 és el més abundant. És segregat com a homodímer de 45 kDa. Pot ser tallat per la plasmina, fent un tros de 110 aminoàcids, que és equipotent al VEGF 121 respecte a la capacitat mitogènica (Keyt, 1996-I).

Al VEGF 189 se li ha donat també molta importància a la patologia tumoral, tot i no ser el més

INTRODUCCIÓ

freqüent (Nakamura, 2002). La seva part activa resideix a la porció aminoterminal, com es demostra al fragmentar-lo amb plasmina, restant actiu el tros amino-terminal de 32 kDa (Shibuya, 1995). Al càncer de pulmó no cèl.lula petita, Oshika i cols. (1998) no aconsegueixen trobar altre VEGF que el 189, i el correlacionen a més a més amb el mal pronòstic. Tokunaga i cols. (1998), a 61 casos de càncer de còlon amb metàstasis hepàtiques, troben que l'expressió simultània de les isoformes 121, 165 i 189 correlaciona amb el mal pronòstic comparant amb l'expressió de només la 121 i 165; així, la isoforma 189 podria tenir a veure amb una major agressivitat.

El VEGF 206 és el que menys vegades s'ha aïllat, tant a teixits normals com a tumors (Shibuya, 1995). El seu paper està per determinar (Pepper, 1996).

Els darrers anys s'han anat documentant altres formes de VEGF obtingudes per enllaçament alternatiu, que són menys conegudes i el paper de les quals moltes vegades resta per determinar. Sugihara i cols. (1994) troben a fibroblasts murins immortalitzats *in vitro* que el VEGF té aquí 304 parells de bases, resultant ser diferent a les formes d'enllaçament ja conegudes prèviament. Jackson i cols. (1997), a càncer de pròstata, mitjançant Western blot i PCR, descriuen dues noves formes, una de 90 i l'altra de 110 aminoàcids. Poltorak i cols. (1997) troben un mRNA del VEGF que codifica una proteïna de 145 aminoàcids (VEGF 145); aquest mRNA conté els exons 1, 6 i 8 del gen del VEGF. L'aïllen a partir de cèl.lules del sistema reproductiu femení canceroses. Se secreta com el 121 i el 165, però es lliga a la matriu extracel.lular, cosa que no fan el 121 ni el 165. Té la capacitat de lligar-se al receptor kdr, però no als altres receptors coneguts per al VEGF. Sugihara i cols. (1998) descriuen una nova forma de VEGF a ratolins, el VEGF 115. Fins i tot Bates i cols (2002) descriuen una isoforma, el VEGF 165b, que paradoxalment el que produeix és un efecte inhibidor sobre l'angiogènesi en el carcinoma renal.

Totes aquestes formes descrites fins ara són agrupades com a la família VEGF-A. També, a banda d'aquestes diferents formes d'enllaçament, s'han descrit proteïnes amb gran homologia als VEGF tradicionals. Són el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E, els primers membres d'una nova subfamília dels VEGF (Joukov, 1997; Achen, 1998). El VEGF-B té una homologia del 43% en la seqüència d'aminoàcids amb el VEGF-A, és mitogènic per a les cèl.lules endotelials i pot formar heterodímers amb el VEGF; pot estar involucrat a l'angiogènesi al múscul i al cor (Achen, 1998, Olofsson, 1996), i s'ha trobat expressat en alguns casos de leucèmia mieloide aguda (Fielder, 1997). El VEGF-C va ser descobert com a lligand del receptor del VEGF Flt-4 (VEGFR-3) per dos grups simultàniament, un a partir de cèl.lules de carcinoma de pròstata humana (Joukov, 1996), i l'altre en una línia de glioma humana (Lee, 1996); es suggereix que el VEGF-C pot ser important a l'angiogènesi del sistema limfàtic (Jeltsch, 1997; Salven, 1998); també es lliga al VEGFR-2

(kdr), però no es coneix la significació d'aquest fet. El VEGF-C té una homologia aminoacídica del 30% amb el VEGF-A. També es troba en diversos teixits humans normals (Lee, 1996). Probablement els propers anys es definirà millor el seu paper, gràcies al desenvolupament recent de tècniques per mesurar millor la limfangiogènesi independentment de l'angiogènesi (Stacker, 2002). El VEGF-D es va descobrir recentment, com una estructura molt pròxima al VEGF-C, que lligava i produïa la fosforilació sobre els VEGFR 2 i 3 (kdr i Flt-4), i aquest lligam als receptors es produïa mitjançant la regió idèntica al VEGF (Achen, 1998). S'han denominat VEGF-E a un grup de proteïnes amb homologia significativa amb el VEGF, i que venen codificades per certes soques de virus Orf que, recordem, clínicament fa lesions angiogèniques; s'admet que probablement el virus Orf ha adquirit filogenèticament el factor a partir d'algun hoste. El VEGF-E interacciona amb el kdr, però no amb el Flt-1 ni amb el VEGFR-3; hi ha una variant de VEGF-E que es lliga a més amb la neuropilina-1 (Robinson, 2001).

La majoria de cèl.lules productores de VEGF en realitat secreten varies isoformes del factor de forma simultània (Neufeld, 1999), i cada isoforma es pot lligar a diferents tipus de receptors (Figura 7).

El VEGF es constitueix habitualment com un homodímer. A la porció aminoterminal hi ha 8 residus de cisteïna, que contribueixen a fer el dímer (Shibuya, 1995). És aquest homodímer la forma activa del factor (Gitay-Goren, 1993). La pèrdua del fragment carboxi-terminal correlaciona amb una gran pèrdua de l'activitat mitogènica del factor (Keyt, 1996-I). Les dues isoformes menors (121 i 165) són secretades, i les dues majors (189 i 206) en teoria no en són. En realitat, sí són secretades, però resten enganxades al plasmalemma o a la matriu extracel.lular: estan lligades a l'heparan sulfat que conté els proteoglicans (Keyt, 1996-I). Qu-Hong (1995), amb estudi ultrastructural, localitza el VEGF, apart del plasmalemma, a dintre d'organelles vesiculovacuolars. Certs enzims proteolítics poden alliberar el VEGF lligat d'aquesta manera, fent-lo funcional de forma soluble (Hauck, 1992). Aquest VEGF lligat pot servir de reservori per ser alliberat en un moment donat, i pot servir per a la interacció cèl.lula-cèl.lula i per dirigir l'angiogènesi en el sentit adequat (Shibuya, 1995). En els tumors, es pensa que el produeixen les cèl.lules neoplàstiques, i que als endotelis l'únic que fa és acumular-se (Dvorak, 1995).

L'heparina juga un paper molt important a la funció del VEGF. Les diferents isoformes ténen diferents capacitats de lligar-se a l'heparina (el VEGF 165 té mitjana capacitat, i el 189 alta capacitat), indicant això diferents activitats biològiques (Shibuya, 1995). L'heparina modula la unió entre el VEGF i els seus receptors; això ho fa segons els receptors de membrana de la mateixa heparina, i mitjançant la sulfatació cap a heparan-sulfat (l'heparan-sulfat potencia la unió

INTRODUCCIÓ

entre el VEGF i els seus receptors) (Soker, 1994). Més informació sobre l'acció i importància de l'heparina a la interacció entre el VEGF i els seus receptors la podem trobar a Tessler (1994) i Presta (2003).

La proteïna VEGF - Característiques funcionals.

1.- Estimulació de l'angiogènesi. És la funció principal i més estudiada, i la que té majors implicacions a la biologia tumoral. El VEGF estimula el creixement i formació tubular de tota una varietat de cèl.lules endotelials. Les cèl.lules endotelials dels vasos limfàtics també hi responen (Shibuya, 1995).

La via del VEGF és bàsicament paracrina: estimula els tumors *in vivo* mitjançant l'angiogènesi, però no *in vitro*, on a les cèl.lules tumorals no els fa res directament. S'havia descrit malgrat tot un paper autocrí a les cèl.lules tumorals derivades de cèl.lules endotelials: hemangioblastoma cerebral i sarcoma de Kaposi (Shibuya, 1995). També Liu i cols. (1995), a la línia de melanoma humà A375P, *in vitro*, trobaven que l'addició de 10 ng/ml de VEGF estimulava el creixement en més d'un 40%, suggerint un probable paper autocrí del VEGF sobre el melanoma. Boockch i cols. (1995) insinuen també un possible paper autocrí sobre el mateix tumor per part del VEGF, al demostrar la presència de kdr (receptor del VEGF) no només a l'endoteli, sinó també a les cèl.lules tumorals.

2.- Augment de la permeabilitat vascular. El VEGF té un efecte incrementador de la permeabilitat vascular de 100 a 1000 vegades major intensitat que la histamina o la bradicinina. Aquest efecte es produeix a l'actuar sobre el citoesquelet de les cèl.lules endotelials, relaxant la unió entre aquestes (Shibuya, 1995). Un estudi d'Esser i cols. (1998) demostra que el VEGF, *in vivo*, en presència de matriu extracel.lular similar a membrana basal, indueix la fenestració de les cèl.lules endotelials. Sembla ser que augmenta la permeabilitat mitjançant un orgànul recentment descrit, l'orgànul vesiculovacuolar, que està a les cèl.lules endotelials venulars i de venes petites (Dvorak, 1995). Cal recordar que la hiper-permeabilitat invariablement precedeix al fenomen angiogènic, d'aquí la importància del VEGF; de fet, s'ha demostrat que els vasos peritumorals són hiper-permeables (Klagsbrun, 1993; Dvorak, 1995).

3.- Altres activitats biològiques conegudes a les cèl.lules endotelials: augmenta en aquestes els

nivells de mRNA i proteïna de la col.lagenasa intersticial; en algunes, hiper-regula el sistema tPA-tP inhibidor i fa alliberar factor von Willebrand (Shibuya, 1995; Dvorak, 1995).

4.- Efectes a cèl.lules no endotelials. Estimula la migració dels monocits, i en ells estimula l'activitat del factor tissular procoagulant i l'influx de calci. Indueix la diferenciació dels osteoblasts en cultiu (Shibuya, 1995; Dvorak, 1995).

5.- Smirne i cols., el 1999, exposen una nova funció recentment descrita del VEGF, que incrementaria el seu potencial tumorigènic, i és la d'inhibir la diferenciació funcional de les cèl.lules dendrítiques, presentadores d'antigens, a partir dels seus precursors hematopoètics.

6.- Molt recentment, Harmeý i cols (2002) formulen la hipòtesi que el VEGF pot actuar com un factor de supervivència per a les cèl.lules tumorals, protegint-les de l'apoptosi. Aquest efecte estaria mitjançat per l'expressió d'un co-receptor, la neuropilina-1, descrita en alguns tipus cel.lulars tumorals. Bachelder i cols (2001) prèviament havien demostrat *in vitro* aquest efecte autocrí del VEGF sobre les cèl.lules de càncer de mamella, mitjançant el co-receptor neuropilina-1. Pidgeon i cols (2001) demostren a més a més una estimulació autocrina del VEGF sobre cèl.lules de càncer de mamella mitjançant l'estímul de la producció de Bcl-2.

Expressió del VEGF a nivell proteic a la fisiopatologia no tumoral.

Paral.lelament als múltiples estudis que han demostrat la presència de mRNA del VEGF a la patologia tumoral i no tumoral, els mateixos o d'altres estudis també li han demostrat a nivell proteic.

Viac i cols. (1997) demostren per ELISA la presència de VEGF a cultius de *queratinocits*. La majoria és alliberat a nivell extracel.lular.

Miller i cols. (1994) i Vinores i cols. (1995) l'aïllen a nivell proteic i defensen el seu paper com a candidat a la neovascularització a la *retinopatia diabètica*.

Kuroda i cols. (1995) troben la seva presència a les *cèl.lules beta del pàncreas*, suggerint una possible funció en la regulació de la permeabilitat.

Ergun i cols. (1997) descriuen la seva presència al *testicle*, en concret als tubs seminífers, les cèl.lules de Leydig i les cèl.lules de Sertoli.

INTRODUCCIÓ

Horiuchi i cols. (1997) demostren que els *eosinòfils* també produeixen VEGF. Així, atribueixen al VEGF un probable paper a les reaccions al·lèrgiques.

Seko i cols. (1997) troben la presència de VEGF en sèrum a malalts afectats d'*Infart Agut de Miocardi* en tractament amb reperfusió.

Kim i cols. (1998-II) troben que el forbol acetat de miristat, un conegut provocador de la *Síndrome del Distress Respiratori de l'Adult* en animals de laboratori, ho fa mitjançant el VEGF, implicant doncs el factor en aquesta síndrome.

Expressió del VEGF a nivell proteic a la patologia tumoral.

Kondo i cols. (1994), amb un mètode ELISA, investiguen la presència de VEGF en sèrum de malalts de càncer en general i de ratolins portadors de tumors, i l'hi troben. Dirit i cols. (1997) fan quelcom similar, a 132 malalts amb càncer, els miren al sèrum mitjançant ELISA la presència de VEGF i de bFGF, i els troben incrementats ambdós. A més, els que no responen al tractament, segueixen tenint nivells més alts, mentre que baixen als malalts que sí responen.

Toi i cols. (1994) demostren la major expressió de VEGF amb immunohistoquímica al *càncer de mamella*, i troben a més a més que l'expressió del VEGF correlaciona tant amb la densitat vascular com amb el pronòstic. Gasparini i cols. (1997) avaluen la presència del VEGF al càncer de mamella N0, i veuen que la presència de VEGF mesurada amb ELISA té valor pronòstic.

Plate i cols. (1994) troben, als *gliomes* de baix i alt grau, la presència de VEGF a nivell de mRNA i proteic, i el correlacionen amb l'angiogènesi. Samoto i cols. (1995), a *gliomes* i *meningiomes*, donen el paper principal de l'angiogènesi al VEGF, al veure que correlaciona amb ella, i no el bFGF, el TGF α ni el TGF β . Wizimag-Voos i cols. (1995) demostren a *hemangioblastomes cerebrals* la presència de VEGF, a nivell de mRNA, i també a nivell proteic amb tècniques d'immunohistoquímica. Goldman i cols. (1997), mitjançant TAC, valoren l'edema cerebral peritumoral a *meningiomes*, i el correlacionen amb l'expressió del VEGF mitjançant immunohistoquímica als tumors, responsabilitzant així el VEGF de l'edema peri-meningioma.

Al *càncer de bufeta*, O'Brien i cols. (1995) evidencien dues vies angiogèniques diferents, una protagonitzada pel PDECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor), i l'altra pel VEGF. La presència del VEGF es correlaciona amb major risc de recurrències, segurament perquè indueix més vasos. Ferrer i cols. (1997), a 25 *càncers de pròstata*, avaluen la presència de VEGF amb immunohistoquímica i ELISA i, comparant amb pròstates normals i hiperplàsia

benigna de pròstata, troben major expressió de VEGF. Jackson i cols. (1997) troben també més VEGF al càncer de pròstata mitjançant Western blot. Nicol i cols. (1997), també per Western blot, demostren la presència de VEGF a nivell proteic aquesta vegada al *carcinoma renal*.

També als càncers de l'àrea ginecològica s'hi ha trobat el VEGF àmpliament. Boocock i cols. (1995), al *càncer d'ovari*, aïllen mitjançant immunohistoquímica el VEGF a les cèl·lules tumorals, i també a porcions de l'estroma. Paley i cols. (1997), a 68 pacients afectades de càncer d'ovari, busquen la presència de VEGF, i troben que les negatives per a VEGF ténen millor pronòstic, essent inclús l'única variable independent que millora el pronòstic, i més que les variables reconegudes habitualment. Obermair i cols. (1997), amb immunohistoquímica, relacionen el grau de la CIN (*neoplàsia cervical intraepitelial*) amb l'angiogènesi, i la presència de VEGF amb l'angiogènesi i el grau de CIN. Tokumo i cols. (1998) correlacionen el VEGF i el PDECGF al *càncer de cervix* amb l'angiogènesi i el pronòstic, amb immunohistoquímica, i troben que hi ha més angiogènesi i més VEGF als adenocarcinomes, i més PDECGF als carcinomes escatosos, trobant a més una relació inversa entre l'expressió de VEGF i de PDCEGF.

Alguns estudis també han buscat el VEGF a nivell proteic al *melanoma maligne*. Així, Sherlyn i cols. (1996) demostren la presència de VEGF en majors nivells als melanomes quan els comparen amb els nevus displàstics. Viores i cols. (1995) avaluen la importància del VEGF al trencament de la barrera hemato-ocular al melanoma uveal, trobant-li un paper. Viac i cols. (1998) descriuen la major presència de VEGF al sèrum de malalts de melanoma comparat amb un grup control, tot i que els seus nivells no correlacionen amb el curs clínic ni el pronòstic.

Mattern i cols. (1997) demostren la presència de VEGF al *carcinoma epidermoide de pulmó*, tot i que no correlaciona per sí sol amb major angiogènesi. Sí ho fa quan es coexpressa amb el bFGF, demostrant novament les complexes interaccions entre factors angiogènics. En canvi, Volm i cols. (1997), amb immunohistoquímica, troben VEGF al carcinoma escatós de pulmó i, tot i que no correlaciona amb la presència de metàstasis, sí ho fa amb la supervivència.

Tampoc les neoplàsies digestives escapen a la influència del VEGF. Així Takahashi i cols (1997-II), amb immunohistoquímica, a 27 pacients amb *càncer de còlon N0*, miren entre altres factors el VEGF, i troben que tant la seva expressió com el recompte vascular són factors pronòstics de primer ordre. Fukisaki i cols. (1998), amb ELISA al sèrum a 67 pacients amb càncer colorectal, demostren que els nivells sèrics de VEGF correlacionen amb l'estadi i amb el pronòstic. Tanigawa i cols. (1997), mitjançant immunohistoquímica, troben expressió augmentada de VEGF al *carcinoma gàstric* humà, demostrant (a 163 tumors) que l'angiogènesi té gran valor pronòstic, tot i que no és així per al VEGF. Inoue i cols. (1997), també amb immunohistoquímica, descriuen

INTRODUCCIÓ

la presència de VEGF a 75 casos de *carcinoma d'esòfag*, correlacionant la seva expressió tant amb l'angiogènesi com amb el pronòstic.

Viac i cols. (1997), per immunohistoquímica i amb ELISA a cultius, demostren l'expressió molt augmentada de VEGF a la *malaltia de Bowen* i al *carcinoma escatós de pell*, i poc augmentada al *carcinoma basocel.lular*. Bowden i cols. (2002), immunohistoquímicament, troben a carcinomes basocel.lulars i escatosos cutanis la presència del factor, essent aquesta major al cas del *carcinoma escatós*.

Moriyama i cols. (1997) evidencien la presència d'angiogènesi i VEGF al *carcinoma escatós oral* amb tècniques immunohistoquímiques, i demostren que és millor predictor de metàstasis la presència de VEGF que no l'angiogènesi. En un altre estudi, Eisma i cols. (1997) valoren la presència de VEGF al *carcinoma escatós de cap i coll*, i el correlacionen amb el pronòstic, tot i que en això no tots els estudis hi estan d'acord (Salven i cols. [1997-I], no troben que el VEGF sigui un marcador amb valor pronòstic).

Els receptors del VEGF.

Es coneixen avui tres receptors per al VEGF: el VEGFR 1, VEGFR 2 i VEGFR 3. Tots són receptors tipus tirosin-kinasa. El VEGFR 1 s'anomena també flt-1; el VEGFR 2, flk-1 o kdr; el VEGF 3, flt-4.

El flt-1 (VEGFR 1) es va aïllar a partir de placenta de ratolí. A cDNA de la placenta van trobar, buscant una tirosin-kinasa nova, un fragment de 8 kb que codificava un receptor tipus tirosin-kinasa, lligat estructuralment al c-Fms (CSF-1-Receptor), al c-kit i al PDGFR: n'hi van dir flt-1 (fms-like tirosin-kinase). (Shibuya, 1995).

A cèl.lules endotelials humanes es va aïllar un altre receptor relacionat amb el flt: el kdr (VEGFR 2). A cèl.lules de fetge de ratolí, es va trobar el mateix que el kdr humà, i se'l va denominar flk-1. kdr són les inicials de "kinase insert domain containing receptor"; flk-1 ve de "fetal liver kinase-1". (Keyt, 1996-I).

El flt-4 o VEGFR 3, es va recuperar a partir de cèl.lules humanes i de ratolí. És el que menys s'ha descrit en el sistema VEGF - receptors, tot i que té un paper demostrat a l'embriogènesi i també en algunes neoplàsies hematològiques. S'expressa als vasos limfàtics, i es lliga amb els VEGF C i D (Neufeld, 1999; Fielder, 1997). No es lliga al VEGF "clàssic" (VEGF-A; Figura 7) (Joukov, 1997). Tot i que inicialment es va considerar un marcador específic de vasos limfàtics,

posteriorment se l'ha descrit també a altres endotelis i a macròfags (Reis-Filho, 2003).

Malgrat que es va creure que probablement no apareixerien més receptors per al VEGF (Shibuya, 1995), Soker i cols. han descrit posteriorment un nou receptor exclusiu per al VEGF 165 (Soker, 1996; Soker, 1997); en concret, el receptor rep una regió de 44 aminoàcids codificada per l'exó 7 present al cDNA del VEGF 165, i es demostra la seva importància a l'angiogènesi al veure que si es bloqueja la seva unió amb el VEGF 165, la capacitat angiogènica d'aquest s'inhibeix. A posteriori aquest receptor ha rebut el nom de neuropilina-1. En realitat actua com a co-receptor del VEGFR-2 (i pot explicar per exemple perquè el VEGF 165 és més mitogènic que el VEGF 121, ja que aquest darrer no es lliga a la neuropilina -1). Ha estat descrit també el co-receptor neuropilina-2 (Neufeld, 1999). També existeixen receptors addicionals per al VEGF en les cèl.lules endotelials i tumorals de naturalesa encara no determinada (Joukov, 1997). Els receptors tipus neuropilina, presents a les cèl.lules tumorals, justifiquen el fet que el VEGF pugui actuar eventualment de forma autocrina i protegint contra l'apoptosi a la cèl.lula neoplàstica (Sledge, 2002-I; Harmeý, 2002). D'altra banda, el VEGF pot exercir certes funcions sense actuar sobre els seus receptors; així, recentment, Hutchings i cols (2003) han descrit que el VEGF lligat a la matriu extracel.lular actua sobre les cèl.lules endotelials a través de la seva interacció amb les integrines $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_3\beta_1$ i de manera independent als VEGFR.

Els receptors del VEGF estan expressats a molts teixits normals adults. La seva presència és molt important; per exemple, sense qualsevol dels dos tipus de receptors (VEGFR 1 i VEGFR 2) els ratolins moren *in utero* (Pepper, 1996).

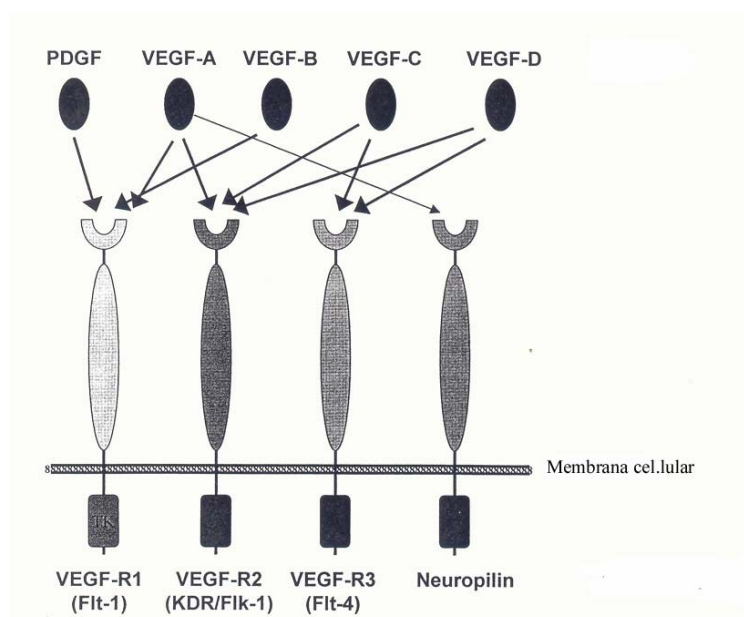


Figura 7: Interaccions dels VEGF amb els seus receptors.

Els receptors per al VEGF - Característiques estructurals.

Està calculat que ténen 1337 aminoàcids. Estan constituïts per tres porcions, una extracel.lular, la segona transmembrana i una tercera citoplasmàtica, que és la que porta un domini tirosin-kinasa. A dos terços del domini extracel.lular, la localització de moltes cisteïnes coincideix entre els receptors fms, kit i PDGFR. Les cisteïnes estan cada 50-60 aminoàcids, i constitueixen 5 ponts disulfur. A més a més, hi ha un fragment només propi dels flt, que fa uns giravolts o "loops" amb altres cisteïnes molt semblants als "loops" fets per les immunoglobulines (hi ha 7 dominis "immunoglobulina-like").

El domini tirosin-kinasa és de 60-70 aminoàcids; és propi de tots els flt, i també als fms, kit i PDGFR. Hi ha però un fragment diferent al flt, en concret manca una petita seqüència que determina la capacitat d'autofosforilació. (Shibuya, 1995; Keyt, 1996-I; Keyt, 1996-II).

Transducció de senyals a la família flt.

Als receptors tipus tirosin-kinasa, s'accepta que el complexe i no conegut del tot procés de transducció de senyals és com segueix: En primer lloc, es produeix una dimerització i posterior oligomerització dels receptors; després, s'esdevé una activació de la tirosin-kinasa i autofosforilació del receptor; encabat, continua amb l'associació de transductors de senyal; posteriorment, fosforilacions varies (per la fosfolipasa C- γ i la fosfatidilinositol 3-kinasa) (Oku, 1998); a continuació, translocació del complexe Grb2-Sos a la membrana cel.lular, activació del ras cap a la forma GTP i activació de la cascada de kinases (Shibuya, 1995).

La interacció del VEGF amb els seus receptors es veu influïda per l'heparina, de forma que la presència d'aquesta pot arribar a inhibir la unió VEGF - Receptor (Gitay-Goren, 1992; Gitay-Goren, 1993). Els receptors són glicosilats. Al cas del VEGFR-2, només la forma glicosilada és capaç d'autofosforilar-se en resposta al VEGF (Neufeld, 1999).

Dintre la cèl.lula, el primer que passa a l'interaccionar el VEGF amb el seu receptor és un increment per quatre de la concentració de calci intracel.lular (Dvorak, 1995). Se sap també que l'òxid nítric actua de segon missatger per al VEGF a les cèl.lules endotelials (Hood, 1998); l'òxid nítric regula el to vascular, la permeabilitat i el creixement capil.lars.

L'expressió dels VEGFR-1 i 2 està influïda per la hipòxia, encara que de manera menys important que el propi VEGF.

Els receptors del VEGF - Característiques funcionals.

A l'*Embriogènesi* hi ha ja receptors per al VEGF a les cèl.lules endotelials, sobretot als estadis inicials i mitjans. Més tard, aquesta expressió ja baixa. En els estudis realitzats, la presència i localització dels receptors endotelials per al VEGF coincideixen amb els teixits amb major expressió d'aquest. El flt-4 ja s'expressa a l'estadi de gàstrula. Segons el teixits, expressen més un tipus o altre de receptor. Es pensa a més que juguen un probable paper al desenvolupament del sistema nerviós central (Shibuya, 1995).

Als *teixits adults*, el flt-1 és detectable a la majoria de teixits normals. N'hi ha molt a la placenta, pulmó, ronyó, cervell, cèl.lules mare hematopoètiques i monocits (Shibuya, 1995; Pötgens, 1995-I).

Expressió dels receptors del VEGF a la fisiopatologia no tumoral.

Alguns estudis demostren el paper dels receptors del VEGF a diversos processos. Sempre van al darrera dels que estudien el VEGF, doncs aquest es va descobrir abans. Així, és previsible que els propers anys es publicuin múltiples articles que descriguin el paper d'aquests receptors a diverses patologies.

Charnok-Jones i cols. (1994) troben VEGF i els seus receptors a la *placenta* al primer trimestre. Així, per primer cop descriuen la presència de receptors del VEGF fora l'endoteli, i es dedueix que el VEGF pot tenir un paper en el creixement i diferenciació del citotrofoblast.

Ergun i cols. (1997) demostren la presència de VEGF i els seus receptors al *testicle*, en concret el flt-1, a vasos, cèl.lules de Leydig i de Sertoli, i el kdr als tubs seminífers i als vasos.

Brown i cols. (1995-I) descriuen a *malalties ampolloses autoimmunes* (pemfigoide bullós, dermatitis herpetiforme i eritema multiforme) la presència de mRNA de VEGF a l'epidermis, i dels receptors flt-1 i kdr a les cèl.lules endotelials de les zones afectades.

Expressió dels receptors del VEGF a la patologia tumoral.

Els receptors per al VEGF són en general poc detectables a les mateixes cèl.lules tumorals i a les línies cel.lulars immortalitzades, a diferència de moltes altres tirosin-kinases. Quan són presents, és sempre als endotelis dels vasos que acompanyen la neoplàsia. Una excepció important és el *coriocarcinoma* (Shibuya, 1995). Una altra la trobem en un article de Gitay-Goren i cols. (1993), que descriuen la seva presència a cèl.lules de melanoma, tot i que no se'n sap el paper exacte. També Fielder i cols. (1997) troben la presència del flt-4 en algunes línies de leucèmia mieloide aguda.

Plate i cols. (1994) demostren als *gliomes* de baix i alt grau la presència de mRNA dels receptors flt-1 i kdr, correlacionant aquesta presència amb l'angiogènesi. Weindel i cols. (1994) obténeren resultats similars a una sèrie de diversos tumors cerebrals. Igualment descriuen aquests receptors Samoto i cols. (1995) a gliomes i *meningiomes*, Wizimag-Voos i cols. (1995) a *hemangioblastomes cerebrals*, Hatva i cols. (1995) a tumors cerebrals primaris i *metàstasis cerebrals de melanoma*, i Leung i cols. (1997) a 14 casos d'*astrocitoma pilocític*, que és un tumor molt vascular.

Charnok-Jones i cols. (1994) troben VEGF i el seu receptor al *coriocarcinoma* humà.

Liu i cols. (1995) detecten a 15 línies de *melanoma* la producció de VEGF. A 3 d'elles, a més, troben el receptor kdr (MeWo, A375P i A375MM), suggerint així un probable paper autocrí del VEGF en aquestes línies, apart del paracrí. És amb dues d'aquestes línies (A375P i A375MM) amb les que treballem nosaltres.

Boocock i cols. (1995) observen als endotelis de *càncer d'ovari* la presència de flt i kdr; també el kdr és present a algunes cèl.lules tumorals, suggerint un possible paper autocrí. Brown i cols (1995-II), demostren al *càncer de mamella* ductal infiltrant la presència de VEGF i dels seus dos receptors principals, flt-1 i kdr. Kilic i cols. (1997) descriuen la presència de VEGF i els seus receptors als *tumors de cèl.lules de Leydig* humans.

Warren i cols. (1995) evidencien, a metàstasis hepàtiques de *càncer de còlon*, la presència dels receptors del VEGF a les cèl.lules endotelials intratumorals.

Viglietto i cols. (1995) fan el mateix als *tumors tiroïdals*, veient tant VEGF com llurs receptors.

Katoh i cols. (1995) igualment veuen la presència de kdr a cèl.lules de *leucèmia*. Fielder i cols. (1997), en un terç de malalts amb leucèmia mieloide aguda, troben la presència a les cèl.lules tumorals del receptor flt-4 mitjançant PCR.

Takanami i cols. (1997) correlacionen la presència de VEGF i els seus receptors amb l'angiogènesi i el pronòstic a l'*adenocarcinoma de pulmó* en un estudi a 118 pacients. Volm i cols. (1997), a 109 pacients amb *carcinoma escatós de pulmó*, troben la presència de VEGF i el seu receptor flt-1, tot i que la presència del receptor no correlaciona ni amb l'angiogènesi ni amb el pronòstic.

També al *carcinoma gàstric* humà Tanigawa i cols. (1997), mitjançant immunohistoquímica, demostren la presència de kdr junt al VEGF.

Denhart i cols. (1997), per la seva banda, els descriuen, associant-los amb l'angiogènesi, a les *displàsies i carcinoma escatós de boca i laringe*.

ESTRATÈGIES ANTI-VEGF.

Ja hem vist com el VEGF està implicat a l'angiogènesi tumoral, i a més a més de forma molt significativa, constituïnt probablement el factor angiogènic clau, i essent la via que utilitzen altres moduladors de l'angiogènesi. Agredir la via angiogènica mediada pel VEGF i els seus receptors podria ser doncs el millor dels camins per a la lluita anti-angiogènica (Saleh, 1996). De fet, això ja s'ha investigat emprant diverses estratègies, com veurem a continuació.

Estratègies anti-VEGF amb Anticossos.

Kim i cols. (1993) empen *Anticossos anti-VEGF* a 3 línies tumorals que expressen mRNA del VEGF: glioblastoma, leiomiosarcoma i rabdomiosarcoma. Troben que els Ac anti-VEGF inhibeixen el creixement dels tumors, i més als tumors amb creixement més ràpid. La inhibició és del 70-90% del pes tumoral (no arriba al 100% pel probable paper d'altres cicles autocrins, com per exemple el del bFGF). A més a més, demostren que la inhibició del creixement és per l'efecte sobre l'angiogènesi i no sobre les cèl.lules tumorals: ho demostren *in vitro*, on tant VEGF com els Ac anti-VEGF no afecten els cultius de cèl.lules de melanoma.

Asano i cols. (1995), en una línia de fibrosarcoma, disminueixen el creixement i les metàstasis, i allarguen la vida dels ratolins, utilitzant un *Ac monoclonal contra el VEGF 121*, i a més a més sense efectes secundaris evidents.

Yuan i cols. (1996) demostren a xenoempèlts de glioma, melanoma i adenocarcinoma de còlon

INTRODUCCIÓ

l'activitat antiangiogènica i disminuïdora de la permeabilitat vascular d'un *Ac monoclonal anti-VEGF*, el *A4.6.1*. Borgstrom i cols. (1998), amb l'Ac anti-VEGF *A4.6.1* aconseguen, en ratolins als que prèviament s'havia implantat de forma subcutània esferoides d'una línia de carcinoma de pròstata humana, l'abolició completa de l'angiogènesi i el creixement tumoral, a l'injectar de forma intraperitoneal l'Anticos. Presta i cols. (1997) empren aquest mateix Ac monoclonal (*A4.6.1*) a la línia de rhabdomiosarcoma *A673*, però en aquest cas prèviament l'humanitzen (l'Ac original és murí, i aquests autors substitueixen diferents regions de l'Ac murí per fragments d'Ac humà similars, sense que perdi la seva eficàcia).

El darrer pas en aquest desenvolupament d'Ac monoclonals anti-VEGF el constitueix el bevacizumab. El bevacizumab (RhuMAb-VEGF bevacizumab; Avastin^R, Genentech, South San Francisco, CA) és un Ac monoclonal recombinant humanitzat, que reconeix totes les isoformes actives conegudes del VEGF, i constitueix la comercialització de l'Ac monoclonal *A4.6.1* esmentat al paràgraf anterior (Chen, 2001; Margolin, 2002). S'ha emprat ja en assaigs clínics en fase I i II amb eficàcia, encara que discreta (Yang, 2003). No exempt d'efectes secundaris, entre els que destaquen la febre, cefalea, proteinúria, hipertensió arterial, i sobretot episodis tromboembòlics i hemorràgics que han resultat ocasionalment mortals (Rosen, 2002).

Estratègies anti-VEGF amb experiments de transfecció genètica.

Claffey i cols. (1996), a la línia de melanoma humà SK-MEL-2, poc productora de mRNA del VEGF inclús en condicions hipòxiques, li transfecten el *cDNA del VEGF en sentit i antisentit*. Una vegada han comprovat que les transfeccions han estat exitoses i la proteïna és funcional, injecten les cèl.lules de melanoma així transfectades (en sentit, antisentit, i grup control) per via subcutània a ratolins nus, i demostren que les transfectades en antisentit generen tumors menors, menys vascularitzats, i amb menor nombre de metàstasis pulmonars; no valoren l'efecte sobre la supervivència perquè sacrifiquen els ratolins als 21 dies.

S'han publicat diversos articles referents a tractament anti-VEGF *amb transfecció genètica antisentit al glioma*. Saleh i cols. (1996), al glioma C6 de ratolí. Cheng i cols. (1996), en el mateix tipus de tumor (línia U87MG de glioblastoma multiforme). Nguyen i cols. (1998), a diverses línies tumorals, una d'elles de glioma, introdueixen el factor a les cèl.lules tumorals mitjançant un Adenovirus, *in vitro*; Im i cols. (1999) fan el mateix *in vivo* (mitjançant adenovirus, a una línia de glioma humà). Ma i cols. (1998) inhibeixen també el creixement del glioma *in vivo*

amb tractament antisentit anti-VEGF, aquesta vegada transfectat mitjançant liposomes.

Oku i cols. (1998) també introdueixen el cDNA del VEGF en sentit i antisentit a cèl.lules de melanoma SK-MEL-2 i les xenoemplanten a cervell de ratolins, demostrant igualment un efecte inhibidor del creixement gràcies al tractament antisentit.

Chen i cols. (1997), mitjançant un experiment amb *antisentit contra el proto-oncogen ETS1*, inhibeixen l'angiogènesi induïda pel VEGF (demostran així a més la implicació del ETS1 a l'angiogènesi).

Ellis i cols. (1998), a una línia de càncer de còlon humà, li transfecten un vector amb *el gen c-src en antisentit*, i aconseguen reduir amb aquesta transfecció l'angiogènesi i l'expressió del VEGF, inclús en condicions d'hipòxia. El mateix grup (Ellis i cols., 1996), dos anys abans, a càncer de còlon humà *in vitro*, estudien l'efecte sobre el creixement de les cèl.lules endotelials de la inhibició de la producció de VEGF. Tien dues línies de càncer de còlon humà, una poc productora de forma constitutiva de VEGF, i l'altra molt productora. A la poc productora, li transfecten cDNA del VEGF en sentit, i a la molt productora, cDNA del VEGF en antisentit. El medi de cultiu de les dues línies es veu afectat com és previsible: augment del VEGF secretat a la primera, i disminució a la segona. A l'afegir aquest medi condicionat al cultiu de cèl.lules endotelials, aconseguen estimular el creixement d'aquestes amb el medi del cultiu on s'havia transfectat el VEGF en sentit, i inhibir-lo amb el medi on el que hi havia era el VEGF en antisentit.

Smyth i cols. (1997), amb *oligonucleòtids antisentit anti-VEGF*, aconseguen inhibir l'expressió del VEGF als queratinocits normals, obrint una possible via de tractament sobre patologies que concórren amb l'angiogènesi com la psoriasi.

Estratègies anti-VEGF actuant sobre el sistema dels receptors per al VEGF.

Millauer i cols. (1994) transfecten una mutació a cèl.lules de glioblastoma mitjançant un retrovirus defectiu; la mutació consisteix en l'adquisició *d'un mutant negatiu dominant per a l'expressió del receptor del VEGF flk-1 (kdr)*. Troben que el tumor així transfectat creix menys, de forma dosi-depenent i reversible: al deixar d'inocular el virus, cessen els efectes. Demostren així la possibilitat d'una teràpia gènica i resta importància al paper del flt-1.

Lin i cols. (1998) construeixen un *receptor soluble del VEGF* fusionant la porció extracel.lular del flk-1 murí amb una Tag amb 6 histidines a la part carboxi-terminal. *In vitro*, lliga amb el

INTRODUCCIÓ

VEGF amb alta afinitat, i inhibeix els seus efectes. Administrat *in vivo*, aconsegueix també reduir l'angiogènesi i creixement tumorals.

Kendall i cols. (1993) inhibeixen el sistema VEGF-receptor creant també un receptor soluble per al VEGF, de forma que aquest es lliga de forma altament específica al factor i inhibeix l'efecte d'aquest als endotelis. En aquest cas el receptor soluble reproduïx els dominis extracel·lulars de lligam al VEGF del receptor *fms-like tirosin kinasa*, però no conté la regió transmembrana ni els dominis tirosin-kinasa intracel·lulars.

Ramakrishnan i cols. (1996) aconsegueixen bloquejar l'angiogènesi i creixement tumorals d'una línia d'hemangioma murí a través de la inhibició del sistema del receptor flk-1/kdr. Ho fan mitjançant la creació d'un conjugat amb VEGF₁₆₅ recombinant junt a un fragment de la toxina diftèrica. Olson i cols. (1997), basant-se en què els receptors per al VEGF es sobre-exprésen a les cèl·lules endotelials dels tumors, mentre que són absents als endotelis normals, preparen un reactiu lligant VEGF recombinant amb una forma truncada de la toxina diftèrica. Injeccionat el conjugat de forma intraperitoneal a ratolins atímics portadors de tumors ovàrics subcutanis humans xenoemplantats, aconsegueixen inhibir el creixement del tumor, produint-li necrosi hemorràgica (evidència del dany vascular), sense toxicitat sistèmica.

Strawn i cols. (1996) descriuen una sèrie de compostos químics que inhibeixen l'activitat tirosin-kinasa del receptor flk-1 quan aquest és activat pel VEGF. Menrad i cols. (1997) construeixen dos Ac específics contra el VEGFR 2 (kdr), fàcilment detectables i capaços d'interaccionar amb cèl·lules vives, que poden ser candidats a ser emprats en estudis diagnòstics i inclús terapèutics.

Skobe i cols. (1997) utilitzen un Ac que bloqueja el VEGFR 2 (kdr), evitant així l'angiogènesi i la invasió, sense reduir la capacitat proliferativa del tumor, al carcinoma escatós de pell. Existeix ja en assaig clínic el DC-101, un Ac monoclonal anti-domini extern del kdr (Sledge, 2002-I).

Aiello i cols (1995), en un estudi anti-VEGF a la neovascularització retiniana a la retinopatia diabètica, fabriquen quimeres constituïdes per IgG i proteïnes que identifiquen els receptors flt i kdr. A l'injectar-les intra-vitri, antagonitzen el VEGF bloquejant el receptor, i aconsegueixen reduir la neovascularització en un 95-100%.

Soker i cols. (1997) segueixen la següent estratègia: De les isoformes del VEGF, les més abundants són la 121 i la 165. La diferència estructural principal entre la 121 i la 165 és que la 165 té 44 aminoàcids codificats per l'exó 7, que no té la 121. S'ha descrit recentment un nou receptor exclusiu del VEGF 165, el VEGF-165-R, el qual s'uneix al domini codificat per l'exó 7. Aquí bloquegen aquesta unió amb una proteïna de fusió dirigida contra aquest domini, demostrant que així inhibeix l'angiogènesi mediada pel VEGF 165. Ho fan *in vitro* a cèl·lules

derivades de la vena umbilical i amb una línia tumoral.

Siemeister i cols. (1998) generen una *variant heterodimèrica recombinant de VEGF*, de manera que aquest heterodímer aconseguix unir-se als receptors, però bloqueja l'autofosforilació d'aquests, necessària per al seu funcionament. Incrementant la proporció d'aquest heterodímer de forma adequada aconseguix bloquejar gairebé de forma complerta l'angiogènesi.

Dennis i cols. (1998) tracten *in vitro* una línia de melanoma humà (C8161) amb un *oligonucleòtid antisentit* que inhibeix específicament l'expressió de la *protein-kinasa C- α* . Aconseguixen d'aquesta manera inhibir en un 75% les metàstasis a l'injectar la línia així modificada a ratolins atímics per via endovenosa.

Les darreres generacions, ja en assaigs clínics, són el *SU5416* i el *SU6668*. El *SU5416* (Semaxanib; SUGEN, Inc, South San Francisco, CA) és una petita molècula inhibidora del kdr, el Flt-1 i el c-kit, i ha mostrat resultats clínics prometedors. És un inhibidor competitiu, inhibint l'activitat kinasa del kdr. Ha inhibit el creixement tumoral i metàstasis en diversos models animals. Avaluat actualment en diversos assaigs clínics (Rosen, 2002). El seu principal risc és tromboembòlic (Margolin, 2002); de fet, combinat amb quimioteràpia (cisplatí i gemcitabina) va resultar en una incidència molt alta d'infart de miocardi, accident cerebro-vascular i accidents tromboembòlics, remarcant el desconeixement que tenim de la potencial toxicitat d'aquests agents, sobretot quan es combinen amb els tractaments convencionals (Bachelot, 2003). El *SU6668* és un inhibidor de la tirosin-kinasa via oral, amb múltiples dianes (kdr, bFGF-R i PDGF-R), que ha funcionat bé en models animals, i és actualment en assaigs clínics en fase I (Herbst, 2002). El *ZD4190* és un inhibidor via oral dels receptors tirosin-kinasa kdr i Flt-1 que de moment ha demostrat ja eficàcia en models animals, en diferents tipus de tumors xenoempeltats en ratolins atímics (Wedge, 2000). El *PTK787/ZK222584* (PTK/ZK; Novartis) és un inhibidor via oral dels VEGFR 1 i 2 que ha demostrat eficàcia en models murins, i actualment és en estudis en fase I; la toxicitat és manejable, consistint bàsicament en mareig, atàxia, nàusees, vòmits i hipertensió arterial; ha aconseguit estabilitzar la malaltia a alguns casos de metàstasis hepàtiques de càncer de còlon (Thomas, 2003).

També s'han emprat *Ribozimes*, que són petits fragments oligonucleòtids de RNA amb capacitat catalítica específica, que selectivament es lliguen i tallen RNAs diana específics. Hi ha ribozimes contra els VEGF-R kdr i Flt-1. Han tingut bon resultat en models animals, i actualment n'hi ha un, l'angiozima, dirigit contra el VEGFR-1 (Flt-1) que està en fase II (Sledge 2002-I; Sledge 2002-II; Herbst, 2002; Margolin, 2002).

Estratègies anti-VEGF: Miscel·lània.

Hu i cols. (1995) intenten atemptar contra el sistema del VEGF amb *lavendustina*, que és un inhibidor de tirosin-kinasa, i no ho aconsegueixen.

La *suramina*, un agent antiangiogènic ja conegut i que ja s'empra en assaigs clínics, actua contra el sistema del VEGF. La suramina és un inhibidor dels factors de creixement que lliguen l'heparina, entre els que es troba el VEGF (Hu, 1995). Actualment en assaig clínic al melanoma (<http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/>).

Petit i cols. (1997) aconsegueixen inhibir l'angiogènesi i la producció de VEGF mitjançant la introducció d'un *Ac dirigit contra receptors de l'EGF* (Epidermal Growth Factor), demostrant que l'efecte oncogènic d'aquests receptors (que són tirosin-kinases) ve mediat almenys en part per l'activació de la via del VEGF, i reforçant així la hipòtesi que la via del VEGF és una via final comú per a molts mecanismes angiogènics.