

INFLUÈNCIA DE LES MUTACIONS K-RAS EN EL FENOTIP ANGIOGÈNIC

K-RAS I NEOVASCULACIÓ EN CARCINOMES DE CÒLON I RECTE:
EFECTES SOBRE LA PROGRESSIÓ TUMORAL I ANGIOGÈNICA DE
FIBROBLASTES NIH3T3 TRANSFECTATS AMB MUTACIONS K-RAS
INOCULADES A DIFERENTS CONDICIONS.

Dirigida per:
Dr. Gabriel Capellà

TESI presentada per na Agnès Figueras i Amat per a optar al títol de Doctora en
Biologia

Barcelona, Març del 2006

A l'avi Lluís,

als meus pares,

a la Jana, a en Guim

i a en Josep M^a

Si llegiu les paraules d'aquest manuscrit sentireu la meua veu però escoltareu un equip de persones que han treballat amb gran esforç. Començant pels més implicats estretament en aquest projecte des del principi, fins als que en els darrers temps han entrat a sumar força. La ciència és el conjunt de coneixements resultants d'uns estudis que, en una opinió personal, arribarà més lluny com més siguem pensant, i mai ningú individualment no arribarà a les fites d'un bon equip. Aquest treball és el resultat del què ha estat per a mi un molt bon equip; moltes gràcies per deixar-me pensar amb vosaltres.

La meua història professional i de contacte amb la ciència i l'oncologia no ha estat només aquest projecte. En aquest camí he avançat al costat de gent molt competent i professional. M'heu donat bones oportunitats, m'heu ensenyat els vostres coneixements i també sou part d'aquest moment. Gràcies per ensenyar-me a començar.

De 35 anys de vida em queden amics als que he marejat aquest temps, segurament més del compte. Gràcies per haver aguantat fermes.

Als de casa, gràcies per ensenyar-me les opcions, gràcies per donar-me opinió sincera, gràcies perquè sempre m'he sentit recolzada després de triar el camí. En la realització d'aquest projecte també ho heu fet i no era senzill. L'agraïment més especial deixeu-me que el doni a les tres persones que comparteixen la vida amb mi i han patit més el dia a dia d'aquest projecte. Moltes gràcies.

Moltes gràcies a tots, considero que tinc molta sort de poder agrair.

Agnès

índex



ÍNDEX

HIPÒTESI i OBJECTIUS

RESUM

INTRODUCCIÓ

K-RAS

Gen i proteïna

Vies de transducció del senyal

Ras i càncer

Carcinomes de còlon i recte i K-Ras

EL SISTEMA CIRCULATORI

Concepte

Estructura histològica d'un vas sanguini

Estructura d'un vas tumoral

ANGIOGÈNESI

Concepte

Allau d'esdeveniments angiogènics

Angiogènesi switch

FACTORS ANGIOGÈNICS

VEGF: Factor vascular de creixement endotelial

Gen VEGF

Funcions del VEGF-A

Regulació del VEGF-A

Receptors del VEGF-A

Angiopietines

Funcions

Receptor cel·lular TIE2

Trombospondina-1

Regulació

Funcions

METALOPROTEÏNASES

Concepte

Funcions

Regulació de les MMPs

MMPs i angiogènesi

ANGIOGÈNESI I CÀNCER

Factors angiogènics i càncer

MMPs i càncer

ANGIOGÈNESI I RAS

MATERIAL I MÈTODES

CULTIUS CEL·LULARS

Descripció dels transfectants K-Ras.

Medi de cultiu

Congelació i descongelació dels clons de NIH3T3

Obtenció de medis condicionants

Estimulació cel·lular amb VEGF

Recollida de les cèl·lules en cultiu i extracció d'RNA amb Trizol

ESTABLACIÓ I INOCULACIÓ DELS RATOLINS ATÍMICS

Descripció del model animal

Procediment d'inoculació subcutànea

Processament de les mostres tumorals subcutànies

CARCINOMES HUMANS DE CÒLON I RECTE

Descripció de la sèrie

IMMUNOHISTOLOGIA

Realització i procediment de talls histològics

Immunohistoquímica

Molècula d'adhesió plaquetària 1 de ratolí en les cèl·lules endotelials:

PECAM-1

Factor de creixement de l'epiteli vascular: VEGF

Marcatge del vasos sanguinis i macròfags amb lectina de tomàquet

Marcatge específic de macròfags

Marcatge de CD31 humà i VEGFR2 humà

Immunofluorescència

Molècula d'adhesió plaquetària 1 de ratolí en les cèl·lules endotelials:

PECAM-1

Doble immunofluorescència de PECAM amb: desmina o α -SMA

Valoració i quantificació dels marcatges immunohistològics

OBTENCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

Lisi de cèl·lules en cultiu i tumors: Extracció de proteïnes

Lisi específica per la zimografia

Quantificació de proteïnes

ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT

Electroforesi

Transferència

Detecció de l'antigen

Revelat quimioluminiscent

ANÀLISI DE PROTEÏNES PER ELISA

VEGF murí per ELISA

ZIMOGRÀFIA

Electroforesi

Incubacions i revelats de les activitats enzimàtiques

Valoració de les activitats enzimàtiques

NORTHERN BLOT

Electroforesi desnaturalitzant

Transferència per capil·laritat

Marcatge de la sonda radioactiva

Hibridació de la membrana amb la sonda

Revelat i valoració de les mostres

RESULTATS

DIFERÈNCIES EN EL CREIXEMENT TUMORAL DELS TRANSFECTANTS DE K-RAS

Latència tumoral

Creixement tumoral

DIFERÈNCIES EN EL FENOTIP VASCULAR

Anàlisi de la densitat vascular

Anàlisi de la proliferació endotelial i tumoral *in vivo*

Anàlisi de les cèl·lules murals

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE FACTORS ANGIOGÈNICS

Augment diferencial de l'expressió del VEGF

Anàlisi de l'expressió i l'activitat VEGFR2 *in vitro*

Estabilitat de la Trombospondina-1

Estudi de les angiopoietines

DEGRADACIÓ DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

Les MMPs més relacionades amb l'angiogènesi: MMP2, MMP9 i MMP14

Expressió diferencial de MMP7

Regulació en l'expressió de TIMP-2

ESTUDI DELS CARCINOMES DE CÒLON I RECTE

Anàlisi de l'expressió de les MMPs segons la mutació en K-Ras.

Anàlisi de les relacions entre el fenotip vascular i les mutacions en el gen K-Ras.

Anàlisi de l'expressió de MMPs segons la mutació de K-Ras.

DISCUSSIÓ

La importància de la naturalesa molecular de la mutació K-Ras.

Diferències en el fenotip vascular tumoral.

Dependència dels factors angiogènics sobre el creixement *in vitro* i *in vivo*.

Estudi de l'expressió de les MMPs i l'angiogènesi.

Estudi de la densitat vascular i la detecció de VEGFR2 en carcinomes colorectals humans

Consideracions

CONCLUSIONS

ABREVIATURES

REFERÈNCIES

hipòtesi i objectius



HIPÒTESI

Les mutacions en el codó 12 o 13 de l'oncogen K-Ras, determinen diferències en les cèl·lules tumorals i el seu microambient. També desenvoluparan diferencialment el fenotip angiogènic.

OBJECTIUS

- VALORACIÓ DE LA CONTRIBUCIÓ DE LES MUTACIONS PUNTUAL EN EL GEN K-RAS EN EL FENOTIP ANGIOGÈNIC DELS TUMORS.

*Influència sobre l'expressió gènica dels factors angiogènics. (*in vitro i in vivo*)

- a/ Estudi de l'expressió del VEGF
- b/ Estudi de l'expressió TSP-1
- c/ Estudi de l'expressió angiopoietines.
- d/ Estudi de l'expressió MMPs

*Influència sobre el fenotip vascular. (*in vivo*)

- a/ Estudi in vivo de la densitat vascular.
- b/ Estudi in vivo de la morfologia vascular.

- CORRELACIONAR LES DIFERÈNCIES DEL FENOTIP VASCULAR AMB EL PRONÒSTIC I EL DIAGNÒSTIC DE TUMORS HUMANS.

RESUM

Una simple mutació en el gen K-Ras comporta transformació cel·lular. Les cèl·lules tenen pocs punts de transició que puguin determinar d'aquesta manera tan important el comportament cel·lular. Fins al punt que hi ha diferències entre diferents mutacions puntuals del mateix gen. Així va quedar demostrat que el creixement dels tumors subcutanis de NIH3T3 amb mutació en el codó 13 (G:T - A:T/ Gly-Asp ASP13) tenen un període de latència més llarg però creixen més ràpid que els tumors NIH3T3 amb K-Ras mutat en el codó 12 (G:T - A:T/ Gly-Cys CYS12).

En front a aquests resultats postulem que les mateixes mutacions puntuals en el gen K-Ras que determinen diferents fenotips de cèl·lules tumorals poden determinar diferències angiogèniques en els tumors que desenvolupen.

Els marcatges específics amb anticossos de PECAM, desmina, α -Actina de la musculatura llisa i macròfags assenyalen que els tumors amb CYS12 tenen major densitat de vasos sanguinis però hem trobat diàmetres més grossos i més cèl·lules desmina positives al voltant dels vasos sanguinis dels tumors ASP13. La proliferació endotelial no ens aporta diferències entre els diferents tipus de tumors en un moment de creixement tumoral ja consolidat.

Han estat analitzats els nivells de VEGF i els tumors amb mutació ASP13 expressen més aquest factor de creixement endotelial que no els tumors amb mutació CYS12. El fet de que *in vitro* també es denotin aquestes diferències ens remarca que la diferència mutacional en Ras és determinant. La presència d'altres cèl·lules de suport que hem descrit en els tumors ASP13 podria remarcar aquesta diferència però no de manera exclusiva. El VEGF que estan produint aquestes cèl·lules actua sobre les cèl·lules endotelials. Podem descartar l'efecte autocrí ja que no hem observat expressió ni estimulació del VEGFR2 *in vitro*.

L'angiogènesi depent de la balança entre els factors pro i anti angiogènics. TSP-1, Ang 4 (precursor) i Ang-1 han estat analitzats en aquest sistema per Western Blot. L'expressió de TSP-1 en el sistema *in vivo* ha estat indetectable. En el cas de les angiopoietines observem una tendència dels tumors CYS12 acumular-ne més que els ASP13, però els resultats del Western Blot han estat molt heterogenis. L'absència de TSP-1 dóna força a les accions del VEGF en els tumors ASP13. Sembla que les angiopoietines podrien tenir un paper en el sistema angiogènic dels tumors CYS12.

L'expressió de les MMPs ha estat analitzada per zimografia i Western Blot. *In vitro* no s'ha detectat expressió de MMP9 ni MMP7, d'aquesta manera queda palès que l'expressió d'aquestes metaloproteïnases la realitzen majoritàriament les cèl·lules acompanyants al tumor. Ja està descrit que els macròfags són grans productors de MMP9 i MMP7 i també que la seva expressió pot estar estimulada per citoquines, factors de creixement com el VEGF i molt induïda per l'hipòxia dels macròfags. Es relaciona aquestes dues MMPs amb proliferació i invasió cel·lular, promoció de l'apoptosi i alliberació de factors angiogènics entre altres possibles accions. Per tan afecten el fenotip vascular que hem descrit en els tumors ASP13.

Els tumors amb mutació CYS12 incrementen la MMP2 activa respecte dels tumors ASP13 mentre que aquests segons tenen major expressió de TIMP-2 i MMP14 que els primers. La funció de promoure la migració endotelial que se li atribueix a la MMP2 podria explicar-nos la dispersió de les cèl·lules endotelials i el major número de vasos que observem en els tumors CYS12. TIMP-2 i MMP14 amb la capacitat de moderar la proliferació endotelial i d'estimular la tumoral respectivament poden contribuir a definir el fenotip angiogènic i tumoral dels tumors ASP13.

Hem començat a traslladar aquests resultats en una sèrie de tumors colorectals humans on coneixem les mutacions en el gen K-Ras i disposem d'un seguiment clínic de més de 4 anys. No hem trobat diferències en la densitat vascular però sí una tendència a expressar VEGFR2 en els tumors amb mutació en el gen K-Ras que comporta menys supervivència global.

Aquests resultats confirmen que hi ha diferències angiogèniques entre diferents mutacions del gen K-Ras. Sembla que el VEGF, les metaloproteïnases i les cèl·lules de suport tumorals convergeixen a promoure aquestes diferències. En els tumors humans caldrà tenir més paràmetres per determinar si existeixen diferències.

introducció



K-RAS

GEN I PROTEÏNA

K-Ras és un gen del cromosoma 12, que pertany a una família de tres membres altament homòlegs: H-Ras, K-Ras i N-Ras. Són els oncogens més freqüentment associats a les neoplàsies. Ras es van descriure buscant oncogens transformants. Se'ls va posar aquests noms per ser homòlegs amb els oncogens del virus del sarcoma de Harvey i Kirsten en rata i en el cas del N-Ras, per ser descrit en la línia cel·lular de neuroblastoma SK-N-SH. El gen del K-Ras és el més gran dels tres, amb unes 30 Kb. Tot i que tenen estructures genètiques diferents tots tres codifiquen una proteïna de 189 residus que fa 21 kDa.

Les proteïnes Ras són modificades post-transcripcionalment. Les modificacions més importants, sovint utilitzades per controlar el seu sistema, inclouen: Farnesilació, proteolisis, carboximetil·lació i palmitoilació. Aquestes modificacions seran les que li permetran un ancoratge a la membrana plasmàtica per la zona citoplasmàtica indispensable per la seva funcionalitat.

Les proteïnes Ras són proteïnes GBP (*Guanidine nucleotide Binding Proteins*) implicades en la transducció de senyals transmembrènals. L'intercanvi de la guanosina-difosfat (GDP) per guanosina trifosfat (GTP) les activa i les capacita per transmetre el senyal. Aquest procés requereix de proteïnes que estimulen l'activitat GTPàsica (ex: GAPs) i de factors d'intercanvi de nucleòtid. (ex: SOS i Ras-GRF).

La seva activitat es basa en transmetre el senyal de l'activació de receptors tirosin quinases cap a les vies de traducció de senyal cel·lular que les faran arribar al nucli cel·lular.

S'ha identificat tres dominis funcionals en Ras: 1.- Domini d'unió a la guanosina fosfat. On es localitzen dues de les mutacions més freqüents en els tumors. (Codó 12 i 13) 2.- Domini catalític. Encarregat de la hidròlisi del GDP. 3.- Domini efector. Locus on s'uneixen els efectors de la proteïna i es transmet el senyal d'activació. (ex: Raf , Rho ,PI3K,PKC i altres). L'estat actiu o inactiu de la proteïna determina la conformació d'aquests dominis, la seva unió a la membrana per l'extrem aminoterminal i la seva unió i activació de l'efector de la via de senyalització cel·lular. (Wittinghofer 2005) Dins d'aquest domini efector s'ha descrit dos segments que canvien la seva conformació amb l'activació de la proteïna i que són els llocs d'unió dels efectors, els anomenem switch I (32-40 aa) i switch II (60-72 aa).

VIES DE TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

K-Ras està associat a moltes vies de transducció de senyal les més importants i conegudes són: Via de les **Raf-MAPKs**, Via del fosfatidil inositol tres quinasa (**PI3K**), Via de la **PKC** (Fosfoquinasa C), Via **RalGDS** i altres com les vies relacionades amb l'estrès a través de SRC per exemple. El resultat cel·lular de l'activació d'aquestes vies ens comporta proliferació, migració i invasió cel·lular, ja sigui activament (activant els gens que ens condueixen a aquests fenotip) o passivament. (Inhibint els gens que aturarien el fenotip). Es van descriure primer les allaus de reaccions de les quinases en *Saccharomyces cerevisiae* i ja es va veure que hi havia molts enzims quinases iguals que intervenien en diferents vies activats per diferents estímuls externs. En els humans també s'ha descrit aquesta multiplicitat de vies de les quinases. En molts casos la manca d'una es substituïda per una altra i la seva elevada homologia ho permet. Per tant sabem que en les cèl·lules humanes existeixen múltiples vies de senyalització de MAPKs activades per estímuls externs diferents. Aparentment hi ha creuaments entre elles. Un exemple seria el de PKC, que estaria implicada en l'activació de RAF-1 però també directament pot activar MEKK o fins i tot es creu que podria activar Rho. El control d'aquesta multiactivitat de transducció encara és desconegut.

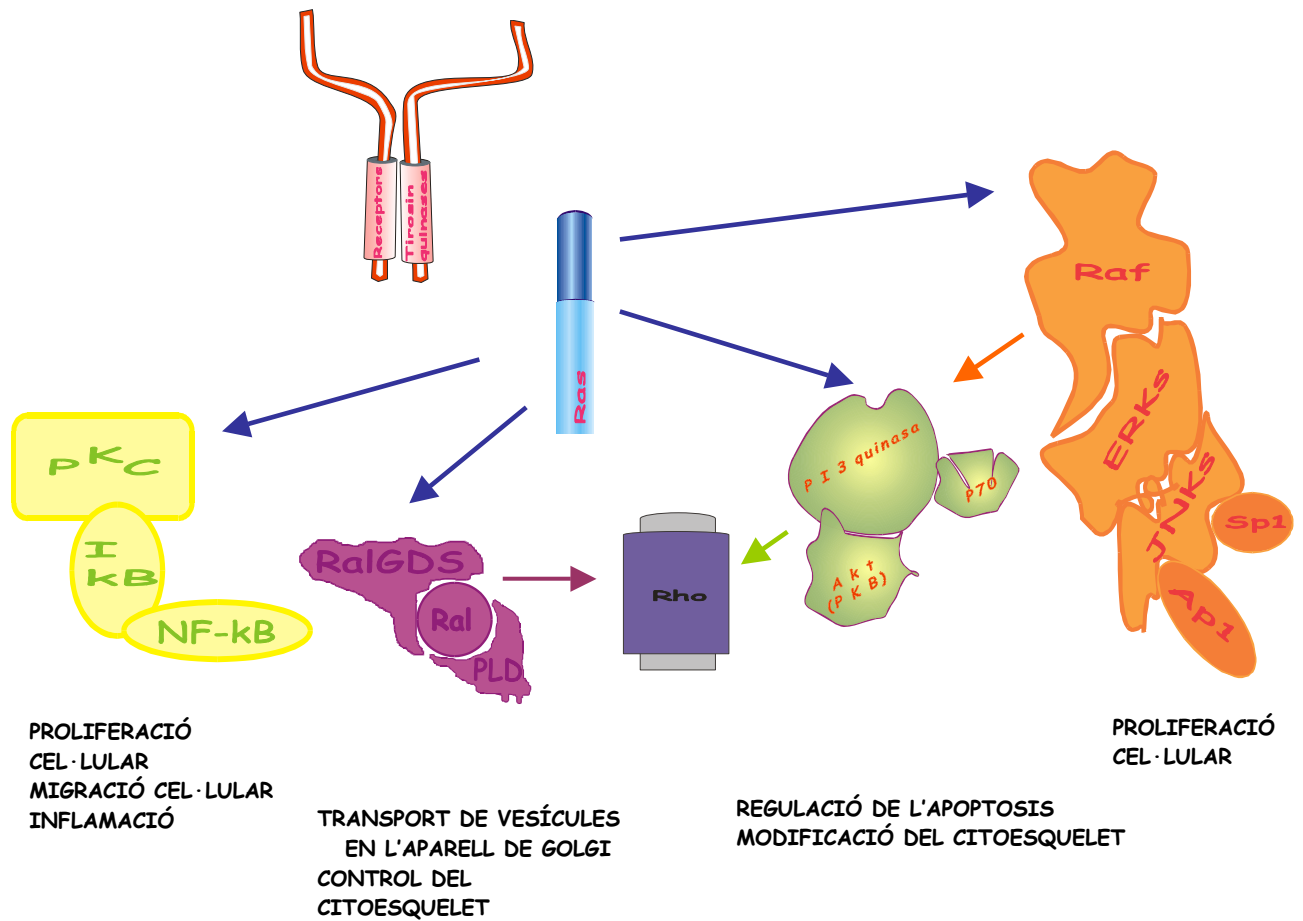


FIGURA: Vies de transducció del senyal de Ras. Aquesta figura representa molt esquemàticament les vies de transducció de senyal on està implicada la proteïna Ras. Hem esquematitzat els quatre principals efectors de Ras i algunes de les proteïnes implicades en cada una de les vies de transducció. En la part inferior de l'esquema hem descrit els efectes que produeix l'activació de Ras un cop arribat el senyal.

En la **via de Raf-MAPKs** l'efector directe de Ras és RAF-1. Una serina-treonina quinasa de 70 kDa. La interacció de RAS amb RAF-1 es realitza a través de l'extrem N-terminal de RAF-1 però no és suficient per activar-lo. És una interacció necessària però no suficient. La unió de RAS amb RAF-1 provoca l'ancoratge amb la membrana i per tant la localització per ser actiu. Es creu que hi ha altres quinases implicades com podria ser PKC. La **via de la PKC** està controlada per Ras amb i sense dependència de Raf i es pot activar en altres punts de la transducció de senyal. S'ha descrit l'activació de I κ B i NF- κ B directament amb Ras PKC, amb Raf i a través de RalGDS/Ral. Aquesta via dona un senyal més de control atenuador del cicle cel·lular. Els substrats de RAF-1 són les MAPKK. Per tan activa la via de les quinases cap SP-1 i AP-1. Està més que demostrat que la via de RAS-RAF-1-MAPKs respon a varis factors mitogènics i que la seva transducció de senyal comporta proliferació cel·lular. També s'ha descrit que la proliferació pot estar activada per altres vies i que l'activació de la via de les MAPK pot estar associada a diferenciació cel·lular i no a proliferació. Aquesta dualitat es creu controlada per l'estimulació dels diferents factors externs que comporten activacions de menys o més durada a l'allau de reaccions de les MAPKs. (Seger and Krebs 1995).

Una altra de les vies més importants relacionades amb Ras és la **via de la PI3K**. PI3K és un enzim quinasa que catalitza la fosforil·lació de PIP₂ (Fosfatidilinositol (4,5) bifosfat) en PIP₃ (Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat) en resposta a moltes citoquines i factors de creixement. S'activa per proteïnes G entre altres i s'ha demostrat que pot ser activada per Ras actiu sense necessitat d'unió a més proteïnes activadores. PI3K i els seus productes activen Akt (També anomenada PKB) i p70^{S6K} (Una quinasa ribosomal). L'Akt influeix en el metabolisme de la fosforil·lació del glicògen i també transmet un potent estímul de supervivència contra l'apoptosi. Per altra banda la quinasa ribosomal p70 participa en el control de translació dels transcrips d'RNA i estimula la síntesis del DNA. Aquesta segona funció, que se li atribueix a aquests enzims requereix de l'activació de la via de les MAPKs quinases. PI3K està relacionada amb proteïnes Rho, sembla que a través de Rac.

Aquest sistema que s'ha descrit és on es relaciona la PI3K amb la regulació del citoesquelet cel·lular.

RalGDS es pot unir a Ras per un locus de l'extrem carboxil i activar el canvi de GDP a GTP en Ral. L'activació de Ral ha estat vinculada amb Cdc42/Rac i amb la fosfolipasa D. A través de Cdc42 està lligada a la regulació de les proteïnes Rho. L'activació d'aquesta família de petites proteïnes G dona un control del citoesquelet cel·lular. És coneixen algunes funcions concretes d'aquestes proteïnes relacionades amb les vies de transducció de Ras: Rho controla l'ensamblatge de les fibres d'actina i la seva adhesió a complexos, Rac regula la formació de les lamel·lipodis i les ondulacions de la membrana citoplasmàtica i que Cdc42 estimula la formació de filipodis.

L'activació de PLD a través de Ral per Ras ha estat relacionada de manera independent a Raf i a la seva allau de reaccions en el metabolisme dels lípids. La fosfolipasa D (PLD) determina un control en el moviment de les vesícules de l'aparell de Golgi; per tan un control sobre la maduració i transport proteic entre d'altres. (Feig, Urano et al. 1996)

RAS I CÀNCER

De les tres formes del oncogèn Ras (Kirsten "K", Harvey "H" i Neuroblastoma "N") , la K-Ras és la més freqüentment mutada en les neoplàsies humanes. El N-Ras és mutat en algunes malalties malignes hematològiques i l'H-Ras es detecta ocasionalment en alguns carcinomes gàstrics o de bufeta. Les mutacions de K-Ras que són més freqüents les localitzem en un 90% en els carcinomes de pàncreas, 50% en els tumors de tiroïdes i còlon i un 30% en els pulmonars i en la leucèmia mielòide. (Bos 1989) (Taula de les freqüències de les alteracions de Ras en tumors humans). L'activació i la mutació dels gens Ras es produeixen en diferents estadis de la malaltia fins i tot en fases pre-malignes depenent del tipus de tumor.

Sovint en la literatura es tracten les alteracions dels diferents gens Ras en conjunt sense tenir en compte els tres gens diferenciats, a mesura que els coneixements sobre aquests gens avancen es constata que no és del tot correcte generalitzar i que cada gen determina unes característiques diferents a la cèl·lula neoplàstica. Les diferències ja es detecten en la unió als activadors GTPàsics i en la conformació que adquireixen les proteïnes unides als activadors i als intercanviadors de nucleòtids. (Vikis, Stewart et al. 2002). També s'ha descrit diferències en les unions dels Ras amb els seus efectors, per tant, determinen la via de transducció de senyal (Oliva, Zarich et al. 2004). Una altra generalització que sovint trobem en els estudis publicats és separar en dos grups d'estudi el gen mutat i gen no mutat sense tenir en compte les diferents mutacions en els gens Ras. Es comencen a descriure diferents característiques cel·lulars *in vitro* i *in vivo* que discriminen les diferents mutacions. La formació de colònies *in vitro* és més elevada en cèl·lules amb mutació en el codó 12 del gen Ras que amb la mutació en el codó 13 (Bos, Toksoz et al. 1985) (Sloan, Newcomb et al. 1990) (Bartsch, Bastian et al. 1998). També s'ha observat diferències en l'agressivitat tumoral, la resposta a teràpies i el pronòstic d'alguns tumors humans. De manera molt generalitzada les mutacions en el codó 12 (En els tres gens Ras) comporten més agressivitat neoplàstica que les que s'ha descrit en el codó 13. (Andreyev, Norman et al. 2001) (Al-Mulla and MacKenzie 2001)

TAULA: FREQUÈNCIES DE LES ALTERACIONS DE RAS EN TUMORS HUMANS.

TIPUS TUMORAL	GEN RAS	FREQUÈNCIA
Adenocarcinoma pancreàtic	K-Ras	90%
Colangiocarcinoma	K-Ras	90%
Carcinoma tiroïdal	H , N , K-Ras	60%
Carcinoma colorectal	K-Ras	40%
Seminoma	N , K-Ras	40%
Carcinoma de l'endometri	K-Ras	40%
Adenocarcinoma pulmonar	K-Ras	30%
Queratoacantoma de pell	H-Ras	30%
Síndrome mielodisplàssic	N-Ras	25%
Leucèmia mieloide aguda	N-Ras	25%
Leucèmia linfoide aguda	N-Ras	20%
Melanoma	N-Ras	15%
Carcinoma de bufeta	H-Ras	10%

CARCINOMES DE CÒLON I RECTE I K-RAS

El carcinoma de còlon i recte s'han utilitzat molt en estudis del gen K-Ras per raons com: la freqüència de la mutació (40%), el coneixement actual del procés tumoral i la facilitat en obtenir mostres en cada nivell. El coneixement de les alteracions genètiques relacionades amb les diferents etapes del carcinoma de còlon ja era prou extens l'any 1989 perquè Eric R. Fearon i Bert Vogelstein plantejessin un model genètic de la progressió tumoral que comença en l'epitel·li hiperplàsic i acaba en el carcinoma metastàtic. Actualment l'estructura bàsica del model es manté i s'ha anat augmentant el coneixement en cada una de les fases. La pèrdua de l'estabilitat genètica és la clau del procés tumoral en els carcinomes de còlon i recte i implica alteracions d'oncogens i gens supressors com: APC ,K-Ras, SMAD4 i TGFR2 i altres alteracions epigenètiques. Les mutacions en el gen K-Ras apareixen en la fase d'adenoma; amb percentatges d'un 10% en adenomes poc avançats (Menys d'un centímetre) i fins a un 50% en adenomes avançats (Més d'un centímetre). Així sembla que la mutació en K-Ras promou el pas d'adenoma a carcinoma però també s'ha demostrat que no és indispensable. L'activació del Ras en fases pre-malignes també s'ha descrit en altres carcinomes: pulmó, moll de l'ós i tiroideu. Les mutacions més freqüents de K-Ras en el carcinoma de còlon i recte són puntuals, l'amplificació del gen només s'ha observat en alt percentatge en algunes neoplàsies gastrointestinals però no en el còlon i recte. Les mutacions puntuals es localitzen en el locus d'unió de GDP, en els codons 12, 13 i 61, provocant un canvi d'aminoàcid. (Kahn, Yamamoto et al. 1987) D'aquesta manera la proteïna K-Ras es manté en el seu estat actiu i desenvolupa el fenotip transformat. (Grady and Markowitz 2002). La mutació en el codó 12 és de les tres la més freqüent i la del codó 61 la menys en el carcinoma de colon i recte. En l'estadi d'adenoma coexisteixen diferents clons neoplàsics amb variabilitat de mutacions que acostumen a

homogeneïtzar-se en l'estadi de carcinoma, essent més freqüent la prevalença de les mutacions en el codó 12.

(Shibata, Schaeffer et al. 1993) En carcinomes de còlon i recte també hi ha estudis que relacionen la mutació en el codó 12 amb més agressivitat tumoral. (Finkelstein, Sayegh et al. 1993).

TAULA: MUTACIONS DE K-RAS EN ELS ESTADIS DEL CARCINOMA DE CÒLON

CLASSIFICACIÓ TUMORAL HISTOLÒGICA	FREQÜÈNCIA DE K-RAS MUTAT
Criptes aberrants	1%
Adenoma tubular	13%
Adenoma vellòs	20%
Carcinoma ductal	90%
Carcinoma	40-50%

La majoria de les comparacions en carcinomes de còlon i recte humans s'han realitzat en grans grups de tumors amb mutació en K-Ras i tumors sense mutació. Desenvolupar un tumor amb mutació en K-Ras augmenta el risc de recaiguda i mort. (Andreyev, Norman et al. 1998). Els estudis que comparen diferents mutacions concretes indiquen que la mutació en el codó 12 i especialment el canvi de glicina a valina desenvolupa un fenotip més agressiu al tumor que les altres possibles mutacions. (Klump, Nehls et al. 2004). Aquesta mutació en els estudis de càncer de colon i recte té un impacte significatiu en la supervivència lliure de malaltia i la supervivència total. Estadísticament baixa la supervivència global i la lliure de malaltia. (Andreyev, Norman et al. 2001) Pocs estudis descriuen les diferències que aporten les mutacions puntuals al fenotip tumoral i cap les que aporten els fenotips angiogènics d'aquests tumors.

EL SISTEMA CIRCULATORI

CONCEPTE

El sistema circulatori manté en continu moviment els fluids del cos. La seva funció és el transport de l'oxigen i els nutrients cap a les cèl·lules i el diòxid de carboni i els residus metabòlics cel·lulars cap als òrgans d'excreció. El sistema circulatori està implicat en la regulació de la temperatura del cos, la distribució de senyals especialment els hormonals i la distribució del sistema immunològic.

En el sistema circulatori s'inclouen el sistema vascular i el sistema limfàtic. El sistema vascular inclou una xarxa de vasos que mantenen la circulació de la sang a través del bombeig del cor. El sistema arterial porta la sang del cor als capil·lars on es produeix l'intercanvi de substàncies i el sistema venós retorna la sang al cor. El sistema limfàtic no té un bombeig intrínsec, funciona per un drenatge passiu.

ESTRUCTURA HISTOLÒGICA D'UN VAS SANGUINI

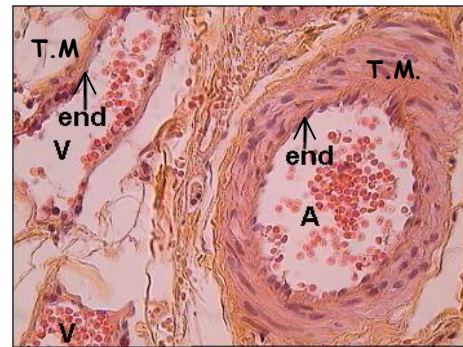
En un vas sanguini sempre se li diferencien tres capes: La Túnica íntima, Túnica mitja i Túnica adventícia. El gruix d'aquestes tres capes determina el tipus de vas sanguini.

A la túnica íntima diferenciem l'endoteli i la seva làmina basal. L'endoteli és un epitelí pla simple i la seva làmina basal té com a component principal el col·lagen. Els endotelis expressen integrines que relacionen les cèl·lules amb la matriu extracel·lular. $\alpha\beta_3$ és una de les més estudiades i considerada la més important en els endotelis humans. S'estan fent estudis d'integrines i proteïnes transmembranales específiques d'endotelials per trobar diferències d'expressió entre els teixits i podrien ser una possible diana en teràpies. (Eliceiri and Cheresch 1999).

La túnica mitja està formada pel revestiment de musculatura llisa que controla el diàmetre del vas i que determina d'aquesta manera el cabal i la pressió sanguínia. Les cèl·lules musculars de la túnica mitja secreten fibres de col·lagen, fibres elàstiques, lamel·les elàstiques i proteoglicans. Aquesta capa està molt ben desenvolupada en les artèries. La capa més externa en els vasos sanguinis s'anomena túnica adventícia i la componen principalment fibres de col·lagen. Les **artèries** són el grup de conductes sanguinis encarregats de distribuir la sang pel cos humà des del cor. Les anomenem segons el seu

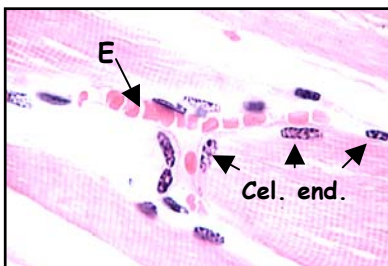
diàmetre de més a menys tamany: artèries elàstiques o grosses, artèries musculars o mitjanes i arterioles. Les elàstiques surten del cor, passen a ser musculars quan es ramifiquen i en els òrgans arriben a ser arterioles. Aquestes últimes tenen menys de 0'5 mm de diàmetre.

Les característiques histològiques principals són la constitució de les seves capes i la definició circular de la llum. L'endoteli té una làmina basal gruixuda augmentada per una làmina subendotelial muscular i elàstica. La túnica mitja és la més gruixuda en les artèries. Els feixos de musculatura llisa es disposen en espiral sobre l'eix longitudinal del vas i secreten elastina en fulls o lamel·les, reticulina, fibres de col·lagen i altres proteoglicans encara per identificar. En la túnica adventícia els fibroblats són el tipus cel·lular principal acompanyats per macròfags i en el cas de les artèries de diàmetre mitjà trobem alguns adipòcits i predominen les fibres de col·lagen i les elàstiques sense formar lamel·les. Les fibres elàstiques s'acumulen en la zona perifèrica de la túnica formant l'anomenada capa elàstica externa. En aquesta capa es localitzen els vasos que reguen les diferents túniques d'altres vasos, aquest sistema s'anomena "*vasa vasorum*".



FOTOGRAFIA MICROSCÒPICA
VENA/ARTÈRIA A: arteriola V: vena petita. END: endoteli T.M.: túnica mitja (Capes musculars) Podem observar clarament les diferències: Regularitat de la llum del vas, l'arteriola té 8 capes de cèl·lules musculars i la túnica mitja és la més gruixuda en canvi en la vènula pràcticament no s'observava.

Els **sistema venós** forma els conductes que recolliran la sang dels òrgans i la retornaran al cor. Com les artèries es divideixen en tres grups segons el seu diàmetre (Grans venes, venes mitjanes i vènul·les) i tenen les tres túniques però no tan ben diferenciades. En contrast amb les artèries la túnica adventícia és la més desenvolupada en les venes i la llum vascular no té un diàmetre tant constant. Aquest tipus de vas sanguini serà l'únic amb vàlvules per evitar el retorn del flux sanguini sobretot en les extremitats inferiors del cos. Les venes tenen l'endoteli acompanyat per alguna cèl·lula muscular llisa. La túnica mitja és molt prima. Conté algunes fibres de col·lagen , fibroblasts i poques cèl·lules musculars. Les venes tenen menys fibres elàstiques que les artèries i no poden mantenir regular el seu diàmetre. La túnica



FOTOGRAFIA MICROSCÒPICA D'UN CAPIL·LAR CONTINU. E: Eritròcits Cel. end.: Cèl·lules endotelials. Aquest capil·lar està situat en un teixit de musculatura estriada.

adventícia és la més gruixuda i està formada per col·lagen, fibres elàstiques i fibroblasts. Les vènul·les que connectaran amb els capil·lars, no tenen cèl·lules musculars en la túnica íntima, tenen pericits i cèl·lules mesenquimals indiferenciades. Els **capil·lars** són els ductes amb menys diàmetre de tot el sistema circulatori. En els capil·lars es realitza l'intercanvi de substàncies entre les cèl·lules circulants i les dels teixits. Les cèl·lules endotelials dels capil·lars controlen aquest transport. Tots el capil·lars estan formats per l'endoteli amb la seva làmina basal , pericits i

cèl·lules mesenquimals indiferenciades però la disposició d'aquests components ens diferencia tres tipus: Continus, fenestrats i sinusoids. Els capil·lars continus com el seu nom indica, no deixen espais entre les seves capes de cèl·lules i per tant controlen la comunicació entre els espais, són la majoria dels capil·lars. Els fenestrats deixen un espai de comunicació que anomenem fenestres i que pot arribar a 80-100 nm de diàmetre. Les fenestracions es formen a partir de vesícules picnòtiques i queden limitades per un diafragma, que està format pels residus del glicocàlix de la vesícula. L'espai queda recobert per la membrana plasmàtica de la

cèl·lula. Permeten el pas ràpid d'algunes macromolècules. Aquests capil·lars els localitzem en les mucoses intestinals i en les glàndules endocrines. En els capil·lars dels glomèruls les fenestracions no tenen diafragma i la làmina basal de l'endoteli és més gruixuda. Els capil·lars sinusoids també anomenats discontinus, es situen en el fetge, a la melsa i en la medul·la espinal i en algunes glàndules endocrines. L'endoteli d'aquests capil·lars té moltes fenestracions sense diafragma, una làmina basal discontinua i abundants fagocits associats. Tenen un lumen més gros i són vasos molt tortuosos. El pas de macromolècules per aquests espais és més abundant que en el cas dels capil·lars fenestrats..

El control del transport varia segons les necessitats del teixit i el tipus de capil·lar. En el cas del cervell existeix la barrera hematoencefàlica, part d'aquesta barrera la formen les *Tight junctions* entre les cèl·lules endotelials que no deixaran cap espai de comunicació entre els dos medis, són contínues. En altres teixits aquestes unions són més laxes i deixen espais de comunicació entre el fluid sanguini i l'espai extracel·lular. També hi ha un control del transport intracel·lular a través de vesícules picnòtiques.

ESTRUCTURA D'UN VAS TUMORAL

Les cèl·lules requereixen d'un subministrament de nutrients i oxigen que els arriba per difusió a un màxim de 100 a 200 μm (micròmetres) més enllà del vas. Per tant totes les cèl·lules que disten més d'aquesta mesura requereixen d'un nou vas sanguini que els porti aquesta proximitat necessària per a la difusió. (Folkman and Klagsbrun 1987). L'angiogènesi és un fenomen indispensable pel creixement dels tumors sòlids des del punt inicial, ja que de seguida es superen les distàncies de difusió. (Carmeliet and Jain 2000) La primera gran diferència entre l'angiogènesi que es produeix en un tumor i la que podem descriure en l'embriogènesi és el creixement accelerat i sense control del teixit i per tant el requeriment del flux de

nutrients i oxigen també molt elevat i sense control. Durant l'embriogènesi el procés es pren el seu

temps i els factors tenen en cada moment la seva justa mesura, està programat perquè les endotelials formen el vas i es mantinguin en l'estat adult un **recanvi (Turn over)** cel·lular de tres anys (En un moment donat només el 0.01% de les cèl·lules endotelials del cos humà s'estan dividint). Els vasos tumorals es formen en un moment quan les cèl·lules perden el control de la seva proliferació. En els tumors com a resultat d'aquest desenvolupament cel·lular descontrolat es generen vasos amb una arquitectura i un flux caòtic. Són molt més **desorganitzats, tortuosos i dilatats**. Les xarxes vasculars en els tumors tenen moltes branques i desviacions innecessàries. Aquests vasos tenen **diàmetres grossos i poques cèl·lules acompanyants**. Les **cèl·lules musculars** al voltant del vasos sovint són **poc existents** i poc efectives això els provoca una manca de control i regulació per part de factors com els canvis de pO_2 i hormonal i el control de la vasodilatació segons les necessitats dels teixits. En conseqüència el **flux** d'aquests conductes és també caòtic i apareixen en el teixit tumoral zones més hipòxiques i acidòfiles. Les cèl·lules endotelials en aquests vasos es separen, **no mantenen les interaccions cèl·lula - cèl·lula** i tenen moltes vacuoles i fenestracions cel·lulars. Tampoc produeixen una **membrana basal continua**. Totes aquestes característiques provoquen un vas amb **moltes fenestracions** i molt **permeable** i que les cèl·lules endotelials creixin una al damunt de l'altre i es projectin cap al lumen del vas, creant així un vas dèbil que té un flux irregular.

Un altre punt important de diferència són l'expressió de **molècules de superfície** en les cèl·lules endotelials. Conèixer les diferències entre les endotelials dels vasos normals i les dels teixits tumorals si existeixen, és un punt molt important per determinar moltes teràpies. Actualment es generen llibreries de pèptids que reconeixen les superfícies endotelials específiques de teixits, s'anomenen *Vascular Zip Codes* (Exemples: RGD i NGR). Les integrines són les molècules més abundants de comunicació entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular i s'està demostrant que són molt específiques de teixit i diferents en els vasos tumorals.

Fisiològicament entenem com angiogènesi la formació d'un nou vas sanguini a partir d'un existent i com a estratègia per aconseguir un bon repartiment dels nutrients. Actualment s'estan observant altres mètodes per aconseguir fer arribar el flux sanguini a les cèl·lules. No entrarem en si podem o no considerar-ho angiogènesi, però en el creixement tumoral es produeixen aquests processos i són eficients.

La paret dels vasos tumorals no sempre està formada per una continuïtat de cèl·lules endotelials, s'ha descrit que pot arribar a estar formada per un 15% de les cèl·lules no endotelials, que siguin tumorals o altres. Hi ha diverses teories de perquè es produeix aquest fenomen que anomenem **mosaic** :

- 1.- Les cèl·lules tumorals que detectem en el lumen del vas, estan envaint donant l'opció de la metastasi. Per tant en realitat no estan formant part del vas
- 2.- Les cèl·lules tumorals estan imitant a les endotelials.
- 3.- Es poden considerar vasos opcionals, no definitius i admitem que temporalment la cèl·lula tumoral està allà.
- 4.- Les cèl·lules endotelials entren en apoptosi i al morir-se deixen a les tumorals formant el lumen vascular.

Malgrat el mecanisme que sigui real cal tenir en compte aquest mosaic cel·lular per determinar teràpies antiangiogèniques i determinar les implicacions en les metastasis.

Altres mecanismes descrits en els processos tumorals són la invaginació i fusió de vasos, la utilització de vasos *co-opted* i la formació de vasos a partir d'angioblasts circulants. S'ha anomenat **invaginació** i **fusió** a la unió de vasos sanguinis per elongació de les cèl·lules endotelials cap a l'exterior del lumen del vas, provocant la fusió amb el vas més pròxim. La formació de nous vasos a partir d'**angioblast** **circulant** que podem trobar en l'adult. Es considera que en el procés carcinogènic la medul·la ossea pot augmentar la producció d'aquests tipus cel·lulars i per tant la possibilitat de crear nous vasos. Anomenem vasos *co-opted* aquells que ja existien en el teixit normal i que el tumor ha envoltat i utilitza com a propis (Carmeliet and Jain 2000)

Per altra banda, hi ha estudis que determinen més funcions que no pas les de formar vasos en les cèl·lules endotelials. Es creu que les endotelials intervenen en la diferenciació dels òrgans que nodreixen. Això s'ha vist en cocultius *in vitro* (Wartenberg, Donmez et al. 2001) i en estudis de la formació del pàncreas i el fetge. (Lammert, Cleaver et al. 2001) Per tant les relacions entre els tumors i les endotelials són més àmplies que no només la formació dels vasos sanguinis i aquest és un punt molt poc treballat.

ANGIOGÈNESI

CONCEPTE

El terme angiogènesi es va crear l'any 1935 per descriure la formació dels vasos en la placenta.(Folkman and Klagsbrun 1987) D'aquesta manera es defineix angiogènesi com a neoformació de vasos sanguinis a partir d'altres existents, procés diferents de la vasculogènesi , on els vasos es formen a partir de cèl·lules del teixit mesenquimal que es diferenciaren en angioblast. Segons la influència de diferents factors, es diferenciaren del plexe del mesoderm cèl·lules endotelials o bé cèl·lules hematopoiètiques. En aquesta diferenciació la família dels factors de creixement vascular i els seus receptors un i dos, tenen la clau per diferenciar i mantenir els dos tipus cel·lulars. La vasculogènesi és més pròpia de l'embriogènesi en canvi l'angiogènesi es produeix en la vida embrionària però no de manera exclusiva. També és produeix angiogènesi en el cicle menstrual, la curació de ferides, en la mamella alletant, en el cicle del pèl, en la resposta immunologia i en situacions patològiques diverses. (Exemples: Artritis reumatoïde, retinopatia diabètica i altres patologies oculars, psoriasis, creixement tumoral i metastàsic...). Dins del procés d'angiogènesi diferenciem l'angiogènesi amb *sprouting* i *no-sprouting*. Parlem d'*sprouting* quan les cèl·lules endotelials del vas existent degraden la membrana basal de l'endoteli migren fins a un nou punt a través

d'estímuls quimiotàctics i formen nous vasos, una nova xarxa. En cas contrari de *no-sprouting* les cèl·lules endotelials es divideixen i avancen formant nou vas a continuació de l'existent.(Risau 1997)

ALLAU D'ESDEVENIMENTS ANGIOGÈNICS

Es consideren esdeveniments angiogènics al conjunt de processos consecutius que es produeixen des de l'existència d'un vas sanguini fins a la formació d'un de nou. Hi ha força consensos en l'ordre d'esdeveniments i és més arbitrari l'agrupament en fases. Podem explicar-ho en tres fases que es caracteritzen per:

Fase d'iniciació: S'esdevenen processos que desencadenen l'estimulació de les cèl·lules endotelials per desenvolupar un nou vas. Coneixem varies causes d'aquest inici i segur que també existiran altres encara desconegudes; la hipòxia o la pressió intersticial entre altres són de les més estudiades. Les conseqüències d'aquests esdeveniment comencen en l'alliberació de factors per part de diferents tipus cel·lulars com: mastòcits, macròfags, cèl·lules tumorals, pericits... o per la mateixa matriu extracel·lular que els conté units. (Exemple: el VEGF s'uneix a l'heparina i una heparinització allibera VEGF). (Bergers, Brekken et al. 2000) Alguns d'aquests factors serien : bFGF, VEGF, TNF- α , angiopoietina 2.

Fase proliferativa i invasora: En aquesta fase es defineixen els efectes de la unió dels factors als receptors. Els senyals portaran en aquests ordre a: canvis en l'adhesió tan cèl·lula-cèl·lula com cèl·lula-matriu, a la divisió cel·lular i a la migració. Aquests canvis cel·lulars comporten dilatació, formació de fenestracions i elongació dels vasos preexistents. Els contactes amb la matriu extracel·lular són molt importants, les integrines i els enzims de digestió de la matriu extracel·lular adquireixen un rol molt rellevant. Es produeix la digestió de la làmina basal. Especialment la MMP-2 i la MMP-9 són les metaloproteïnases més relacionades amb angiogènesi. (Lambert, Wielockx et al. 2003) Les integrines estan

estretament relacionades amb l'activació de les MMPs, i també amb la seva alliberació de forma activa al medi. En aquesta fase és on es localitza la divisió cel·lular de l'endotelial i la migració als teixit adjacents. En aquest punt els enzims de degradació de la matriu extracel·lular tornen a tenir un paper important.(Egeblad and Werb 2002)

Fase de diferenciació: Distribució de les cèl·lules formant una llum vascular, segregació i estructuració de les làmines basals. Unió a altres vasos sanguinis per tancar el circuit. El que s'anomena un *loop* vascular. Estabilització del vas amb la formació de les làmines basals i la unió de les cèl·lules acompanyants com ara els pericits i cèl·lules musculars. En aquests punt s'ha demostrat que l'acció de factors com l'angiopoietina-1 i els seus possibles receptors tirosin quinases (TIE) tenen unes funcions molt importants. (Loughna and Sato 2001) També s'ha descrit que TGF- β , PDGF i algunes interleuquines tenen accions importants en aquests moment de maduració, diferenciació i incorporació de cèl·lules acompanyants en un vas sanguini. (Iivanainen, Nelimarkka et al. 2003)

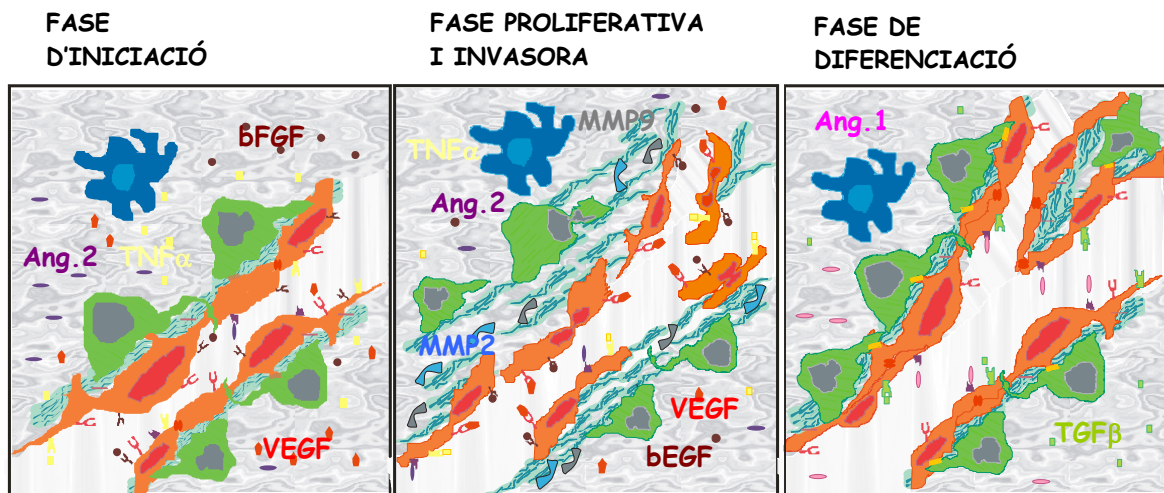


FIGURA: ESDEVENIMENTS ANGIOGÈNICS. Representació esquemàtica de la progressió del procés de formació de nous vasos sanguinis. L'esquema segueix les explicacions de l'apartat de manera simplificada. Els factors i receptors que intervien estan representats en el color del seu nom. Les cèl·lules carbassa representen endotelials, les verdes cèl·lules mural dels vasos i les blaves monòcits/macròfags. Altres detalls són: Plaques d'adhesió entre les cèl·lules mural i les endotelials () i Gap Junctions (), fibronectina i col·lagen de la matriu extracel·lular (), integrines () i filaments d'actina del múscul llis ().

ANGIOGÈNIC SWITCH

L'inici del procés angiogènic depèn de la balança entre els factors angiogènics i antiangiogènics. Si les molècules angiogèniques pesen més en la balança es produirà angiogènesi i en cas contrari s'inhibirà l'angiogènesi. Molts senyals externs i interns a la cèl·lula poden modificar aquesta balança de factors, s'ha descrit: l'estrès metabòlic (Canvis de pO_2 , de pH i d'hipoglucèmia), estrès mecànic (pressió, dany...) resposta inflamatòria i immunològica i mutacions genètiques. Quan parlem d'angiogènesi sobint nomès valorem la resposta de les cèl·lules endotelials a aquestes senyals, però el procés inclou molts altres tipus cel·lulars i sistemes. (Carmeliet and Jain 2000). Molecularment els estudis revelen que hi ha dues famílies de factors que prenen més importància, són més potents a l'hora de decantar la balança: el VEGF i la de les angiopoïetines. (Yancopoulos, Davis et al. 2000) Les funcions atribuïbles al VEGF són en pro a l'angiogènesi junt amb altres factors de proliferació cel·lular com FGF , EGF , PDGF, $TGF\alpha$Les angiopoïetines 1 i 2 són les més relacionades amb l'angiogènesi, les seves funcions estan més discutides però sembla que l'angiopoïetina 1 es classificaria com a anti angiogènica per tenir funcions més estabilitzadores del vas i la angiopoïetina 2 com a pro angiogènica en tan que inhibeix la funció de la angiopoïetina 1. Altres molècules estructurals com la TSP-1 , angiostatina, endostatina, interferò γ han estat sempre associades a l'inhibició d'aquest procés.

FACTORS ANGIOGÈNICS

VEGF: FACTOR VASCULAR DE CREIXEMENT ENDOTELIAL

La hipòtesi de que les cèl·lules en hipòxia, com les tumorals, produïen un factor quimiotàctic que es difonia i provocava l'angiogènesi ja data del 1968. Purificada de l'ascítis d'un hepatocarcinoma de porc de Guinea, Senger va descriure l'any 1983 una proteïna que provocava la permeabilitat vascular 50.000 vegades més eficientment que la histamina. (Senger, Galli et al. 1983) . Aquesta proteïna es va anomenar VPF: Factor de Permeabilitat Vascular. Se li va atribuir la funció de permeabilitzar l'endoteli en molts diferents espais com: pell, teixits subcutanis, pleura, mesenteri, diafragma, múscul de la retina, musculatura esquelètica... que no estaven associades a un dany en les cèl·lules endotelials o altres components del vas sanguini. També es va conèixer que el seu efecte és efectiu en un o dos minuts i desapareix en uns 20 minuts. No va ser fins al 1990 que el propi Senger va poder purificar i seqüenciar la proteïna.

Mentrestant al 1989 Ferrara i Henzel van aïllar i purificar una proteïna del medi condicionant de cèl·lules del folicle pitiutari boví. L'anomenen VEGF i li atribueixen propietats de mitògen específic per cèl·lules endotelials. (Ferrara and Henzel 1989) En el mateix any, 1989 Connolly et al aïllen el VPG humà i el seqüencien. (Connolly, Heuvelman et al. 1989) De seguida s'adonen que el VPF i el VEGF són la mateixa proteïna. (Ribatti 2005)

Gen VEGF

Actualment es coneixen quatre gens diferents de VEGF, els anomenem A, B, C i D. Tots estan codificats en una regió que aproximadament ocupa 14 kb i generen transcrips de 1.2 a 4.5 kb.

Cada gen està localitzat en un cromosoma diferent i les proteïnes que codifiquen tenen 20, 21 o 30 kDa i en alguns casos formen dímers o tetràmers i tenen una maduració post traduccional important. Entre el VEGF A i el B hi ha una homologia del 45% i entre el A, C i el D encara és menor (30%). En canvi hi ha més del 60% d'homologia entre el VEGF-C i el D.(Tammela, Enholm et al. 2005). El més estudiat és el gen VEGF-A té 8 exons i 7 introns que generen *splicings* alternatius. Per cada *splicing* en surt una isoforma diferent de VEGF: 121 , 145, 165, 189 i 206. Actualment s'ha descrit altres possibles *splicings* poc coneguts encara (VEGF: 148 , 162 , 183 o 165B). Les formes més abundants fins ara localitzades són la VEGF 165, 189 i 121. El VEGF 206 només es localitza en els teixits embriològics. El VEGF 145 és el menys mitogènic per les cèl·lula endotelial. L'exó 6 aporta un possible anclatge de la proteïna i per tan varia les característiques del es isoformes, així doncs el més soluble és el VEGF 121 i la meitat del 165, el 145, 189 i el 206 que produeixen les cèl·lules, està unit a proteoglicants heparans sulfats (H.S.) de la matriu extracel·lular. L'anclatge els permet mantenir-se com a reservori que s'allibera amb la lisi de la matriu. Aquests diferents *splicings* encara pateixen modificacions post-traduccional que generen diferents estructures. La glicosilació és la modificació més freqüent però s'ha descrit alguns canvis d'aminoàcids que donen característiques diferents a la proteïna. Uns exemples serien: A/ En el punt 115aa on en els *splicing* 165 i 121 hi ha una lisina i en la resta una asparagina B/ En l'exò 6 és codifiquen aa força bàsics que promouen que la forma 189 que conté aquest exò tingui característiques més bàsiques que les altres. (Tischer, Mitchell et al. 1991) El promotor del VEGF està molt conservat en totes les espècies estudiades: rata, ratolí i humà. Fins i tot els llocs de resposta a factors de transcripció es mantenen. El promotor del ratolí és l'únic però que té un lloc NF- κ B entre les bases -90 i -185. S'ha descrit un domini promotor encriptat en una zona que es considerava no codificant en 5'. Aquest nou promotor està localitzat en el +632 *downstream* de l'inici clàssic. Sembla que és totalment independent de l'altre promotor. És insensible a la hipòxia però se li

atribueixen alguns elements de resposta que es localitzen *upstream* del seu punt d'inici.(Akiri, Nahari et al. 1998)

TAULA: GENS I *SPLICINGS* DEL VEGF

	CROMOSOMA	<i>SPLICING</i> (Exons)	CARACTERÍSTIQUES	RECEPTOR
VEGF A 121	6p23.1	1,2,3,4,5,8	Soluble	VEGFR1, VEGFR2
VEGF A 145		1.2.3.4.5.6.8	Poca potència mitogènica endotelial. Unit a la matriu extracel·lular (H.S.)	VEGFR2
VEGF A 165		1,2,3,4,5,7,8	50% Soluble 50% Unit a la matriu extracel·lular (H.S.) Màxima potència mitogènica endotelial	VEGFR1, VEGFR2, NEURO- PILINS
VEGF A 189		1,2,3,4,5,6,7, ,8	Unit a la matriu extracel·lular (H.S.)	VEGFR1, VEGFR2
VEGF A 206		1,2,3,4,5,6, 6',7,8	Funcions en embriogènesi Unit a la matriu extracel·lular (H.S.)	
VEGF B	11q13		Unit a la matriu extracel·lular (H.S.) Abundant en teixits musculars i pancreàtics.	VEGFR1
VEGF C	4q34		Funcions linfoangiogèniques	VEGFR2, VEGFR3
VEGF D	Xp22.31		Funcions linfoangiogèniques	VEGFR2, VEGFR3

Funcions del VEGF-A

El VEGF s'uneix al seu receptor desencadenant la transducció de senyals que portarà a les cèl·lules a la **proliferació i a la migració**. La proliferació i migració de la cèl·lula endotelial i la **permeabilitat vascular** són les principals funcions que s'ha descrit per aquest factor.

VEGF i embriogènesi

En el procés d'embriogènesi el VEGF-A està implicat en vasculogènesi i angiogènesi. Una de les funcions és promoure la diferenciació de la cèl·lula mesenquimal a angioblast per determinar si serà una cèl·lula endotelial o hematopoiètica. També realitza les seves funcions més descrites de mitògen endotelial, quimiotàctic per la migració de les endotelials i permeabilitzador del vasos sanguinis.

Només amb la inactivació d'un al·lel del VEGF-A és letal per l'embrió entre el dia 11 i 12. Pocs gens són tan agressius i assenyalen la seva importància en aquest moment del desenvolupament.

VEGF post-natal

Progressivament el VEGF-A es redueix després del naixement (Tant circulant com en teixits) i les cèl·lules endotelials es tornen quiescents. Tenen un recanvi de 3 anys.

L'expressió del VEGF es concentra en moments del cicle menstrual femení (Cos luti dels ovaris, formació de l'endometri uterí...) i en els moments de renovació de les endotelials.

El propi fenomen de l'angiogènesi es redueix a aquests moments naturals i a un conjunt d'estats patològics com: artritis, retinopaties, reparació de ferides, creixement tumoral La funció del VEGF-A en aquests moments són les ja descrites: proliferació, migració endotelial i permeabilitat vascular.

Regulació del VEGF-A

La regulació fisiològica principal del VEGF-A és a través de la hipòxia i la hipoglucèmia., per falta dels components principals que necessiten les cèl·lules per la seva supervivència. És una

regulació molt potent que pot desencadenar l'angiogènesi fins a subministrar l'oxigen i els substrats energètics en les proporcions cel·lulars necessàries. (Acker and Plate 2002) Altres mecanismes de control de la concentració d'aquesta proteïna són la producció i funcionament d'altres gens i proteïnes, alguns exemples serien: Ras (Rak, Mitsuhashi et al. 2000), src, fos, v-src, p53 (Zhang, Yu et al. 2000; Acker and Plate 2002) , c-Myc (Barr, Campbell et al. 2000), NO, erb-B (Hsieh, Chen et al. 2004) i citoquines com el TGF- β o α (Gille, Swerlick et al. 1997) La producció d'hormones com els estrògens també s'ha relacionat amb la producció de VEGF-A. Aquest control està relacionat amb un element de resposta als estrògens localitzat en una zona que es podria considerar promotor. (Hyder, Huang et al. 2000) Fins i tot hi ha estudis que relacionen la producció de VEGF-A de les cèl·lules amb una pressió mecànica i amb l'edat de l'individu. De manera que un augment de pressió o una edat avançada fan disminuir la producció de VEGF. (Gan, Miocic et al. 2000; Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000). En el procés de producció de proteïna VEGF hi ha nivells importants de regulació :Transcripcional, estabilitat de l'RNA per les zones 3' UTR, Transport del nucli al citoplasma per les regions IRES de l'extrem 5'... tot controlat per una llarga immensa llista de factors externs i/o interns. Un resum el trobem a la taula dels factors estimulants dels promotors del VEGF. La hipòxia és un dels factors més clarament reguladors de l'expressió del VEGF.(Pages and Pouyssegur 2005)

TAULA: FACTORS I ESTIMULANTS DEL PROMOTOR DEL VEGF

FACTORS AMB ELEMENT DE REPOSTA EN EL PROMOTOR	ESTIMULANTS DELS FACTORS DEL PROMOTOR
Sp1	TNF α , PDGF , IL-1 β , Endotoxina, Àcid retinoïc , l'oxidació , HGF, TGF- β 1 , IRS/PKC
Sp1 / Sp3	Àcid retinoïc trans, Interferó α , estrès oxidatiu , infecció per <i>Helicobacter pylori</i> , Gonadotropina , fusió dels gens Bcr/Ab1 per translocació de cromosomes que activa la via de Ras.
HIF-1	Hipòxia , pH àcid.
AP-2	TGF- α , sèrum, ratjos UV, Hepatòcit GF, EGF
Sp1 / AP-2	Via Ras/Erk , receptors tirosin quinases erb-B
Sp1 / Sp3 / ERE /PRE	Estrògens, Progesterona

Regulació transcripcional

1.- El promotor del gen del VEGF conté llocs d'unió SP1, de manera que la unió de SP1 a aquests llocs afavoreix la transcripció del gen. Es coneixen diferents mecanismes relacionats amb SP1 que podren modificar la unió del factor al element de resposta del gen VEGF.

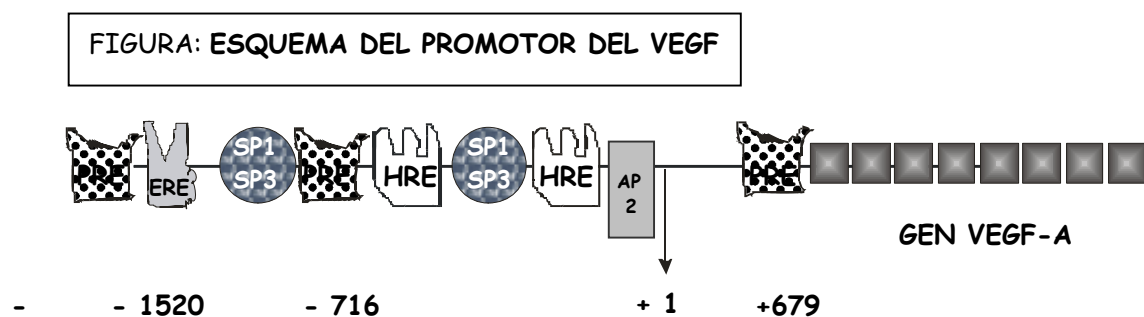
Quan SP1 s'uneix a la lligasa E2 i al pVHL deixa de realitzar l'acció d'activació sobre el promotor del gen directament. Per altra banda promou la inactivació de la proteïna quinasa C

de manera que aquesta deixa d'organitzar les proteïnes que s'uneixen als llocs UTR del mRNA VEGF i el fa menys estable.

P53 i p73 són proteïnes força homòlogues i tenen funcions de regulació del cicle cel·lular quan hi ha dany en el DNA. Aquestes proteïnes interaccionen amb SP1 i no coneixem exactament el mecanisme però inhibeixen la transcripció del VEGF per SP1.

La unió de SP1 al promotor del VEGF depèn de la fosforil·lació dels seus residus de serina i treonina. Coneixem diferents mecanismes de fosforil·lació de SP1 a través d'enzims com: la DNA PK: DNA fosfoquinasa , Caseina quinasa II , PKA : fosfoquinasa A i les Erk. Sabem que en resposta al sèrum es fosforil·la la SP1 i que respon a estímuls com: HGF , EGF , neu, NDFs , TGF-β1 i la via del Ras. S'ha relacionat molt l'activació del gen del VEGF per SP1 fosforil·lada per la via del Ras i per les Erks. (Milanini-Mongiat, Pouyssegur et al. 2002)

SP1 té una competència per unir-se als elements de resposta del promotor del VEGF, la SP3. La proporció SP1 / SP3 és molt important perquè SP1 s'uneixi al promotor i activi o bé ho faci SP3 i inactivi. S'observa una dependència d'aquesta proporció a la hipòxia. De manera que en hipòxia, baixa SP3. Els mutants que no tenen elements de resposta a HIF1 aquesta proporció no depèn de la hipòxia.



2.- AP-2 és un factor que té un element de resposta en el promotor del VEGF-A. S'ha descrit que hi ha varis factors i mecanismes que provoquen un augment d'AP-2 i en conseqüència un augment de VEGF. (TGF- α , ratjos UV, Hepatòcit GF, EGF, Vies de Ras). La regulació d'aquest factor es creu força específica al tipus cel·lular.

3.- El control de la transcripció del VEGF a través de la pO_2 i del factor HIF-1 és un dels més estudiats i coneguts. HIF-1 és una proteïna heterodimèrica amb dues subunitats HIF1 α i HIF1 β que estimula la transcripció del gen del VEGF unint-se a l'element de resposta a la hipòxia (HRE). El HIF1 β és constitutiu en totes les cèl·lules i a efectes de pO_2 no es regula. La subunitat HIF1 α augmenta la seva concentració amb una disminució de la pO_2 . La regulació de la concentració d'aquesta subunitat és la base en el control de l'activitat del HIF1. Un augment en la pressió d'oxigen augmenta la unió de HIF1 α al pVHL i per tant a la ubiquitina E2 i a altres factors que comporten el transport de HIF1 α al proteosoma i a la degradació. Si la pressió d'oxigen és baixa, HIF1 α és transportat a l'interior del nucli on formarà la proteïna HIF1. Aquest heterodímer junt amb altres cofactors com CBP/p300 estimularà la producció de VEGF i altres gens, unint-se als elements de resposta a la hipòxia. (HRE). Un altre punt de control conegut es produeix quan p53 s'uneix a HIF1 impedit que s'hi uneixi CBP/p300 i al HRE i per tant disminueix la transcripció dels gens amb HRE. (Kallio, Pongratz et al. 1997; Acker and Plate 2002)

4.- El gen del VEGF té un element de resposta als estrògens a la posició i tres elements de resposta a la progesterona. Un d'aquests últims situat a +679, es dedueix que regularia un segon lloc de transcripció descrit en el gen del VEGF-A. La unió dels estrògens al receptor estimula la transcripció del gen del VEGF. S'ha descrit que el receptor d'estrògens es pot unir al BRCA, SP1 o SP3 inhibint la transcripció. En els casos tumorals on BRCA està inhibint s'observa un augment de VEGF-A i de la vascularització en general. (Stoner, Wormke et al. 2004)

Receptors del VEGF

Els receptors del VEGF formen una subfamília de receptors tirosin quinasa caracteritzats per tenir set *loops immunoglobulina like* extracel·lulars. Actualment se n'ha descrit tres que els anomenem: VEGF R1 (Flt-1) (180kD), VEGF R2 (KDR/Flk-1)(230kD) i VEGF R3 (Flt-4)(170kD). El VEGF també s'uneix a proteoglicans heparans sulfats (H.S.) i als Neuropilin 1 i 2. La unió del VEGF a aquestes proteïnes extracel·lulars no comporta una resposta biològica sense la presència de receptors tirosin quinases. Els neuropilins poden unir-se a la família dels Plexins i formar receptors Sema3A relacionats amb el desenvolupament neuronal durant l'embriogènesi, la migració cel·lular i descrits en algunes cèl·lules tumorals on es relacionen amb invasió i resistència a citotòxics. (Wey, Gray et al. 2005) (Gray, Wey et al. 2005). El reconeixement de la proteïna amb el receptor és específic del gen del VEGF i dels diferents *splicings*, les relacions estan descrites en la taula de: "Gens i *splicings* del VEGF", en l'apartat anterior "Gen del VEGF".

L'expressió d'aquests receptors en el desenvolupament embriogènic és essencial fins al punt de que la manca d'un sol al·lel produeix letalitat fetal en ratolins (un al·lel dia 11 i els dos dia 8.5). Es relacionen en la maduració i formació de tot el sistema vascular, hematopoètic i linfàtic. En l'adult l'expressió d'aquests receptors sempre ha estat associada a una especificitat de les cèl·lules endotelials. Però ja s'ha descrit l'existència dels VEGFR1 i R2 en altres tipus cel·lulars com: monòcits, cèl·lules mesengials renals, osteoblast, pericits, cèl·lules progenitores hematopoètiques, cèl·lules de la musculatura llisa, cèl·lules trofoblàstiques, megacariocits, cèl·lules progenitores renals i algunes cèl·lules tumorals. (Masood, Cai et al. 2001; Byrne, Bouchier-Hayes et al. 2005). VEGF potencia l'expressió d'ambdós receptors però l'hipòxia també és un factor determinant. (Hiramatsu, Miwa et al. 2006) La pressió d'oxigen regula els dos receptors més abundants però de manera diferents, en VEGFR1 (Flt-1) regula la transcripció però en VEGFR2 (KDR/Flk-1) la regulació és postranscripcional. (Gerber, Condorelli et al. 1997)

L'afinitat del VEGF és deu vegades superior amb VEGFR1 que no pas VEGFR2 però l'activitat tirosinasa del R2 és deu vegades més potent. La unió del lligant comporta dimerització del receptor i autofosforil·lació. En algunes ocasions s'ha localitzat heterodímers entre VEGF R1 i R2. El resultat de la unió del VEGF al receptor VEGFR2 és l'augment de la proliferació, la migració i la supervivència cel·lular. Per la via del Ras-Raf-ERKs activaria la proliferació cel·lular, per la via PI3K-Akt atura l'apoptosi i indueix a la migració junt amb l'activació de la via de FAK . S'ha reconegut complexos de VE-Cadherina amb VEGFR2 i β -Catenina que activarien la via de PI3K. La unió de VEGF amb VEGFR1 es relaciona amb migració cel·lular per l'activació de la via del FAK. Altres rutes menys conegudes com la dels STATs també s'activen amb la unió del VEGF als seus receptors. (Veikkola, Karkkainen et al. 2000) (Byrne, Bouchier-Hayes et al. 2005)

ANGIOPOIETINES

Les angiopoietines són glicoproteïnes secretades al medi, descrites per la seva unió a TIE2 / Tek, un receptor tirosina quinasa de les cèl·lules endotelials. Hi ha descrites més de tres angiopoietines però les més estudiades en relació amb l'angiogènesi són la 1 i la 2. L'angiopoietina 1 va ser descrita per Samuel Davis l'any 1996. (Davis, Aldrich et al. 1996) És una glicoproteïna d'uns 55 KDa, que s'uneix a glúcids i arriba a 70KDa. Té un domini d'unió al fibrinògen en l'extrem C-terminal i una estructura supercoil a l'extrem N-terminal que li permet tenir l'opció d'unir-se a altres proteïnes i formar multiestructures. Es coneixen dos isoformes d'aquesta proteïna a i b . Les isoformes mantenen la pauta de lectura però la forma b està escurçada per l'extrem C-terminal. No s'ha vist en cap situació que les cèl·lules endotelials secretessin aquest factor, la sintetitzen la musculatura llisa, les cèl·lules tumorals i altres.

Entre l'angiopoietina 1 i al 2 hi ha una homologia del 60% dels aa i en ambdós casos la unió amb TIE2 té la mateixa afinitat. Els dos gens d'aquestes proteïnes estan en el cromosoma 8. L'angiopoietina 2 té una 496 aa i recorda molt l'angiopoietina 1 isoforma a. Es sintetitza majoritàriament en les cèl·lules endotelials. S'uneix a TIE2 amb la mateixa afinitat però els resultats descrits d'aquesta unió són totalment contraris. La pèrdua del gen de l'angiopoietina 2 és compatible amb la vida, els ratolins deficients en aquest gen neixen aparentment normals. Al contrari, els embrions amb sobreexpressió d'angiopoietina 2 són letals. (Gale, Thurston et al. 2002) Aquestes característiques ens dóna una idea de que l'angiopoietina 2 serà una molècula que pel seu bon funcionament necessitarà una regulació estricta de dosis d'espai i temporal. Recentment s'ha identificat que aquesta molècula s'emmagatzema junt amb la P-Selectina i el Factor Von Willebrand en cossos de Weibel-Palade, aquests serien un punt de regulació important. (Fiedler, Scharpfenecker et al. 2004)

Funcions

L'angiopoietina 1 no se li reconeix una funció de factor de proliferació. En experiments on es cultiven cèl·lules endotelials amb concentracions d'angiopoietines suficients per fosforil·lar el receptor TIE-2, no es veu efecte de proliferació cel·lular com es determina amb altres factors com VEGF, FGF, EGF... Aquests factors angiogènics provoquen la formació de tubs en matrius de col·lagen i s'ha vist que l'angiopoietina 1 tampoc no realitza aquesta funció. (Davis, Aldrich et al. 1996) De moment no s'ha pogut determinar la funció de l'angiopoietina 1 en cultius *in vitro* però sembla que podria ser important per acompanyar al VEGF i per altres funcions amb el receptor TIE-2 ja que els embrions sense angiopoietina 1 tenen els mateixos defectes que sense VEGF o sense TIE-2. (Davis, Aldrich et al. 1996) En les fases embrionàries s'ha detectat angiopoietina-1 en la musculatura cardíaca al principi de l'embriogènesi (E9-E11) i més tardanament al voltant dels vasos en formació. L'angiopoietina 1 quan s'uneix al TIE2 indueix a les cèl·lules endotelials al reclutament de pericits i cèl·lules de la musculatura llisa per formar el revestiment del vas sanguini i li proporciona una estabilitat a

la cèl·lula endotelial perquè es mantingui viva i en quiescència . Aquesta és la funció més descrita per aquesta proteïna i sembla que la realitza a través de HB-EGF.

L'*heparin binding* EGF el secreten les cèl·lules endotelials i s'uneix al receptors erb-B de les cèl·lules musculars, provocant el seu reclutament a formar els vasos sanguinis més estables. L'angiopoietina 1 en aquest cas podria actuar com a factor de transcripció estimulador del gen HB-EGF i promoure d'aquesta manera el reafirmament del vas. (Iivanainen, Nelimarkka et al. 2003)

Les funcions de l'angiopoietina 2 comporten fins al moment un punt de força controvertida. Es defineix com la que provoca la no senyal en el receptor TIE-2 al bloquejar el receptor amb la seva unió. Allibera els pericits i les cèl·lules de la musculatura llisa. S'ha publicat que angiopoietina 2 a altes concentracions activa TIE-2 en cèl·lules endotelials, que indueix a la formació de tubs vasculars, que activa la fosforil·lació de TIE-2 en fibroblastes o altres tipus cel·lulars no endotelials. L'angiopoietina 2 s'acumula en l'úter, ovaris i placenta i es creu que és molt important en l'inici de l'angiogènesi patològica, en el moment que la patologia fa malbé l'entorn vascular i comença la renovació o la nova formació.(Ribatti, Vacca et al. 2000) Aquests efectes seran pro angiogènics o anti angiogènics depenent de l'ambient i el moment del teixit. Acompanyada per altres citocines com el VEGF, l'angiopoietina 2 pot afavorir l'angiogènesi però en un altre context pot induir la regressió de les cèl·lules endotel·lials. Cal trobar bons models per poder estudiar molt bé aquesta molècula ja que actualment hi ha descrites a la literatura moltes discrepàncies entre els models *in vitro* i els *in vivo*. (Scharpfenecker, Fiedler et al. 2005) Les funcions d'aquesta proteïna estan molt discutides i de moment sabem que promou fenòmens el resultat del quals pot ser pro o anti angiogènics segons el moment de l'actuació.

Receptor cel·lular TIE2

El receptor TIE2 és un receptor tirosina quinasa específic de les cèl·lules endotelials. Se li reconeixen 4 lligants: angiopoietina 1-2-3 i 4. L'angiopoietina 1 indueix l'autofosforil·lació del

TIE2 però l'angiopoietina 2 bloqueja aquesta fosforil·lació. Les interaccions amb els altres lligants són força desconegudes o relacionades amb linfaangiogènesi. La fosforil·lació de TIE2 està relacionada amb el control de la supervivència de la cèl·lula endotelial i amb l'inducció a l'*sprouting*. El control de la supervivència s'explica per l'activació de la via Akt que augmenta amb l'activació del lligant al receptor. L'*sprouting* és el procés més poc descrit dels que comporta l'angiogènesi. Existeixen teories publicades que demostren que l'activació de la via PI3K Akt simultàniament o en col·laboració de TIE2 i VEGFR2 condueix a la cèl·lula a la migració i l'*sprouting*. (DeBusk, Hallahan et al. 2004) També s'ha descrit la possible activació de la via de RAS-MAPKs per l'activació de TIE2. S'explica aquesta activació a través de proteïnes adaptadors al receptors tirosina quinases que interaccionen amb TIE2 i Ras. (Audero, Cascone et al. 2004) (Jones and Dumont 1998) i es coneix un grau de control d'aquesta activació amb els receptors quinases EphB La via de les RAS-MAPKs en les cèl·lules endotelials està potenciant proliferació i migració i s'ha demostrat que la coordinació amb el TIE2 i angiopoietina 1 augmenta el 50% de l'efecte de migració però no el de proliferació. (Kim, Ryu et al. 2002)

TROMBOSPONDINA- 1

La trombospondina-1 és una glicoproteïna trimèrica de 450KDa de la matriu extracel·lular que interacciona amb altres components de la matriu, receptors cel·lulars, factors solubles i enzims proteolítics.

Aquesta proteïna va ser descrita a principis dels anys 70 per Baenziger com una proteïna que s'emmagatzemava en els grànuls α de les plaquetes i que quan aquestes cèl·lules s'activaven per la trombina la proteïna era alliberada. El nom de trombospondina prové justament del fet de que sigui la proteïna que respon a l'estímul de la trombina. Entre els anys 1991 i 1994 es van

purificar del cartílag proteïnes que s'anomenaven C.O.M.P. (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*), la seva homologia amb la trombospondina va definir una família de gens. Actualment es coneixen 5 trombospondines, la TSP-1 va ser la primera a descriure's i per això li varen denominar el nombre 1. Les trombospondines 1 i 2 són trimèriques, la 3, 4 i 5 són pentamèriques. Cada monòmer té uns 1.152 aa que pesen de 150 a 110 KDa. Aquesta proteïna pateix modificacions post-traduccionals com: Glicosilacions en l'extrem N-terminal i β -hidroxilacions dels residus d'asparragina. Són proteïnes sintetitzades per varis tipus cel·lulars no només per plaquetes com es pensava de bon principi: cèl·lules endotelials, fibroblasts, cèl·lules de la musculatura llisa, neumòcits entre altres. Els extrems N i C-terminals formen estructures globular, té un domini d'homologia al col·lagen, dues cisteïnes implicades en la formació del trímer i tres tipus d'estructures repetitives. El tipus de repetició 1 es repeteix tres vegades en l'estructura de la trombospondina i és homòleg a les repeticions dels components com la properdina, UNC i espondina (Proteïnes que formen el complement). Aquests tipus 1 també s'anomenen *trombospondina repeat* o *properdina repeat*. Les estructures de repetició 2 es repeteixen tres vegades i són homòlegs amb el factor de creixement epidèrmic. El tipus de repetició que anomenem 3 es repeteix set vegades en la trombospondina i conté dues seqüències d'unió al calci semblants als de la calmodulina. La trombospondina podria estar unida a 35 ions de calci i és un punt important pel seu funcionament.

El gen de la trombospondina-1 està situat en el cromosoma 15 dels humans o en el 2 dels ratolins. Ocupa unes 20 Kb i té 22 exons. El promotor d'aquest gen té varis llocs d'unió sobretot per proteïnes del sèrum. S'ha descrit diferents *splicing* del gen. (Adams 1997)

Regulació

La regulació a nivell de traducció està determinada pels elements de resposta del promotor (Exemples coneguts: sèrum, Egr-1 i Sp1). No coneixem tot el promotor de la TSP-1 ni tampoc s'ha identificat un locus d'unió a Id-1; però s'ha comprovat que Id-1 reprimeix l'expressió del

gen actuant sobre la zona -1120, -1310 del promotor del gen de la TSP-1. Per tant es creu que actua per un altre mecanisme o seqüència fins ara desconeguda sobre el gen de la TSP-1.

Id-1 és el major determinant de l'expressió de TSP-1 en l'angiogènesi tumoral. (Volpert, Pili et al. 2002) Sabem que el gen de la TSP-1 és de resposta immediata a efectes com: components del sèrum, a la densitat cel·lular, a l'estrès cel·lular (hipòxia, xocs tèrmics...), alguns factors de PDGF, TGF- β , bFGF, també està regulat per l'expressió de gens relacionats amb l'oncogènesi com: p53, Ras, c-Myc, v-src, c-fos i c-jun. No s'ha localitzat una relació directe entre Ras i TSP-1, però sí que s'ha descrit una relació entre Ras, Myc i TSP-1. Quan s'hiperactiva i la via de Ras-PI3K i Rho s'indueix a la sobreexpressió de c-Myc llavors s'inhibeix l'expressió de TSP-1. (Watnick, Cheng et al. 2003) Està descrit que la mutació de p53 disminueix l'expressió de TSP-1 i provoca un augment d'angiogènesi. Per tant en l'efecte contrari p53 wt augmenta l'expressió de TSP-1. (Dameron, Volpert et al. 1994)

L'any 1996 ja es va determinar que la transcripció de TSP-1 en l'endometri depenia dels receptors de progesterona. Recentment s'ha vist que els estrògens poden regular indirectament els efectes de TSP-1. Aquests control indirecte és a través del CD36 que està molt poc expressat en presència d'estrògens. (Iruela-Arispe, Porter et al. 1996; Uray, Liang et al. 2004)

Funcions

Com a proteïna de la matriu extracel·lular que s'uneix a proteïnes transmembranals com els CD36, les integrines i alguns receptors de factors de creixement entre altres, es dedueix que està intervenint en la senyalització dels estímuls externs cap a l'interior de la cèl·lula i en els posteriors efectes sobre la cèl·lula i la matriu extracel·lular. De moment se li reconeixen intervencions en la migració, l'adhesió i el creixement cel·lular i també en l'angiogènesi. Cinc punts podrien resumir el coneixement que en tenim de les seves funcions.

1.- La trombospondina forma part de la xarxa entre leucòcits i plaquetes en una resposta inflamatòria. Intervé en la formació del llit de fibrina, unint la fibrina amb el plasminògen

urokinasa i les glicoproteïnes riques en histidines. Aquestes unions intercel·lulars les realitza a través de proteïnes transmembrènals com la CD36 i les integrines $\alpha v\beta 3$. (Adams 1997)

2.- La Trombospondina-1 està relacionada amb l'activació del TGF β . Aquest factor és secretat de manera latent unit a un sistema peptídic de latència (LAP). Per activar TGF β cal mecanismes de proteolisi, unions amb les integrines i altres proteïnes de la matriu extracel·lular com la Trombospondina-1. La unió de la Trombospondina al TGF β + LAP suposa l'activació del factor. Aquesta unió es realitza per dos seqüències situades en els repeats tipus 1 de la Trombospondina-1 i ambdós locus són necessaris per l'activació. (Schultz-Cherry, Chen et al. 1995; Young and Murphy-Ullrich 2004)

3.- Està força relacionada en la maduració del Sistema Nerviós Central. Els astrocits immadurs expressen TSP-1 i TSP-2 però no els madurs i promouen la sinaptogènesi del sistema. (Christopherson, Ullian et al. 2005)

4.- Indueix a l'apoptosi cel·lular. Es demostra que la trombospondina pot induir l'apoptosi de les cèl·lules endotelials a través de la seva unió al CD36 que activa la senyal d'apoptosi per la via de p59^{fyn}- caspasa3 - p38MAPK. (Jimenez, Volpert et al. 2000)

5.- Les seves funcions en l'angiogènesi encara no estan del tot ben definides a més de la inducció a l'apoptosi de les cèl·lules endotelials. La pèrdua de la TSP-1 està associada a un fenotip angiogènic i una progressió tumoral, descrit a partir de models *in vivo* i estudis clínics. (Good, Polverini et al. 1990; Rodriguez-Manzaneque, Lane et al. 2001) Però també s'ha descrit efectes contraris en estudis igualment valorables, de manera que pot estimular activitats proangiogèniques. (Bein and Simons 2000; Qian, Rothman et al. 2001) Sembla que aquests efectes contraris podrien dependre del fragment i domini de la TSP-1 que actua. La digestió de la TSP-1 amb quimiotripsina dona diferents fragments proteolítics un de 25 KDa i una altre de 140 KDa són els més estudiats (Taraboletti, Roberts et al. 1990) El fragment de 25 KDa està relacionat amb l'activació de ERK 1-2 en cèl·lules inflamatòries i de l'estroma i el de 140KDa augmenta l'activitat de p38 MAPK. (Gahtan, Wang et al. 1999; Wilson, Li et al. 1999) Aquestes activacions comporten en el primer cas (fragment de 25 kDa): Reducció a la meitat

del TIMP-2 respecte valors en la normalitat, increment de MMP9 i de la MMP2 i inducció a les cèl·lules endotelials i a les del múscul llis a la migració. (Wilson, Li et al. 1999) El fragment de 140KDa augmenta l'activitat de la via p38-MAPK augmentant l'expressió de TIMP-2 i aturant la migració cel·lular. (Donnini, Morbidelli et al. 2004) També se li han descrit unions amb altres parts de la proteïna amb MMP2 i MMP9 que provoquen la no activació d'aquests zimògens. (Bein and Simons 2000)

METALOPROTEÏNASES

CONCEPTE











A principi dels anys 60, Jerome Gross i els seus col·legues varen descriure una activitat que degradava les fibres de col·lagen en la metamorfosi del cap-gros. (Gross 2004). D'aquí van començar a descriure's una gran família capaç de degradar els components de les matrius extracel·lulars. L'any 1989 es realitza una conferència internacional i es denominen MMPs amb una numeració a aquests enzims de degradació. Aquesta família encara segueix creixent i es segueixen determinant funcions i mecanismes. Als anys 70 es demostrava que eren secretats per les cèl·lules en una forma inactiva. L'activació i regulació d'aquests enzims encara és un dels punts més punyents de coneixement sobre el seu funcionament. Fins els anys 90 no es va començar a descriure la possibilitat de que algunes d'aquestes activacions es realitzessin a través d'un allau de reaccions enzimàtiques. Motoharu Seiki va descriure la MMP-14 ancorada a la membrana com a promotora de l'activació de la MMP2 (Sato, 1994 #295) i es van desencadenar totes les investigacions cap a l'estudi de la zona pericel·lular. Actualment s'ha descrit sis MMPs ancorades a la membrana. En la seqüència d'esdeveniments, el descobriment dels inhibidors endògens de les MMPs va ser un punt molt important per donar explicació a les

activacions i funcions. Els anomenem inhibidors en els teixits de les MMPs i se'n han descrit quatre (TIMP-1, 2, 3 i 4) dels que desconeixem encara gran part de les seves funcions i relacions amb les MMPs.(Stetler-Stevenson 1999)

Les metaloproteïnases són una família d'endopeptidases on es conserva l'estructura del domini catalític de zinc. Degraden pràcticament tots els components de les matrius extracel·lulars i de les làmines basals, en aquesta família es troben els únics enzims capaços de degradar les triple hèlix de col·lagen. Es produeixen com a pro-enzims que es secreten i posteriorment són modificats en l'extrem N-terminal per ser actius.

Fins ara hi ha descrites 21 MMPs que es classifiquen en 6 grups segons el seu substrat majoritari. L'estructura molecular manté zones en tots els grups molt conservades: Els pèptids senyals de l'extrem assenyalen la secreció cel·lular. Els pro-pèptids tenen una cisteïna unida covalentment amb els dits catalítics de zinc, mantenint-los així inactius. L'activació de la MMP requereix la desunió d'aquesta cisteïna i a aquest fenomen extracel·lular se l'ha anomenat Cisteïna Switch. Tenen un domini catalític amb 5 estructures de plegament β i tres α -hèlix. Aquest domini té variacions en alguns residus i en el lloc concret d'unió del substrat però es la zona més conservada en tota la família de les MMPs. El domini hemopecxínic determina l'especificitat del substrat i està unit al catalític per una zona rica en prolines que anomenem regió Hinger.(Vihinen and Kahari 2002) La nomenclatura i les característiques més importants de cada MMPs esta resumida en la taula següent.

TAULA: Els grups de MMPs . Hem esquematitzat les característiques dels grups de metaloproteïnases de la matriu extracel·lular. Els substractes, els productes que activen o que poden activar les MMPs no són llistes tancades, van augmentant amb les diferents investigacions. Els esquemes de l'estructura corresponen a: ● peptid senyal, ■ senyal d'ancoratge, ■ pro-pèptid, △ lloc d'unió al furin, ▨ domini catalític, ||| inserts de la fibronectina II, — regió Hinger, ●●● domini hemopecxínic, ~~□□□~~ domini transmembranal, ⚙ domini d'unió a glicosil fosfatidil inositol, ▣ domini d'ancoratge a l'aparell de golgi.

	TIPUS	GEN	SUBSTRACTES	ACTIVAT PER	ACTIVA A	ESTRUCTURA
COL·LAGE- NASES	MMP1	11 q	Col·làgens I, II, III i V ..., serpins i altres	MMPs: 2, 3, 7, 10, 14, 15 i plasmina i altres	MMP-2 MMP-9	
	MMP8					
	MMP13					
ESTROMA- LISINES	MMP3	11 q	Col·làgen IV, V, IX i X..., elastina, laminina, E-caderina...	Plasmina	MMP-1 ,7,8,9 i 13	
	MMP10			Elastases		
	MMP12		Col·làgen IV, gelatina, laminina, fibronectina, vitronectina, ...			
	MMP11	22q	Inhibidors de les serin-proteases.	Furin		
MATRIU- LISINES	MMP7	11 q	Elastina, fibronectina, E-caderina,...	MMP-3 plasmina	MMP-9	
	MMP26		Gelatina,...			
GELATINASES	MMP2	16 q	Gelatina, col·làgen I, IV, V, VII, X..., fibrilina...	MMP-1, 13, 14, 15, 16	MMP-9, MMP-13	
	MMP9	20 q		MMP- 2, 3, 7, 13, plasmina..		
MMPs MEMBRANALS	MMP14	14 q	Col·làgen I, II, III, gelatina, vitronectina, ...	Plasmina, furin	MMP-2 MMP-13	
	MMP15	16 q	Fibronectina, laminina...			
	MMP16	8 q	Col·làgen II, fibronectina, gelatina, caseina, ...		MMP-2	
	MMP24	20 q	Proteoglicans			
	MMP17	12 q	Fibrina, fibrinògen, ...			
	MMP25	16 q	Col·làgen IV, gelatina, fibronectina, fibrina			
	MMP19	12 q	Gelatina, col·làgen IV, laminina, ...	Tripsina		
ALTRES	MMP20	11 q	Amelogenin, cartíleg oligomèric de la matriu,...			
	MMP28	17 q	Caseina			
	MMP23	1 q	Substrate sintètic de les MMP (McaPLGLDpaARNh2)			

FUNCIONS

En situacions no patològiques les MMPs s'expressen en molt poca quantitat però molt necessàriament per mantenir correctament l'esquelet, les articulacions i també la remodelació dels teixits connectius com podria ser l'absorció uterina després del part o en diferents punts del cicle menstrual. Els ratolins *knock out* de les MMPs neixen majoritàriament sense deficiències, només en el cas de la MMP14 on el ratolí sobreviu algunes hores després de néixer ja que té osteopatia, artritis, sinovitis fibròtica i té menys pes i tamany del normal i en el cas de la MMP9 on el ratolí té un retràs del creixement ossi. Les MMPs tenen funcions en embriogènesi però es creu que un enzim podria substituir un altre de manera que les deficiències d'un concret no es notarien en aquests processos.(Stetler-Stevenson 1999)

Les MMPs tenen associades les patologies relacionades amb el manteniment de l'esquelet i les seves unions (Tendons i cartílags.) Estan descrites osteolisis relacionades amb mutacions en MMP2, artritis amb deficiències de MMP3, artritis reumatoide irreversible per la destrucció del cartílag (col·lagen) degut al augment de les MMPs ... i estan alterades en altres patologies com les neoplàsies.

REGULACIÓ DE LES MMPs

La regulació de les MMPs és molt complex i depent del tipus cel·lular i del teixit. Aquests enzims estan regulats en molts nivells, transcripcional, post-traducciona... i actualment encara no hi ha explicació per totes les situacions que s'ha descrit.

Regulació transcripcional

Molts factors regulen la transcripció de les MMPs : hormones, factors de creixement, oncogens, citoquines, unions inter i intracel·lulars entre altres.

Es coneix un AP-1 binding site a 70pb upstream de l'inici de transcripció en alguns promotors dels gens d'algunes MMPs (MMP1 , 3 , 7 , 9 , 10 , 12 i 13). En altres MMPs ja està descrit que aquests lloc d'unió no existeix, en MMP2 , MMP11 i MMP14. En els promotors del MMP1, MMP9 i MMP3 està descrit un lloc d'unió de PEA3. (Polioma virus A proteïna d'unió 3). Aquest sembla que cooperin amb AP-1. En la zona del promotor dels gens de MMP1 i MMP3 s'ha localitzat un SNP (*Single Nucleotide Polimorfisme*) que incrementen la transcripció d'aquests gens. Anàlisi amb DNAs control del Centre d'Etude du Polymorphisme Human pedigrees revelen una freqüència del 30%. (Rutter, Mitchell et al. 1998) Hi ha força estudis en diferents tipus tumorals que intenten determinar aquests polimorfismes com a valor pronòstic o diagnòstic.

Regulació de l'activació

Les MMPs es sintetitzen inactives i requereixen d'una activació que sovint és un procés molt controlat i complex. Es desconeix completament els diferents processos de les diferents activacions en les MMPs. Intentarem fer un resum esquemàtic de les possibilitats més comuns que tenen aquests enzims.

- 1.- Perden part de l'extrem N-terminal alliberant d'aquesta manera el domini catalític que estava unit a una cisteïna de la zona pro-pèptid. En aquest procés s'ha descrit la implicació d'alguns TIMPs. (Gomis-Ruth, Maskos et al. 1997)
- 2.- Desencadenen un allau de reaccions que acaben activant una o varies MMPs. L'exemple més estudiat i treballat és l'activació de la MMP2 a través de la MMP14 i el TIMP-2. (Sato, Takino et al. 1996)
- 3.- L'activació també es pot produir a través d'enzims proteolítics de l'espai extracel·lular provinents de bacteris, virus, sèrum o altres (Plasmina, catepsina, elastasa...)

4.- Algunes MMPs tenen un lloc d'unió al Furin, provocant així que sigui susceptible a ser activades per les furin convertases.

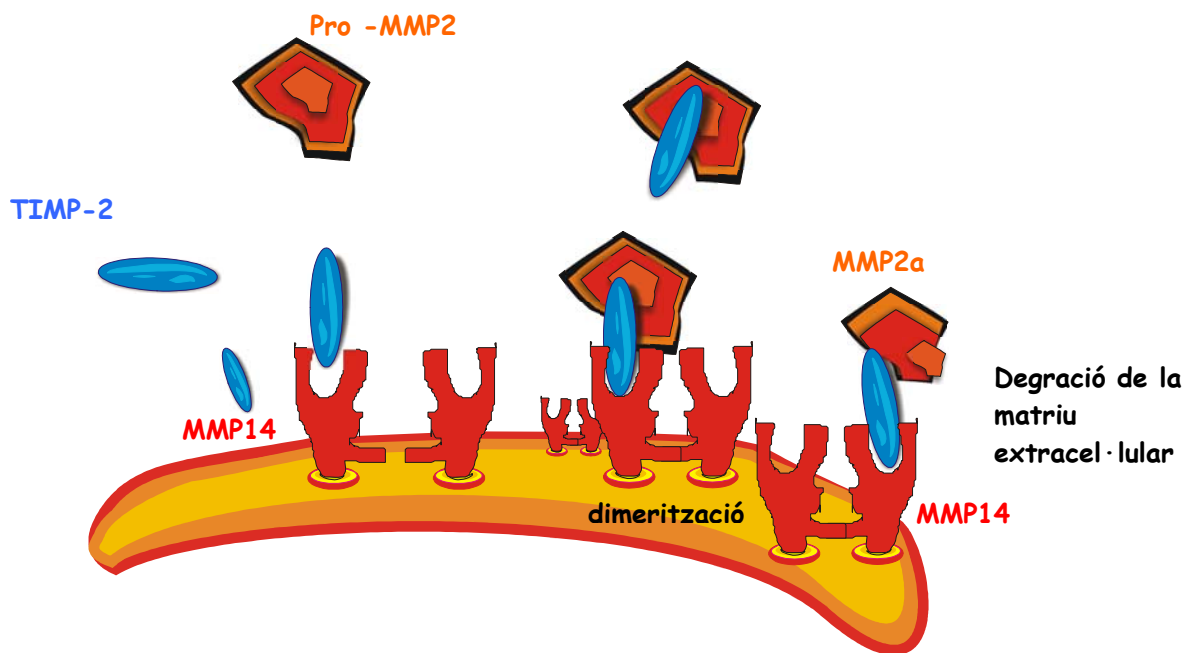


FIGURA: Esquema del mecanisme d'activació de la MMP2 a través de TIMP-2 i MMP14. Segons el mecanisme descrit per Sato l'any 1996. L'expressió de MMP14 en la superfície de cèl·lules COS-1 indueix que la MMP2 s'uniexi a la membrana cel·lular i s'activi. (Sato, Takino et al. 1996)

Inhibidors de les metaloproteïnases en el teixits (TIMPs)

Els TIMPs són una família de quatre membres que el anomenem numèricament de l'1 al 4. La seva funció més coneguda i per la que es van descriure, ha estat la inhibició de la metaloproteases. Aquesta acció majoritàriament la realitzen interaccionant en el residu cisteïna del seu extrem aminoterminal amb l'àtom de zinc del locus actiu de la MMP. Però en l'actualitat s'ha descrit accions dels TIMP directament sobre el creixement, l'apoptosi, la migració i la diferenciació cel·lular.

TIMP-1 inhibeix la migració endotelial però no la proliferació a través de l'acció d'inhibició directe sobre les MMPs. TIMP-3 està implicat en la inhibició de la morfogènesi capil·lar i la migració endotelial a través d'inactivar MMPs però també s'ha descrit que pot interaccionar amb el receptor FLK-1 del VEGF inhibint la seva acció. (Qi, Ebrahim et al. 2003). TIMP-2 inhibeix la migració endotelial inhibint l'activitat de les MMPs però actualment s'estan coneixen altres possibles mecanismes d'acció més complexes i sembla que la seva acció sobre les MMPs requereix d'una abundant sobre expressió. TIMP-2 directament podria estimular la migració cel·lular, accelerar la reparació de ferides i inhibir la proliferació endotelial provocada per VEGF-A. Aquestes accions del TIMP-2 han estat relacionades amb la seva unió a integrines i a RECK. (Seo, Li et al. 2003; Terasaki, Kanzaki et al. 2003; Oh, Seo et al. 2004)

MMPs I ANGIOGÈNESI

Podem considerar-les un regulador més del procés angiogènics, ja que a part de degradar la matriu extracel·lular ens alliberen factors que estan units a aquesta matriu com el VEGF i també poden generar altres factors en els productes de les seves reaccions. Per altra banda, també està descrit que alguns factors angiogènics regulen l'expressió de les MMPs. (Qian, Rothman et al. 2001; Lee, Esemuede et al. 2003) (Bein and Simons 2000)

Una de les reaccions més coneguda que podria influenciar a l'angiogènesi es el fet de que MMP-3 ,7 ,9 i 12 poden generar angiostatina a partir de plasminògen circulat. L'angiostatina inhibeix la proliferació de les cèl·lules endotelials. En situacions normals l'angiostatina es genera del plasminògen circulat amb l'elastasa pancreàtica, en una neoplàsia el procés podria estar discutit però hi ha estudis que determinen els macròfags com a cèl·lules candidates a produir l'elastasa. Els macròfags produeixen MMPs depenent del seu grau de diferenciació i d'estímuls fisiològics, patològics o farmacèutics. Les cèl·lules tumorals poden controlar

aquesta producció amb factors com el factor estimulador de formació de colònies en granulòcits i macròfags (MG-CSF) que provoca entre altres coses que els macròfags produeixin més elastasa. (Dong, Kumar et al. 1997)

A part d'aquests efectes descrits en diferents MMPs hi ha reaccions atribuïdes a les MMP9, MMP2 i MMP14 que les relacionen i les lliguen més estretament amb l'angiogènesis que la resta de MMPs. La **MMP9** intervé especialment en l'alliberació de VEGF de la matriu extracel·lular. El VEGF té dominis per unir-se a l'heparina i la MMP9 alliberar aquests VEGF donar-li la possibilitat d'actuar. Per tan la MMP-9 actua com a switch angiogènic, no és l'única manera però d'alliberar el VEGF. (Bergers, Brekken et al. 2000) (Wang, Wakisaka et al. 2004)

Se li atribueixen intervencions en la morfologia dels vasos i el reclutament de pericits i altres cèl·lules acompanyants dels vasos.(Chantrain, Shimada et al. 2004) (Johnson and Galis 2004) i també en el desenvolupament de les xarxes vasculars. (Johnson, Sung et al. 2004)

Les accions de la **MMP14** estan força relacionades amb la **MMP2** per la reacció d'activació que realitza la primera en la segona. Així una sobreexpressió de MMP14 i de MMP2 activa promou la invasió *in vitro* de cèl·lules tumorals , l'alliberació de VEGF i la densitat vascular *in vivo*. (Deryugina, Soroceanu et al. 2002)

Cada vegada es coneixen més efectes individuals (de la MMP2 o la MMP14) en els que no es reconeix l'activació que les uneix. La sobreexpressió de MMP14 independent d'una sobreexpressió de MMP2 en cèl·lules MCF7 , s'associa a una acceleració del creixement tumoral subcutani *in vivo* ,un augment de l'"sprouting" en inòculs subcutanis *in vivo* on l'expressió de VEGF és molt elevada. (Sounni, Devy et al. 2002)

La relació de la hipòxia amb la producció i activació de MMP2 per part de les cèl·lules endotelials en principi està descrit com a un procés independent de MMP14 i que provoca la migració de les cèl·lules endotelials i els pot arribar a provocar la mort cel·lular. (Ben-Yosef, Miller et al. 2005) . Altres estudis *in vitro* però en condicions normòxies associen l'efecte de migració endotelial a la MMP14 i a les integrines que no pas a MMP2. (Nisato, Hosseini et al. 2005).

ANGIOGÈNESI I CÀNCER

El valor pronòstic:

Quan parlem d'angiogènesi tothom en coneix la definició i entén la relació de la xarxa vascular amb el creixement tumoral però el que no ha estat clarament demostrat és el mètode per mesurar aquest fenomen. En tant que entenem que la neoformació de vasos implica una balança entre factors pro i anti angiogènics, com podríem mesurar l'angiogènesi?, es podria determinar si una neoplàsia és més o menys angiogènica segons les proporcions dels factors?. Només acabar d'escriure aquesta frase ja ens podem adonar que aquesta és una missió impossible en l'actualitat. Hi ha molts punts encara foscos: 1.- Determinar les funcions de cada factor per poder posar-lo en un costat o altra de la balança. 2.- Conèixer els nivells basals dels factors i les diferències entre els diferents teixits. 3.- Saber mesurar en cada moment del creixement tumoral els factors que són més rellevant i que dirigiran més la neoformació. 4.- Tenir un sistema de mesura reproduïble, equiperable i universal.

Evitant tots aquests dubtes que encara queden per resoldre els investigadors intenten mesurar l'angiogènesi amb el resultat final d'aquests fenomen, o sia mesurant nombre de vasos sanguinis. Actualment hi ha molts estudis basats en diferents tècniques de mesura. Els resultats obtinguts són molt diversos, els mètodes utilitzats també ho són i la correlació amb el pronòstic és difícil. El comptatge de vasos ens dona informació sobre l'estat actual del tumor que tenim a les mans i no obtenim informació del que s'ha neofomat o el que ja existia abans de la neoplàsia. Comencen a sorgir treballs que tenen en compte aquest fet i que busquen alternatives al comptatge directe. Mètodes per mesurar dos punts molt significatius: La proliferació endotelial i l'estat funcional dels vasos. (Eberhard, Kahlert et al. 2000) Però encara no tenim estudis relacionant aquests valors amb el pronòstic dels tumors. Els resultats més actuals encara realitzen el comptatge estàndard després d'un marcatge d'una molècula

endotelial específica. En osteosarcomes correlaciona major nombre de vasos amb major supervivència lliure de malaltia. (Kreuter, Bieker et al. 2004) En càncer de mama els estudis senyalen tot el contrari, un major nombre de vasos prediu poca supervivència. (Uzzan, Nicolas et al. 2004) Pocs estudis conclouen dades rellevants amb la densitat vascular i el càncer de colon i recte. Hi ha estudi que relacionen un augment de la densitat vascular a mesura que avança la malaltia i altres la correlacionen amb invasió en els nòduls limfàtics. (Okada, Satoh et al. 2004) (Saad, Liu et al. 2004) En el cas del càncer de bufeta la mesura del nombre de vasos podria ajudar al pronòstic però no queda gens clar. (Gontero, Banisadr et al. 2004; Stavropoulos, Bouropoulos et al. 2004) És un punt de controvèrsia.

Les estratègies terapèutiques:

Al final del segle XIX Paul Ehrlich ja postulava la importància del microambient tumoral per conèixer i combatre els tumors. Cada vegada és més important el seu coneixement per poder determinar com utilitzar la via de l'angiogènesi. Les possibles teràpies assenyalen dues direccions totalment oposades però a l'hora destinades a la destrucció tumoral. **Potenciar i/o aprofitar l'angiogènesi tumoral per millorar l'accés al tumor.** El control de les dosis de teràpia que arriben a les cèl·lules tumorals és un punt d'inflexió molt important. Sovint tan en quimioteràpies com en radioteràpies les dosis que arriben a les cèl·lules tumorals són baixes (5-10% de l'administrat) però no podem augmentar-les per minimitzar els efectes d'aquestes estratègies sobre les cèl·lules normals. L'estructura vascular dels tumors pot modular l'efecte de la teràpia en varis punts com: zones amb hipòxia són resistents a la radioteràpia, els fàrmacs necessiten vies de circulació i no es mouen gaire per difusió entre altres. (Acker and Plate 2002) Actualment s'està treballant molt sobre aquest punt per tal de seguir estratègies més dirigides i específiques on el coneixement de l'angiogènesi i la seva utilització com a via d'accés al tumor pot contribuir enèrgicament. S'utilitza l'especificitat endotelial per dirigir teràpies i augmentem l'eficiència. Alguns d'aquests marcadors més actuals són: components de la matriu extracel·lular (Tenascin C o la fibronectina), molècules d'unió intra o intercel·lular com les integrines ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$), els receptors del VEGF i el VEGF, fosfolípids de les

membranes endotelials entre altres. Aquests marcadors d'especificitat és poden utilitzar per dirigir teràpies amb anticossos, virus , gèniques, de quimioteràpics amb transportadors (con els liposomes.)...(Alessi, Ebbinghaus et al. 2004)

Destruir les vies de circulació sanguínia per evitar que el tumor tingui les condicions idònies de creixement i tingui vies de progressió i metastasi. Les teràpies antiangiogèniques comportarien menor toxicitat que les actuals. L'eficiència observada fins al moment varia molt segons el tipus de tumor i l'estadiatge. Moltes d'aquestes teràpies s'administren en combinació amb citotòxics o la pròpia teràpia afecta també a la cèl·lula tumoral. Sovint és difícil demostrar el seu efecte específic antiangiogènic. (Dhanabal, Jeffers et al. 2005)

Semblen a priori dues idees molt distants però a l'hora són molt complementàries. Segurament el seu ús dependrà del tipus de tumor i del moment en què es plantegi la teràpia. Comporten estratègies no excloents sinó que poden arribar a ser complementàries.

FACTORS ANGIOGÈNICS I CÀNCER

Els factors angiogènics s'utilitzen per diagnosticar, pronosticar i com a teràpies en les neoplàsies. El VEGF, en tan i en quan que és el més conegut i considerat el més determinant fins a l'actualitat, també és el més utilitzat en aquests tres aspectes.

VEGF

L'anàlisi del VEGF en les sèries de tumors humans, es realitza majoritàriament per tècniques d'immunohistoquímica , RT-PCR quantitativa, hibridació *in situ* i en alguns estudis per ELISA. Els resultats amb una o altra tècnica no es contradueixen i l'expressió del VEGF correlaciona en general amb un mal pronòstic tan de supervivència lliure de malaltia com de supervivència total. També hi ha estudis on l'anàlisi d'aquest factor angiogènic es realitza en el sèrum o plasma per ELISA. En general els valors alts es relacionen amb mal pronòstic però els estudis més extensos que s'ha realitzat fins ara analitzen valors molt diferents i és difícil treure'n

encara una conclusió en general. Alguns exemples d'aquests estudis més recents es realitzen en pacients de càncer de pulmó no cèl·lula petita on els nivells de VEGF correlacionen amb la resposta a la radioteràpia. (Brattstrom, Bergqvist et al. 2004) En melanoma es relaciona els nivells de VEGF en temps lliure de malaltia i en hepatocarcinoma els nivells de VEGF correlacionen amb invasió venosa, estadiatge del tumor i en resposta a la cirurgia tumoral. (Ascierto, Leonardi et al. 2004; Poon, Ho et al. 2004) En carcinoma de colon els resultats d'un estudi amb 81 pacients demostren que els nivells de VEGF en sèrum dels pacients correlacionen amb l'edat, el Dukes i els nivells de CEA. (Antígen carcino-embriònic) Observen una relació entre els nivells de VEGF pre-operatoris i la resposta a la cirurgia. (De Vita, Orditura et al. 2004)

Realitzant una recerca dels treballs publicats més recentment on es valora els nivells de VEGF en el teixit tumoral: en el carcinoma de mama la sobreexpressió del VEGF i del seu receptor VEGFR2 correlaciona amb mal pronòstic i sembla que va associat a l'estat de p53 i / o dels receptors hormonaals. La pèrdua d'expressió de p53 wt augmenta el VEGF i la seva correlació amb el pronòstic. (Linderholm, Lindahl et al. 2001) En els carcinomes receptors d'estrògens positius, l'expressió del VEGF augmenta la seva significació de mal pronòstic. (Bando, Weich et al. 2005) En l'hepatocarcinoma els nivells alts de VEGF en el teixit pretumoral i en sèrum dels pacients postresecats, determinen un mal pronòstic. (Poon, Ho et al. 2004; Sheen, Jeng et al. 2005) Un estudi complet amb 161 pacients de carcinoma transitori de bufeta també determina que l'expressió anormal del VEGF pot ser utilitzat com a marcador de mal pronòstic (Yang, Chu et al. 2004) En estudis on la malaltia està localment avançada el protocol actual de quimioteràpia i cistectomia no és beneficiós en malalts que tenen alts nivells d'expressió de VEGF en el seu tumor. (Slaton, Millikan et al. 2004) En els pacients de càncer de pulmó no cèl·lula petita (NSCLC) s'ha trobat correlació entre alts nivells de VEGF i poca supervivència. (Ogawa, Takenaka et al. 2004) Però no s'ha trobat correlació amb la invasió limfàtica ni en tumors de cèl·lula petita. (SCLC).(Dowell, Amirkhan et al. 2004) Una dieta rica en lípids hidroperoxidases indueix l'expressió de VEGF i contribueix a l'angiogènesi accelerant així el

desenvolupament dels adenomes de colon a carcinomes. (Jurek, Udilova et al. 2005)
L'expressió de VEGF s'ha correlacionat amb invasió limfàtica i vascular del tumor de colon però no amb el grau i les metastasi hepàtiques. (Saad, Liu et al. 2004)

Angiopoietines

Les angiopoietines podrien ser un bon senyal per determinar l'estat de l'endoteli en un tumor si considerem les seves funcions fins ara descrites. L'angiopoietina-1 ens assenjala estabilitat endotelial i l'angiopoietina-2 moviment. Però encara no hi ha gaire estudis en tumors humans determinant la seva possible utilització com a diagnòstic o pronòstic. Un estudi amb 90 pacients de leucèmia mieloide aguda determinen l'expressió de angiopoietina-2 per "Real Time PCR" com a factor pronòstic independent amb més alta rellevància en aquells casos on VEGF-C i Angiopoietina-1 tinguin una expressió baixa. (Loges, Heil et al. 2005) En el carcinoma d'ovari també mesuren l'expressió de les angiopoietines per PCR quantitativa i estableixen una proporció entre ang-1 i ang-2 ($R. Ang. = ang-1/ang-2$). Aquesta proporció té una tendència a ser un valor pronòstic independent per seleccionar un grup d'alt risc. Una baixa proporció de les angiopoietines, poca expressió de TIE2 i un alt nivell de VEGF correlaciona amb un augment de la densitat vascular en aquesta sèrie de tumors. (Hata, Nakayama et al. 2004). En aquest sentit hi ha més estudis en l'anàlisi de les angiopoietines i la seva relació amb el nombre de vasos sanguinis que envolten la neoplàsia. Així un augment de l'expressió d'angiopoietina 2 en carcinoma de pulmó no cèl·lula petita correlaciona amb més vasos sanguinis, a invasió limfàtica i es pot utilitzar com a factor pronòstic. (Takanami 2004) En el carcinoma de colon l'augment d'angiopoietina 2 no comporta directament més contacte de vasos, només quan s'associa a un augment de VEGF determina més vasos sanguinis associats al tumor i pitjor pronòstic. (Ochiumi, Tanaka et al. 2004)

El receptor TIE2 s'expressa a baixes concentracions constitutivament en els endotelis amb la funció coneguda de manteniment de la quiescència de la cèl·lula endotelial quan se li uneix angiopoietina 1. S'ha descrit la seva expressió en alguns tipus tumorals com el càncer de mama.

Un gran estudi amb més de 900 casos de carcinoma mamari determina que : sense nòduls afectats , tenen mal pronòstic si les cèl·lules tumorals són TIE2 positius. (Dales, Garcia et al. 2003)

Trombospondina

Repasant les funcions on està implicada la trombospondina-1 podem determinar un bon pronòstic si es mantenen o augmenten els nivells i l'estructura en una neoplàsia . D'aquesta manera es mantindran estructures de moltes làmines basals i l'angiogènesi estarà reduïda. Hi ha varis estudis on analitzen la TSP-1 i relacionen un augment amb un bon pronòstic. Però també hi ha alguns treballs amb conclusions contràries. Es comença a demostrar que les accions de la trombospondina-1 són dependents del tipus de matriu extracel·lular i per tan del teixit on es troba i de les digestions a la que és sotmesa. Els estudis de carcinomes de colon i recte correlacionen la manca de TSP-1 al bon pronòstic però l'expressió de VEGF sempre aporta més bona correlació. (Kaio, Tanaka et al. 2003). En un estudi de 182 metastasi hepàtiques de carcinoma de colon i recte, l'expressió de TSP-1 és un factor pronòstic de poca supervivència. (Sutton, O'Byrne et al. 2005) En càncer de mama no s'ha trobat una correlació entre l'expressió de TSP-1 i el pronòstic. (Linderholm, Karlsson et al. 2004) Sembla doncs que els estudis actuals ens indiquin variabilitat i poca com a factor pronòstic independent.

MMPs I CÀNCER

L'estudi de les MMPs respecte de les neoplàsies malignes es basen en la degradació a la matriu extracel·lular i les làmines bassals que li proporciona al tumor espai i possibilitat d'invasió i extravasació. Elimina les possibles barreres que l'estructura del teixit normal pot donar tan al creixement tumoral com al angiogènic. Per altra banda amb làmines bassals més permeables augmenta la possibilitat de que una cèl·lula metastàsica entri dins de la circulació sanguínia o

limfàtica. També alliberen factors ancorats a la matriu, ja que la matriu extracel·lular és un reservori de molts factors. Com a valor pronòstic hi ha estudis associats en dues direccions:

1.- La relació de l'expressió de les MMPs amb el grau i l'agressivitat del tumor.

L'augment de l'expressió d'algunes MMPs correlaciona amb major grau d'agressivitat i tumors menys diferenciat. Moltes d'aquestes relacions es realitzen amb la MMP2, MMP9, MMP3 i la MMP14. (Maeta, Ohgi et al. 2001; Schmalfeldt, Prechtel et al. 2001)

2.- La relació entre l'expressió de les MMPs i la recurrència, la supervivència i el risc de metastasi.

En melanoma s'ha determinat que nivells alts de MMP1, MMP3 i MMP2 comporten una baixa supervivència lliure de malaltia. (Nikkola, Vihinen et al. 2002) Una sobreexpressió de MMP1 tampoc no és un bon pronòstic en tumors gàstrics, d'esòfag, colorectal i pancreàtic. (Ito, Ito et al. 1999) El polimorfisme de MMP1 i MMP3 també s'ha utilitzat com a valor pronòstic en el càncer de colon. La MMP1 en aquests aspecte obté més bons resultats que la MMP3 que no dóna resultats estadísticament significatius. (Zinzindohoue, Lecomte et al. 2005) La MMP2 ha estat determinada com a valor pronòstic de poca supervivència en tumors gàstrics, d'ovari, de pulmó no cèl·lula petita, renals de bufeta i de mama entre altres. (Kanayama, Yokota et al. 1998; Kanda, Takahashi et al. 2000; Papathoma, Petraki et al. 2000; Passlick, Siemel et al. 2000)

També s'està utilitzant els coneixements de les MMPs per treballar en el desenvolupament de teràpies. Les idees de base d'aquests estudis les podem agrupar en tres:

1.- Potenciar els inhibidors fisiològics, els TIMPs.

2.- Dissenyar pèptids que s'uneixin com a substrats a les MMPs i desplacin els substrats reals. Aquests inhibidors però comporten efectes secundaris importants en els tendons i cartílags.

3.- Dissenyar inhibidors específics per les metaloproteïnases relacionades amb la patologia. Cal però determinar amb molta seguretat quines metaloproteïnases estan implicades en cada procés i aquesta pregunta no és gens senzilla de respondre.

Actualment hi ha un parell de fàrmacs anti - MMPs. El Marimastat que dóna molts efectes secundaris en les junctures ossees i el BAY12-9566 que no dóna cap resposta ni cap efecte secundari. Aquests estudis clínics inicials en càncer no estan donant els resultats esperats. (Ramnath and Creaven 2004) En altres malalties alguns inhibidors de MMPs són més eficients. Alguns exemples d'aquestes malalties són la periodontitis (Infecció de genives i pèrdua de dents), les úlceres de la còrnea, els efectes de la llum ultraviolada amb l'edat entre altres (Stetler-Stevenson 1999)

ANGIOGÈNESI I RAS

La relació entre angiogènesi i oncogens comença a ser estudiada i determinada en aquests últims anys. Aquests estudis aporten més informació sobre la morfologia del tumor, les seves possibilitats de progressió i per tan del diagnòstic i noves possibilitats de teràpies. (Rak and Yu 2004) Les observacions de les que disposem a la literatura ens aporten informació de com Ras contribueix a la transformació neoplàstica i a la hipervascularació. Però pocs estudis concreten el fenotip angiogènic amb les mutacions més freqüents del gen K-Ras. (Ince, Jubb et al. 2005). S'ha demostrat que Ras té capacitat per augmentar deu vegades el nombre de vasos sanguinis. Coneixem alguns mecanismes que provoca Ras i que podrien està relacionats amb aquest fenotip. Un d'aquests fenòmens és el fet de que els gens N i K-Ras augmenta la producció de VEGF-A. (Rak, Mitsuhashi et al. 1995) La proposta del mecanisme pel qual Ras regula el VEGF es base en el control de Ras sobre els factors de transcripció de VEGF i en l'estabilitat i traducció del seu mRNA. Els factors de transcripció del VEGF més associats a Ras són HIF1 α , SP1 i AP-2. La transformació neoplàstica de Ras és capaç d'augmentar HIF1 α independentment de les condicions d'hipòxia. En condicions d'hipòxia el control és podria realitzar en la fosforil·lació del factor que dependria de les ERK 1/2. (Sodhi, Montaner et al. 2001). En normòxia el control és creu que es realitza en la degradació de HIF1 α a través de la

via de les PI3K. (Blancher, Moore et al. 2001). Alguns estudis relacionen vies d'estrès (Ras-Src) amb l'hipòxia i l'alliberació de HIF1 α al factor Von Hippel Lindau (VHL) i per tan de la ubiquïtinització com a degradació. Però encara no s'ha pogut definir el mecanisme exacte. (Seko, Tobe et al. 1996). SP1 i AP2 s'indueixen per una estimulació de la via clàssica de Ras-Raf- MAPKs. (Milanini-Mongiat, Pouyssegur et al. 2002) A nivell d'estabilitat del RNA missatger del VEGF, s'ha demostrat que la transformació per Ras estabilitza cinc vegades més aquest RNA però encara desconeixem el mecanisme exacte. (Pages, Berra et al. 2000). eIF-4E requereix de la fosforil·lació de 4E-BP per poder ser actiu i promoure entre altres la traducció del mRNA del VEGF. Ras regula la fosforil·lació de 4E-BP a través de les seves dues vies principals (Raf-MAPKs i PI3K) controlant d'aquesta manera l'estabilitat del RNA missatger del VEGF. (Herbert, Tee et al. 2002). La regulació de VEGF no és simple, tampoc ho és en relació amb Ras i la seva transformació. Tots aquests mecanismes de control prenen més o menys importància segons el tipus cel·lular i el microambient de cada situació. Encara queden preguntes importants per respondre i malgrat desconeixem en quin grau , sabem que VEGF és necessari però no imprescindible per explicar-nos els fenotips transformants de Ras, que la regulació de VEGF no només és a través de Ras i que l'angiogènesi depent d'una balança de factors. Les angiopoïetines , les trombospondines i altres factors són part important de l'angiogènesi i es poden veure afectats per la irregularitat de Ras. La trombospondina-1 inhibeix la transcripció amb c-Jun. Sabem que Ras promou c-Jun i per tan pot està inhibint la TSP-1. (Mettouchi, Cabon et al. 1994). Per altra banda s'ha trobat una relació directe entre la sobre-expressió de c-Myc, Ras i l'inhibició de TSP-1. (Watnick, Cheng et al. 2003) En aquests mecanismes queden molts espais per omplir de coneixement però l'observació inequívoca és que en neoplàsies malignes amb Ras mutat la TSP-1 baixa els seus nivells.

material i mètodes



CULTIUS CEL·LULARS

DESCRIPCIÓ DELS TRANSFECTANTS K-RAS

Disposem de dos clons NIH3T3 transfectats amb el promotor i el gen K-Ras humà diferencialment mutat. La construcció dels plàsmids va ser realitzada inicialment pel Dr. Perucho per estudiar el gen K-Ras. (Yamamoto and Perucho 1984) (Nakano, Yamamoto et al. 1984). Posteriorment es van mutagenitzar per obtenir les diferents mutacions del gen. La transfecció dels clons es va realitzar al laboratori d'Investigació Gastrointestinal de l'Hospital de Sant Pau, on es van caracteritzar *in vitro* i *in vivo*. (Guerrero, Casanova et al. 2000) (Guerrero, Figueras et al. 2002).

Els gens humans de K-Ras amb les diferents mutacions van ser aïllats de línies cel·lulars de tumors de pulmó humans (PR310 i PR371). Es van realitzar llibreries de fags dels segments del DNA capaços de transformar repetidament els fibroblastes de ratolí NIH3T3 on es va localitzar els gens. Les construccions dels plàsmids es van realitzar a partir de plàsmids pBR i contenen un gen de selecció de resistència a la neomicina sota el control del promotor de la timidina quinasa i una resistència a l'ampicilina. Es va insertar sota el promotor endògen del propi K-Ras un minigen de K-Ras amb els quatre exons del gen separats per segments de regions intròniques amb un senyal de poliadenilació. L'exò quatre va ser l'isoforma 4B que és la més freqüent en teixits humans. Els plàsmids utilitzats en aquest estudi tenen el minigen mutat en la primera posició del codó 12 (G:C - A:T / Gly- Cys /pMLK12) o en la segona posició del codó 13 (G:C - A:T / Gly- Asp/pMLK13). Els plàsmids varen ser transfectats a NIH3T3 obtingudes d'ATCC (*American Type Culture Collection*) amb el mètode de fosfat de calci. Després de la transformació es va escollir un clon amb mutació en el codó 12 G:C - A:T (L'anomenarem : CYS12) i un altre amb

mutació en el codó 13 G:C - A:T (L'anomenarem ASP13) per la seva caracterització *in vitro* i *in vivo*. El creixement d'aquests clons està prèviament descrit, el clon ASP13 creix en un monocapa mentre que en el cas del clon CYS12 que ja a poca confluència realitzen creixements focals tridimensionals. Aquests clons creixen en plàstic de cultiu. Cal vigilar el cultiu de les parentals NIH3T3: les seves condicions de creixement com: sèrums, temperatures i humitats, tipus de plàstic, confluència... ja que està descrit que són fàcilment transformables espontàniament, característica que fa que siguin els més usats per demostrar la capacitat de transformació d'un gen desde fa molt de temps. (Bondy, Wilson et al. 1985; Cooper, Tempest et al. 1986; Lin, Cerione et al. 1999; Tachado, Mayhew et al. 2002) Per tal d'evitar treballar amb NIH3T3 transformades espontàniament com a controls anem fent periòdicament inòculs subcutanis d'aquestes cèl·lules en cultius en Swiss Nude. Si no hi ha un creixement tumoral ens dóna un garantia de no transformació neoplàssica.

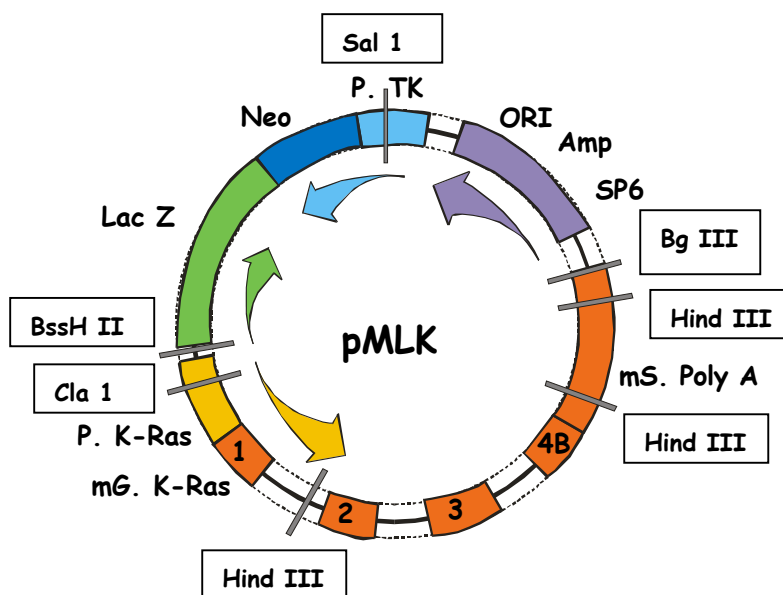


FIGURA: ESTRUCTURA DELS PLÀSMIDS pMLK. P.TK : Promotor timidina quinasa
 Neo: Gen de resistència a la neomicina P.K-Ras: Promotor del gen K-Ras mG K-Ras:
 minigen del K-Ras mS. PolyA: Senyal curta de poliadenilació. Hem assenyalat alguns punts
 de restricció enquadrats.

A part de la fàcil transformació d'aquestes cèl·lules també cal vigilar la possible expulsió i consegüent pèrdues totals o parcials del plàsmid. De manera que els cultius sempre es mantindran amb neomicina (G418), l'antibiòtic de selecció i es realitzaran controls periòdicament en diferents passes avançats. Aquests controls són per garantir que els clons mantenen el gen del K-Ras amb la mutació corresponent i es realitzen fent una SSCP i una seqüència del segment amplificat.

MEDI DE CULTIU

Tots els clons han estat cultivats amb el mateix medi i l'única diferència ha sigut el contacte amb l'antibiòtic de selecció, neomicina (G418). Al medi comercial D-MEM, DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM High Glucose amb 25mM d'HEPES (GIBCO Cat. Núm# 42430-025) li hem afegit un 10% Foetal Bovine Serum (GIBCO Cat Núm# 10106-169) ,10% Glutamina 200 mM (GIBCO Cat Núm# 25030-24) i un 5% de Sodium Piruvate 100mM (GIBCO Cat Núm# 11360-039). Aquesta solució l'hem filtrat sota la campana per un filtre de GS 0.22 µm i després hem testat possibles contaminacions durant 48 hores a 37°C. La geneticina com a manteniment de la selecció l'hem incorporat en el medi a una concentració de 250 µg/ml. (GIBCO 50mg/ml Cat Núm#10131-019)

CONGELACIÓ I DESCONGELACIÓ DELS CLONS NIH3T3

Congelació

Hem realitzat stocks d'aquests clons que anirem descongelant per treballar en els diferents experiments. El nostre procediment és congelar tres vials a partir d'un flascó de cultius cel·lulars T75 (75 cm³ de superfície de cultiu) on les cèl·lules estan cresques amb una confluència d'un 70 a un 80%.

Tripsinitzem sense EDTA les cèl·lules i aturem la tripsina amb un volum de medi el doble que el que hem utilitzat per tripsinitzar. En aquest punt cal que les cèl·lules no s'aglutinin; per evitar-ho és important el control del temps. Centrifuguem a 4°C; 1.000 r.p.m. durant 10 minuts. Decanem el sobrenedant i trenquem el pellet de cèl·lules amb uns cops. Diluïm les cèl·lules amb tres mil·lilitres de medi de congelació. (Medi de congelació : D-MEM + 20% FSB + 10% DMSO, Dimetil sulfòxid, C₂H₆SO minimum 99.5%, SIGMA núm. cat. D5879 filtrat amb un filtre GS 0.22 µm.) Repartim un mililitre de la dilució en cada criotub. Ràpidament passarem a congelar els tubs utilitzant el un contenidor de congelació. (FREEZING CONTAINER, Nalgene "Mr Frosty", SIGMA, Núm. Cat. C1562). En aquests contenidor els tubs de congelació queden flotant en isopropanol a T.A que un cop el posem a -80°C va disminuint a temperatura lentament. Passades aquestes 4 hores l'isopropanol s'ha anat refredant a poc a poc fins arribar a -80°C, la temperatura del congelador. S'emmagatzemen els vials en nitrogen líquid.

Descongelació

Hem utilitzat el mètode de descongelació ràpida on les cèl·lules directament es passen a 37°C. En els primers dies de vida en el flascó hem utilitzarem el mateix medi de cultiu de les cèl·lules però al 20% de sèrum fetal boví.

Descongelem les cèl·lules agitant el tub en un bany de 37°C i les posem el tub de les cèl·lules ràpidament en gel. Vàrem afegir medi de cultiu a les cèl·lules, com a mínim amb una proporcionalitat d'un 1/10 per tal de dissoldre els crioprotectors i evitar la seva toxicitat. Centrifuguem a 10.000 r.p.m., 10 minuts a 4°C. Retirem el sobrenedant. Trenquem el pellet i resuspenem en medi de cultiu que sembrarem en un flascó. Si la congelació i descongelació ha funcionat bé amb dues o tres hores ja podrem observar cèl·lules adherides.

OBTENCIÓ DE MEDIS CONDICIONATS

Per obtenir medis condicionats de les cèl·lules transfectades es va controlar el nombre de cèl·lules en relació al volum de medi i el temps d'incubació. Ja que l'expressió del VEGF està demostrat que canvia segons la confluència del cultiu cel·lular. (Fleming, Ellis et al. 1997)

Es van sembrar plaques de 60mm de diàmetre amb 1 milió de cèl·lules cada una. Després de 24 hores de la sembra es va incubar les cèl·lules amb 2ml de medi de cultiu sense sèrum. (2 μ l medi / 1.000 cèl·lules / 0.06 mm²) Aquests medi va estar en contacte amb les cèl·lules durant 48 hores. Després es va recollir el medi. El vàrem centrifugar durant 10 minuts a 1.000 rpm, 4°C per eliminar els possibles detritus cel·lulars i es va alíquotar i congelar a -80°C. Les alíquotes un cop descongelades mai no es tornaven a congelar; d'aquesta manera evitàvem la degradació de les proteïnes.

ESTIMULACIÓ CÈL·LULAR AMB VEGF

Per comprovar l'estimulació que provoca el VEGF sobre les NIH3T3 transfectades les vàrem incubar amb el factor de creixement i posteriorment mesurarem l'activitat de fosforil·lació de ERK 1, ERK 2 i Akt. L'experiment es va realitzar paral·lelament amb cèl·lules HUVEC com a control positiu. Es va realitzar un cultiu al 70% de confluència sense sèrum durant 24 hores (200.000 cèl·lules / 6cm²). L'incubació del VEGF amb les cèl·lules va ser durant 10 minuts amb 20 ng/ml. (Oncogene Research Products VEGF165 Human Recombinant Cat: PF074). Vàrem retirar el medi amb VEGF i rentar les cèl·lules amb PBS. Directament es van lisar les cèl·lules amb tampó de lisis RIPA i es va realitzar l'extracció de proteïnes com està explicat en el protocols del Western Blot. Com ha mesura de base d'aquest experiment es van obtenir lisats de totes les cèl·lules sense depleccionar i depleccionades.

RECOLLIDA DE LES CÈL·LULES EN CULTIU I EXTRACCIÓ D'RNA AMB TRIZOL.

Van creixer els clons en plaques de 3.5 cm de diàmetre a una confluència de 70 - 80%. Sempre amb el medi de cultiu normal de cada tipus de cèl·lules amb l'antibiòtic si correspon. Després de dos rentats amb PBS estèril vàrem afegir directament una solució comercial amb fenol (Trizol) que lisa i separa els components cel·lulars al mateix temps. Vàrem afegir 1ml de trizol per placa de cultiu i recollirem amb un rascador cel·lular. Per tal de que la mostra quedés ben homogeneïtzada la vàrem passar repetides vegades per una agulla de 25G. Vàrem incubar la mostra 5 minuts a 4°C i afegir 0.2ml de cloroform per cada 1ml de Trizol utilitzat. Després de centrifugar 15 minuts a 12.000g a 4°C, vàrem recuperar la fase superior aquosa (Descartem la fase inferior fenòlica i la interfase que contenen les proteïnes i el DNA), on vàrem afegir 0.6ml d'isopropanol per cada mililitre de Trizol utilitzat inicialment. Després d'agitar enèrgicament vàrem centrifugar 30 minuts a 7500g a 4°C. El pellet resultant conté l'RNA que vàrem rentar amb etanol 70%. El RNA es va dissoldre amb aigua lliure RNases i es va mesurar en un espectrofotòmetre a una dilució 1/200. La proporció Abs.260/Abs.280 cal que sigui superior 1.6 per tenir el mínim d'impureses. La quantitat d'RNA es va calcular: Concentració RNA $\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Abs. 260} \times 0.04 \times 200$

Els espectrofotòmetres sempre tenen un alt grau d'error, per assegurar la mesura dels RNAs els vàrem corre en un gel d'agarosa 1% fins aconseguir igualar la càrrega.

Liofilització del RNA: Un cop vàrem tenir les càrregues igualades, vàrem liofilitzar 30 μg de RNA al buit. D'aquesta manera vàrem aconseguir obtenir la concentració d'RNA que desitjàvem igualant totes les mostres en volum de càrrega.

ESTABILACIÓ i INOCULACIÓ DELS RATOLINS ATÍMICS

DESCRIPCIÓ DEL MODEL ANIMAL

Els inòculs subcutanis de les cèl·lules es van realitzar amb ratolins Swiss nude. Aquests ratolins és caracteritzen per tenir el gen nude recessiu en homozigosi (nu/nu). Aquesta mutació provoca la pèrdua del pelatge i un timus anormal que repercuteix en un nombre deficient de cèl·lules T, baixa producció de IgG durant la resposta secundària degut al descens de l'activitat dels limfòcits T helper i també tenen deficiències hormonals. (Daneva, Spinedi et al. 1995) El nombre de cèl·lules T incrementa amb l'edat i als 7 mesos arriba a nivells semblants a un ratolí normal apareixent en aquest període les cèl·lules productores de interleuquina 2 (IL-2) necessària per la producció de limfòcits T. Les cèl·lules Natural Killer (NK) en aquesta soca de ratolins són també deficientes i augmenten la seva activitat de la 4 a la 8 setmana d'edat, es discuteix com afecta ja que aquestes cèl·lules s'originen independentment del timus, no tenen memòria en la resposta secundària i actuen a través del complex de histocompatibilitat, però sabem que hi ha tumors que no creixen en ratolins més grans de 8 setmanes i que algunes soques de ratolins atímics amb alta activitat de cèl·lules NK tenen resistència a alguns tumors. (Ohyama, Kanto et al. 2002) Aquestes característiques ens permet que acceptin excepcionalment el creixement xenograft o alografs tan de teixits normal com malignes dins del període inicial de la seva vida. (Yokoyama, Kim et al. 2004)

PROCEDIMENT D'INOCULACIÓ SUBCUTÀNEA

Es van comprar a *Charles River Laboratories* 25 ratolins *Swiss nude* de 4 setmanes. Els nostres inòculs es van realitzar en la setmana 6 de la vida dels ratolins i l'experiment es va prolongar fins a la setmana 11. L'experiment es va realitzar dins del període on la proporció de viabilitat de supervivència a l'inòcul i reacció immunològica del ratolí és la més òptima.

Es van realitzar cinc grups de ratolins (5 ratolins per grup), a cada grup se li va inocular un clon cel·lular diferent. (NIH3T3 parentals , NIH3T3 neo (El plàsmid sense el gen K-Ras) , NIH3T3 WT (K-Ras humà sense mutacions) , NIH3T3ASP13 (K-Ras humà amb mutació en el codó 13, G:C-A:T / gly-asp) , NIH3T3 CYS12 (K-Ras humà amb mutació en el codó 12, G:C-A:T / gly-cys). Els ratolins van incubar dos tumors cadascú, per tan disposem de 10 tumors de cada clon.

Aquest experiment es va realitzar dues vegades de manera independent. El primer cop l'any 2000, l'experiment s'anomena E29/2000 i el segon cop un any més tard , l'anomenarem E12/2001.

Els fibroblasts NIH3T3 i els transfectats es van cultivar a una confluència del 70-80% i després es van tripsinitzar i recollir per inocular. Va ser convenient evitar que realitzessin agregats cel·lulars entre elles. Amb pocs segons d'exposició a la tripsina vàrem aconseguir una homogeneïtat idònia.

Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb medi sense sèrum i la concentració de treball va ser de 10^6 cèl·lules/100 μ l. Els inòculs es varen realitzar sense anestèsia prèvia als animals, subcutàniament a la pell dorsal i en espais ben diferenciats: un a la dreta del animal i a la part anterior i l'altre a l'esquerra i a la zona posterior. Cada inòcul contenia un milió de cèl·lules.

Aquests animals es controlaven diàriament de manera visual i dos cops a la setmana es seguia un protocol de control de : pes , respiració, defecacions, mobilitat, mesura tumoral... sempre que es considerava que l'animal estava patint es retirava de l'experiment i es sacrificava.

La mida del tumor es mesurava amb un peu de rei i es prenia nota del diàmetre més gros i del més petit. Quan un dels diàmetres feia un centímetre s'extirpava el tumor. En el cas de ambdós tumors del mateix ratolí arribessin al centímetre es sacrificava l'animal directament. Si no era així, es realitzava l'extirpació del gros i es deixava el ratolí viu.

L'extirpació és realitzava sota anestèsia. Utilitzem com a anestesiant el tribromoetanol amb el metil butanol en les següents proporcions:

Solució estoc

25 grams de 2,2,2-Tribromoethanol 99% Ref: T48402 (Sigma Aldrich)

19.5 ml de 2 Methtyl 2 butanol 99% Ref: 24-048-6 (Sigma Aldrich)

Aquests productes cal que es manipulin amb instrumental de vidre.

Aquesta solució es conserva a T.A. preservada de la llum.

Solució de Treball

0.24 ml de la **Solució estoc**

10ml suero fisiològic.

Per tal de que quedi ben dissolt cal escalfar la solució a 37°C.

Dosi per ratolins atímics Swiss

10 µl de solució de treball per gram de ratolí.

Abans d'administrar, escalfar a 37°C.

L'administració és intraperitoneal.

Aquest protocol de treball va estar aprovat per la Comissió d'Experimentació animal corresponent a l'estabulari de petits rosegadors de l'Institut Català d'Oncologia.

PROCESSAMENT DE LES MOSTRES TUMORALS SUBCUTÀNES

Els teixits tumorals recollits es dividien en tres parts. Una de més grossa que es congelava amb nitrogen líquid en un criotub estèril. La part més petita que s'inclouia amb formol tamponat i es processava per realitzar un bloc de parafina amb el següent procés:

Fixació amb formol tamponat 12 hores. (Formol tamponat 10% ph 7.4), deshidratació (Etanol de 70%, 96%, 100% i xilol) i parafinació.

La tercera part del tumor es congelava amb OCT. (Alcohol polyvinyl (< 11%), cera carbònica (<5%) i ingredients no reactius (<85%).) De manera que es preservava la morfologia del teixit i permetia realitzar posteriorment talls histològics de material congelat. La congelació del teixit es convenient que sigui lenta per evitar la formació de cristalls d'aigua dins de les cèl·lules. Per això aquesta congelació es realitzava a través d'isopropanol o metilbutanol i no directament sobre la neu carbònica o el nitrogen líquid. Aquest tractament del teixit només es va realitzar amb els tumors subcutanis del segons experiment E12/2001 amb els clons transfectats.

CARCINOMES HUMANS DE COLON I RECTE

DESCRIPCICÓ DE LA SÈRIE

Vam utilitzar tumors que són part d'un estudi hospitalari de casos i controls entre Gener de 1996 i Desembre de 1998 amb l'objectiu d'estudiar interaccions genoma-ambient en el desenvolupament del càncer colorectal. Els casos van ser pacients diagnosticats "de novo"

d'adenocarcinoma colorectal i tractats a la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Es va establir un acord amb els primers 176 casos operats consecutivament, de manera que van ser seguit prospectivament per tal de determinar el valor pronòstic de diferents alteracions genètiques. Es va disposar del consentiment escrit de tots ells per a participar i cedir mostres per a ser analitzades genèticament. D'aquesta sèrie hem analitzat 95 casos amb marcadors angiogènics. Els pacients comprenen 65 homes i 30 dones, amb un rang d'edat d'entre 37-91 anys i una mediana de 67 anys. Tots els casos han estat determinats anatomopatològicament mitjançant el sistema de Dukes modificat per Astler-Coller. La distribució per estadis fou de 46 carcinomes amb estadi de Dukes A-B1-B2, 31 amb Dukes C1-C2 i 17 amb Dukes D. Es van localitzar al colon esquerre 33 carcinomes, 25 al colon dret i 37 casos al recte. La intervenció quirúrgica va ser considerada radical 76 casos i paliativa en 17 casos. Trenta-tres pacients van rebre tractament quimioteràpic seguint els protocols standard de 5-FU. Vam disposar de seguiment clínic per a tots els pacients, amb una mediana de 56,47 mesos. La supervivència global i la supervivència lliure de malaltia van ser calculades des de la data de la intervenció quirúrgica fins la de la mort, recidiva o darrera visita. La raó de supervivència global a 3 i 5 anys va ser de % respectivament. Les peces quirúrgiques van ser immediatament transportades en gel després de la seva obtenció al Servei d'Anatomia Patològica. Mostres aparellades de mucosa normal i adenocarcinoma van ser fixades en formol i incloses en parafina per al seu posterior examen anatomopatològic i per realitzar el nostre estudi.

IMMUNOHISTOLOGIA

REALITZACIÓ I PROCESSAMENT DELS TALLS HISTOLÒGICS

Teixits o cèl·lules parafinats

Els teixits fixats amb formol i parafinats conserven la seva morfologia i permeten el seu tractament a molts nivells. El suport de la parafina li dóna consistència al teixit i permet realitzar talls de tres micres de gruix.

Per tal de que els teixit no es separin del porta objecte durant la tècnica, cal que aquest estigui cobert amb poli-l-lisina o altres polisacàrids d'adhesió com silane. Comercialment venen porta objectes amb càrrega estàtica que proporcionen l'efecte d'adhesió desitjat. En alguna casos ho hem utilitzat però el més utilitzats són els coberts amb poli-l-lisina.

Els blocs dels teixits parafinats els tallem en el microtom i els estenem en un bany d'aigua destil·lada calenta (42°C). D'aquest bany passem els talls al porta objectes prèviament tractat com ho creiem convenient. Eixugarem el teixit a 37°C un mínim de 10 hores.

Teixits congelats

Es preferible que els porta objectes estiguin tractats amb poly-l-lisina , silane o bé elèctricament carregats. Cal recollir els talls amb el porta objectes sec.

Els talls del criostat seran de 3 a 5 micres. Un cop enganxats sobre el porta objectes els congelem a -20°C. Es descongelaran el mateix dia d'utilitzar-los es temperen i es fixaren amb formol tamponat cinc minuts. Incubem un mínim de 5 minuts els teixits amb PBS 1X i comencem el protocol de marcatge amb anticossos.

IMMUNOHISTOQUÍMICA:

La immunohistoquímica és una tècnica de detecció de proteïnes sobre talls de teixits basada en l'habilitat dels anticossos en reconèixer proteïnes. S'utilitza molt extensament des de fa mig segle en recerca i en el diagnòstic de malalties patològiques humanes. La seva sensibilitat varia segons quatre premisses: 1.- La concentració de la proteïna que busquem en el teixit problema. 2.- Com afecta la fixació del teixit a la conformació de la proteïna. 3.-La localització i accessibilitat de la proteïna problema en el teixit. 4.- La especificitat de l'anticòs utilitzat. Els controls regulars que utilitzem en una tècnica de immunohistoquímica segons les seves característiques són:1.- Posar en contacte el mateix anticòs amb diferents teixits o teixits de diferents espècie per determinar que la seva possibilitat és la descrita com a correcte. 2.- Realitzar la tècnica amb una incubació prèvia de l'anticòs amb la proteïna específica aïllada. 3.- Desenvolupar la tècnica sense anticòs primari per observar les possibles unions de la resta dels productes utilitzats.

La immunohistoquímica és en molts casos una tècnica menys sensible que treballar amb un lisat de proteïnes i realitzar un Western Blot o una ELISA, però per altra banda ens determina localització i morfologia que no ens podran donar les altres tècniques.

El sistema de valoració és un punt de controvèrsia . Encara no hi ha sistema quantitativs establerts que determinin un valor numèric de forma automàtica i reproduïble. Sota unes normes, però és l'ull humà i el seu criteri qui intervé en aquesta valoració. Per reduir al màxim aquesta influència, cal valorar els resultats sota uns paràmetres el màxim d'objectius com: marcatge o no marcatge. Els punts mitjos sempre són els conflictius, per això predomina la determinació del nombre de cèl·lules positives respecte a nombre de cèl·lules totals en lloc de valorar la intensitat del marcatge. Només en marcatges on les diferències siguin molt evidents els resultats són reproduïbles i útils.

Els protocols que hem utilitzat per assenyalar proteïnes en teixits tenen en comú el processament dels teixits i dels talls que ja he explicat anteriorment i els tampons utilitzats que us detallo en aquest apartat.

PBS 10 X : 1.5M NaCl
 90mM Na₂HPO₄
 10mM KH₂PO₄

Solució de citrat sòdic 1 X : 18mM Àcid cítric
 82mM Citrat sòdic

Molècula d'adhesió plaquetària 1 de ratolí en les cèl·lules endotelials : PECAM-1.

Aquesta tècnica es va realitzar sobre els talls de teixits congelats dels tumors subcutanis. Aquests talls estaven a -20°C i es van temperar el mateix dia del processament. Després de la fixació es van inactivar les peroxidases endògenes amb una incubació de 10 minuts amb aigua oxigenada a l'1%. Els rentats per netejar l'aigua oxigenada es van realitzar amb aigua destil·lada. Després es va permeabilitzar el teixit amb PBS 1X amb Tween 20 a l'1%. Els teixits es van bloquejar a temperatura ambient amb una solució d'elevada concentració amb sèrum de cabra (5%) i albúmina bovina (3%) durant una hora. Es va utilitzar un anticòs comercial fabricat per Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, Rat Monoclonal anti-PECAM de ratolí especial per realitzar immunohistoquímica. (Cat. Núm: 550274, clon: MEC13.3). La incubació amb l'anticòs anti-PECAM va ser a una dilució 1/10 durant tota la nit a 4°C i mitja hora posterior a temperatura ambient per temperar les mostres abans de continuar el procés. Prèviament a la incubació amb un anticòs secundari es realitzen tres rentats de 10 minuts cadascú amb PBS1X i Tween 20 a l'1%. L'anticòs secundari anti-rata biotinilat utilitzat va ser de Dako Diagnostics (Cat. Núm. E468) diluït 1/200 amb PBS1X + 5% sèrum de cabra + 1% d'albúmina bovina. Durant una hora l'anticòs anti-rata va estar en contacte amb els teixits i després de rentar-los per eliminar el producte que no s'havia unit a la mostra es va amplificar la senyal amb complexes d'avidina i biotina. (Vector Laboratories, Cat. Núm: PK4000). Després

de rentar els teixits amb PBS1X i Tween 20 (1%) es va realitzar la reacció de la peroxidasa per oxidar la Diamino Benzidina i fer-la precipitar per poder visualitzar la unió dels anticossos i localitzar la proteïna PECAM en les cèl·lules endotelials.

Factor de creixement de l'epiteli vascular : VEGF

Els talls de teixit on es van determinar els nivells i la localització de la proteïna VEGF estaven parafinats. La desparafinació es va realitzar a través d'una bateria de xilols i etanols de la següent manera: 4 xilols, 3 etanols, 3 alcohols de 96% i 1 alcohol de 70%. Les incubacions es realitzen de 10 minuts en els xilols i 5 en els etanols. Després d'un rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada es realitzava un xoc tèrmic al microones (900W) de tres minuts amb solució de citrat sòdic. Les mostres es deixen refredar dins del mateix tampó calent un mínim de vint minuts. Com a pas previ a les incubacions dels anticossos, eliminarem l'efecte de les peroxidases endògenes amb la incubació d'aigua oxigenada a l'1% durant 10 minuts. Després es va rentar i permeabilitzar les mostres amb PBS1X + Tween 20 a l'1% i es van incubar durant dues hores a temperatura ambient amb sèrum de cabra al 5% i 1% d'albumina bovina. L'anticòs per reconèixer la proteïna VEGF que es va utilitzar va ser un policlonal de conill (Santa Cruz # sc-152 A-20, 200 µg/ml). Vam dissoldre l'anticòs amb PBS1X + 1% d'albumina bovina a 1/100 i es va incubar a 4°C durant tota la nit. Després de temperar les mostres i els rentats de PBS1X + 0.2% de Tritó 100X es va incubar mitja hora a T.A. l'anticòs secundari. En aquests cas es va utilitzar el producte Envision anti conill . (Dako #K4003). Envision és una producte comercial que consta d'una molècula de dextrà amb varis anticossos IgG units i múltiples peroxidases. D'aquesta manera augmentem el senyal sense perdre l'especificitat de l'anticòs. El revelat es va realitzar amb D.A.B. Plus (Dako #4001). Aquest *mini kit* disposa d'un tampó i un cromògen líquid. Es prepararà com en els cas dels anticossos 100 µl per porta objecte amb una proporció de 20 µl de cromògen per 1.000 del tampó. La incubació serà d'un minut. Després es renta amb aigua , es deshidraten les mostres i es cobreixen amb medi de montatge D.P.X i un vidre de cobertura.

Marcatge dels vasos sanguinis i macròfags amb lectina de tomàquet.

Les lectines són un conjunt de proteïnes que reconeixen de manera molt específica i per l'estructura química, complexes de sucres units a proteïnes o lípids. Aquestes proteïnes estan presents en el regne animal, vegetal i en microorganismes com els bacteris i els virus. L'any 1888 Hermann Stillmark, presenta les propietats d'aglutinació de la ricina purificada d'unes llavors i comencen a sorgir conceptes com l'aglutinació que acabarà de definir-se cap als anys 50 (Com propietat d'unir eritròcits o altres tipus cel·lulars) i la lectinologia que es creu creada per Sharon i Lis al 1972 . Defineixen lectinologia com a la utilització d'aquestes proteïnes i les seves propietats, especialment en histopatologia aprofitant el seu reconeixement tan específic de diferents tipus cel·lulars. Actualment aquestes molècules són utilitzades amb moltes altres finalitats com: avaluacions histològiques (tipus cel·lulars, estats cel·lulars, integritat de components cel·lulars ...) (Ulfig, Bohl et al. 2004), dianes de drogues (Bies, Lehr et al. 2004) i per purificar altres molècules entre altres.

Lycopersicon esculentum és un tipus de tomàquet que produeix una lectina que de manera específica, s'uneix a (4GlcNAc₁)₂₋₄, un glúcid. S'ha demostrat que es pot utilitzar per tenyir macròfags, microglia, neumòcits, cèl·lules endotelials i d'altres epitel·lis en diferents espècies . (Barkhordari, Stoddart et al. 2004) (Ulfig, Bohl et al. 2004)

En les nostres mostres tumorals de ratolins hem utilitzat la lectina del tomàquet biotinilada per marcar endotelials i macròfags de ratolins.

Aquesta tècnica s'ha realitzat en talls parafinats de 3 micres. La desparafinació es va realitzar químicament per una bateria de xilols i etanols de la següent manera: 10 minuts en 4 banys de xilol, 5 minuts en un gradient de banys d'etanol per acabar amb la mostra hidratada amb aigua.

Per tal de desenmascarar el sucre que va reconèixer la lectina realitzem un procés amb calor en un microones . Les mostres es van submergir en un bany de solució de citrat sòdic 1X i es van sotmetre a les radiacions del microones duran 2 minuts i mig. Després de temperar les mostres en el mateix tampó un mínim de 20 minuts es van inactivar les peroxidases endògenes. Per tal

d'evitar unions inespecífiques dels anticossos els teixits es van bloquejar amb sèrum de cabra i després es va incubar la lectina biotilada dissolta 1/20 (Sigma - Aldrich #L-0651, 20mg/ml) amb solució de PBS 1X tota la nit a 4°C. L'accés es va rentar 3 vegades amb PBS1X + 0.1% Tritó 100X. Cada rentat durant 5 minuts. Per poder amplificar la reacció de precipitació de la diamonobenzidina es van unir complexes d'avidina i biotina a la biotina de la lectina . Vàrem incubar aquests complexos amb la mostra diluïts 1/200 amb PBS1X + 0.1% TRITÓ 100X durant $\frac{1}{2}$ hora. Es van realitzar els rentats després de la incubació i es va oxidar i precipitar la DAB. El contrast el vàrem realitzar amb hematoxilina de Harris.

Marcatge específic de macròfags

Amb aquesta tècnica s'aconsegueix senyalar els macròfags i cèl·lules del mateix llinatge en els tumors subcutanis parafinats dels ratolins atòmics induïts per les cèl·lules transfectades amb diferents mutacions del K-Ras. L'anticòs utilitzat dirigit contra un antigen F4/80 específic per aquests tipus de cèl·lules en ratolí. (Chan, Leedy et al. 2005)

Els teixits parafinats es van desparafinar i es van sotmetre a una digestió de tripsina 0.1% durant mitja hora a 37°C. Després d'inactivar les peroxidases endògenes amb aigua oxigenada es va realitzar un bloqueig inespecífic del teixit amb una concentració elevada de sèrum de cabra (20%). La incubació de l'anticòs primari es va realitzar durant una hora a temperatura ambient i a una concentració de 1/50 diluït amb PBS1X i 5% de sèrum de cabra (Rat anti-mouse F4/80 antigen; Serotec # MCA497GA, 0.1mg/ml). Els rentats per eliminar l'excés d'anticòs es van fer amb PBS1X i Tween 20 a l'1%. L'anticòs secundari utilitzat es va diluir a 1/50 amb PBS1X i es va incubar durant 30 minuts a temperatura ambient (Goat anti-Rat IgG HRP conjugated; Serotec # STAR72). La diamini benzidina va ser el cromògen utilitzat i el contrast es va realitzar amb hematoxilina.

Marcatge de CD31 humà i VEGFR2 humà

Aquests marcatges es van realitzar en talls parafinats de carcinomes de colon i recte humans. La desparafinació es va realitzar a través d'una bateria de xilols i etanols. Després d'un rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada es realitzava un xoc tèrmic de dos minuts en una olla a pressió amb solució de citrat sòdic. Les mostres es deixen refredar dins del mateix tampó calent un mínim de vint minuts. Vàrem inactivar les peroxidases endògenes amb una incubació d'aigua oxigenada a l'1% durant 10 minuts. Després es van incubar durant dues hores a temperatura ambient amb sèrum de cabra al 5% i 1% d'albumina bovina. L'anticòs va ser un monoclonal de ratolí (Dako #M0823 clon: JC/70A, Diluït 1/100). Per visualitzar el VEGFR2 vàrem disposar d'un anticòs monoclonal de ratolí (Santa Cruz # sc-6251 A-3, 200 µg/ml Diluït 1/150). Els anticòs es van incubar a 4°C durant tota la nit i mitja hora posterior per temperar les mostres a T.A. L'anticòs secundari utilitzat va ser Envision anti ratolí. (Dako #K4001). El revelat es va realitzar amb D.A.B. Plus (Dako #K3468) amb una incubació d'un minut. Després es renta amb aigua, es contra tenyeixen les mostres amb hematoxilina de Harris i es deshidraten per montar-les.

IMMUNOFLUORESCÈNCIA:**Molècula d'adhesió plaquetària 1 de ratolí en les cèl·lules endotelials : PECAM-1.**

Sobre els teixits congelats dels tumors es va realitzar l'immunofluorescència per detectar PECAM. El tractament del teixit ja està explicat en la detecció química de la mateixa molècula.

La incubació amb l'anticòs anti-PECAM (Rat Monoclonal anti-mouse PECAM #550274, clon: MEC13.3) va ser a una dilució 1/50 durant tota la nit a 4°C i mitja hora posterior a temperatura ambient per temperar les mostres abans de continuar el procés. Prèviament a la incubació amb un anticòs secundari es realitzen tres rentats de 10 minuts cadascú amb PBS1X i Tween 20 a l'1%. l'anticòs secundari Alexa Fluor de cabra anti-rata marcat amb rodamina, es

dilueix a 5µg/ml amb PBS1X . Durant una hora l'anticòs anti-rata va estar en contacte amb els teixits i després de rentar-los per eliminar el producte que no s'havia unit a la mostra es cobreixen amb medi de muntatge aquós de Biomedica.

Doble immunofluorescència de PECAM amb : DESMINA o ANTI α -SMA

Aquesta tècnica sempre s'ha realitzat sobre teixits congelats que els vàrem processar com ja hem explicat prèviament. Abans de la incubació de l'anticòs anti PECAM es va realitzar dues hores d'incubació amb el segon marcatge que correspongui en cada ocasió. Els anticossos i dilucions utilitzades les especificuem en la taula adjacent. Entre la incubació dels dos anticossos de reconeixement de les proteïnes es van realitzar rentats amb PBS1X i 1% de Tween 20. Després de la incubació amb anti PECAM durant tota la nit, temperem les mostres i les rentem. En qualsevol dels altres dos marcatges es van utilitzar per reconèixer l'anticòs primari un anticòs de cabra anti-conill marcat amb FITCH de la casa comercial Alexa. Vàrem posar en contacte els teixits amb aquest anticòs durant una hora a una dilució 1/300 amb PBS1X. Després de tres rentats de les mostres vàrem incubar l'anticòs de cabra anti-rata marcat amb rodamina, per reconèixer el primari de PECAM. Es va col·locar un cubre-objectes amb medi aquós de Biomèdia després de rentar l'excés de secundari.

TAULA : ANTICOSSOS UTILITZATS EN IMMUNOFLUORESCÈNCIA

ANTIGEN	CASA COMERCIAL	ORIGEN	DILUCIÓ UTILITZADA
PECAM	Becton Dickinson Biosciences Pharmingen #550274	Monoclonal de rata Clon: Mec13.3	1/50
Desmina	Neomarkers #RB9014	Policlonal de conill	1/700
α -SMA	Labvision #RB9010	Policlonal de conill	1/100

VALORACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS MARCATGES IMMUNOHISTOLÒGICS

La tècnica química i fluorescent dels marcatge de la **molècula d'adhesió plaquetària 1** i la de la **lectina** s'han valorat de la mateixa manera. Hem analitzat una secció de cada tumor i cinc camps de 400X en cada una que representaven les zones de màxima vascularització dins del tumor. S'ha comptabilitzat el nombre de vasos sanguinis assenyalats pel marcatge independentment de poder observar la seva llum vascular.

El marcatge del factor vascular **VEGF** s'ha valorat en les cèl·lules tumorals. S'ha considerat que un percentatge superior del 20% de cèl·lules tenyides era un tumor positiu. Els casos positius els hem separat en dos grups: 20-60% de cèl·lules positives (+) o bé > 60% de cèl·lules positives (++). La diferència de les intensitats en el marcatge no ha estat valorada per no ser prou diferent a l'ull humà.

El marcatge dels **macròfags** ha estat valorat en tota la secció dels tumors. S'ha valorat el nombre de cèl·lules tenyides.

La valoració del marcatge de **VEGFR2** en els teixits i tumors humans es realitzar agrupant els casos en tres grups diferents segons el marcatge cel·lular, tant en cèl·lules endotelials com en tumorals. Segons el percentatge de cèl·lules tenyides determinàvem intensitat 0 quan no trobàvem cèl·lules marcades, intensitat 1 quan el percentatge del marcatge era entre un 20-50% de les cèl·lules. Hem classificat com a intensitats 2 i 3 als teixits amb més del 50% de cèl·lules marcades, amb la diferència d'observar més o menys intensitat. Es van separar aquestes dues intensitats perquè en aquest marcatge eren molt evidents.

Els dobles marcatges immunofluorescents α -**SMA** i **desmina** han estat analitzats a través d'un microscopi confocal Leica. Hem realitzat un anàlisi visual de les mostres per determinar els tipus de marcatge que es podien localitzar en cada cas. En aquest anàlisi hem determinat quin tipus de cèl·lules o en quines localitzacions es trobaven respecte els vasos sanguinis. Hem pres molta cura en observar si els fibroblastes tumorals eren positius, en quina proporció i la seva situació respecte els vasos sanguinis especialment si tenien prolongacions damunt de l'endotelial. Després ens hem centrat en les zones més vascularitzades de cada tumor i hem determinat la quantitat de marcatge al voltant dels vasos. Només indicant si era abundant o escàs. Posteriorment, per tenir una mesura objectiva hem aprofitat un dels sistemes de quantificació del *software* de captura en el microscopi confocal : Leica Confocal Software . *Lite version Copyright 1997*. De cada tumor hem realitzat un mínim de cinc fotografies de les àrees més vascularitzades. Aquestes fotografies només són un sol pla aproximadament de 300 nm. El programa d'ordinador analitza les intensitats de cada fluorocrom seguint una ratlla

imaginària de 265.17 μm sempre en el centre de la fotografia. Aquestes intensitats es presenten en forma d'histograma. Sobreposant l'histograma de cada fluorocrom hem calculat el nombre de pics que colocalitzen per tal de determinar només la quantitat de marcatge dels dos fluorocroms que coincideixen en el mateix punt i en punts continus. Els controls negatius dels teixits tenyits on hem incubat els anticossos secundaris però no els primaris van ser analitzats de la mateixa manera. En aquesta ocasió es va realitzar una mitja de les intensitats dels pics d'aquestes mostres que ens va determinar els pics provocats per l'anticòs secundari o la pròpia fluorescència d'altres reactius. Hem considerat d'aquesta manera la unió inespecífica dels anticossos secundaris en el teixit problema. Els pics de les mostres amb el doble marcatge iguals o inferiors a aquestes intensitats no van ser considerats.

En aquestes valoracions hem tingut el suport i la supervisió de dos patòlegs : Dr. Felip Vilardell i Dr. Esther Oliva.

Per als **càlculs estadístics** es va fer servir el programa informàtic *Statistical Package for Social Science* (SPSS). Els anàlisi de comparació de dades entre els grups de tumors subcutanis es van realitzar per proves no paramètriques (Mann-Whitney). Les taules de contingència per a correlacions clinicopatològiques van ser analitzades per mitjà del test Cox; tenint en compte l'estadiatge de Dukes. Van ser considerats estadísticament significatius valors de "p" inferiors a 0.05. La supervivència global i la supervivència lliure de malaltia van ser calculades per mitjà del mètode de Logrank amb una gràfica de Kaplan-Meier. Per treballar amb la base de dades dels tumors humans hem utilitzat el sistema del servei d'epidemiologia de l'ICO amb el suport de l'estadística Elisabet Guinó.

OBTENCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES.

LISI DE CÈL·LULES EN CULTIU I TUMORS : EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES.

La lisi de cèl·lules o teixits es pot realitzar de diverses maneres i amb diferents tampons. La tria d'aquests protocol es realitza en funció de la tècnica a realitzar posteriorment i del tipus de proteïna que estem estudiant.

Hem utilitzat el tampó de lisi RIPA força desnaturalitzant degut als detergents iònics que porta: Sodi dioxicolat i el Sodi dodecil sulfat i que trencarà algunes de les unions covalents entre proteïnes . Els inhibidors afegit al tampó de lisis han estat: Aprotinina (1 µg/ml) , Leupeptina (1 µg/ml) i el Fenilmetil sulfonil fluoridric (PMSF 50 µg/ml).

Tampó RIPA: 150 mM NaCl
 1 % NP-40 (Nonidet-40)
 0.5% Sodi deoxicolat
 0.1% SDS
 50 mM Tris, pH:8

Els **teixits** els hem disgregat i homogenitzat mecànicament tallant amb un bisturí, amb politron i/o provocant el pas per una agulla 25G. Les **cèl·lules en cultiu** es van recollir directament de la placa amb tampó RIPA i inhibidors de proteases i es van homegenitzar a través d'una agulla 25G. Els lisats es van incubar entre 20 minuts i una hora a 4°C en gel. Vam centrifugar 15 minuts a 4°C a 15.000 rpm. Recuperàvem el sobrenedant en un eppendorf net i tornàvem a centrifugar el pellet 10 minuts a 15.000 rpm. El sobrenedant (Les proteïnes dissoltes) el guardem a -80°C.

LISI ESPECÍFICA PER ZIMOGRÀFIA

L'extracció proteica per realitzar zimogrames es va tractar de manera especial per requeriments de conservació en l'activitat dels enzims. L'homogenització dels tumors i el lisat cel·lular es va realitzar amb el tampó de lisis següent:

Tampó de lisi: 500mM Tris , pH 7.6
 200mM NaCl
 10 mM CaCl₂
 1% Tritó 100X

L'homogenització dels teixits es va fer amb la proporció de 100 µl per 10 mg de **teixit** . S'incubava a 4°C durant una hora per lisar les cèl·lules i resuspendre les proteïnes.

En el cas de les **cèl·lules en cultiu** el lisat es va realitzar directament sobre la placa després de tres rentats amb PBS 1X. S'utilitzava 1ml de tampó de lisi per cada placa de 10 cm de diàmetre i es mantenia a 4°C durant 15 minuts en agitació suau. Es recollia el lisat amb un rascador cel·lular.

Les mostres es centrifuguen a 14.000g durant 15 minuts i es recupera el sobrenedant on han quedat resuspeses les proteïnes. Aquest extracte es va valorar amb la quantificació de Bradford.

QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

Per tal de poder comparar els resultats partint de la mateixa quantitat de proteïna lisada, cal mesurar la quantitat de proteïnes totals que contenen els extractes que hem realitzat.

El mètode de Bradford es basa en la unió de la proteïna al blau de comassie que es llegeix colorimètricament a absorvència màxima a 595nm. Les mostres problema es determinen per interpolació a una recta patró de concentració de BSA.

Reactiu de Bradford: <i>Comassie blue G-250</i>	100 mg
Etanol absolut	50 ml
Acetat Ortofosfòric	100 ml
Aigua destil·lada	200ml

Aquest reactiu es pot comprar comercialment a diferents cases comercials. Bio Rad és el que hem utilitzat en aquests resultats.

Recta patró: La recta patró es realitza amb concentracions de BSA des de 2µg/ml fins a 25 µg/ml.

En cada pou d'una placa d'Elisa es valoraran 160 µl de mostra, les mostres problema les vàrem diluir perquè els valors entressin dins de la recta patró. Aquesta recta només es va donar com a vàlida si el seu coeficient de correlació està entre 1 i 0.98. Després podrem fer l'extrapolació de les mostres problema.

ANALISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT.

ELECTROFORÈSI

Les proteïnes totals de cada mostra es van separar per tamany en gels d'acrilamida. L'entramat d'aquests gels serà més o menys concentrat segons les necessitats de cada proteïna amb la que treballem. La preparació dels gels d'acrilamida consta de dues parts: el gel concentrador i el gel separador. El gel concentrador té un 4% d'acrilamida més el 125mM de Tris base a PH = 6.8 i 0.1% de SDS. Aquest gel concentra les proteïnes en un front comú d'avançament malgrat tinguin diferents tamany. El gel que separa les proteïnes per tamany es realitza a concentracions del 7.5 al 12% d'acrilamida. Aquest gel tenia una concentració de sals major que el concentrador, 9.4 M de Tris base a PH = 8.8 i un 0.1% de SDS. La polimerització de l'acrilamida es potencia i s'accelera amb APS 1% i TEMED 0.1% que s'afegí en el moment

d'escampar el gel entre els dos vidres. L'electroforèsi es realitzarà a través del següent tampó :

Tampó d'electroforèsi: 125mM Tris base
 959mM Glicina
 17mM SDS

Es carregaven de 30 a 50 µg de proteïna per mostra en cada carril, el lisat protèic es barrejarà amb el tampó mostra de manera que la concentració final d'aquests sigui de 1X. Aquest tampó portarà un agent desnaturalitzant de proteïnes que en les nostres mostres ha estat β-mercaptoetanol al 5% o bé DTT a 0.03mM.

Tampó mostra 5X: Trizma base PH: 6.8 60 mM
 Glicerol 25%
 SDS 0.2%
 Blau Bromofenol 1% 0.1%

L'electroforèsi es va realitzar a 100V constants i mantenint la temperatura de tot el procés a 4°C. En cada un dels gels s'ha destinat un pou per una escala comercial de proteïnes de diferents tamany. (Invitrogen, BenchMark Prestained Protein Ladder #10748-010). Aquesta mostra s'utilitza com a referència dels tamany de proteïna. Està tenyida de color blau amb una banda de referència de color magenta aproximadament de 62.4 KDa.

TRANSFERÈNCIA

La transferència de les proteïnes del gels d'acrilamida a les membranes es va realitzar a través d'un camp elèctric (Towbin, Staehelin et al. 1979) amb l'aparell MINI PROTEAN II de BIO RAD. Es van utilitzar membranes de nitrocel·lulosa (Hybond ECL #RPN203D Amersham Pharmacia Biotech) o membranes de polyvinylidene fluoride (PVDF-Bio-Rad, Hercules, CA) indistintament.

La membrana humida s'estira sobre un paper d'alta absorció al damunt d'un filtre esponjós. El gel es situa damunt de la membrana i s'eliminen les bombolles d'aire que puguin quedar entre el gel d'acrilamida i la membrana. Es cobreix amb un nou paper absorbent i un altre filtre esponjós i es tanca tot entre dos suports de plàstic quedant així tots els components subjectes i prensats. Es col·loca en una cubeta d'electroforèsi plena de solució Towbin amb la membrana al costat del càtode. Es proporciona un flux elèctric de 100mA durant una hora i mitja.

Tampó de transferència Towbin:	Tris base	25 mM
	Glicina	192mM
	Metanol	20%

Abans d'afegir el metanol cal comprovar el PH de la solució estigui entre 8.1 i 8.5.

Verificació de la transferència

Per comprovar que s'ha produït la transferència de les proteïnes des del gel a la membrana, tenim la membrana amb un colorant no permanent de proteïnes. Hem utilitzat el Ponceau S (3-hydroxi-4-[2-sulfo-4-penilazo]-2,7-nafatlè disulfíric àcid) al 2% diluït amb el 30% de tricloro acètic. Una incubació de 10 minuts de la membrana permet visualitzar l'escala de les proteïnes de cada mostra i destenyir amb aigua destil·lada sense malmetre la membrana. El Ponceau S és molt làbil i es dificultós realitzar una fotografia d'aquests marcatges.

DETECCIÓ DE L'ANTÍGEN

La membrana amb les proteïnes es bloquejarà inespecíficament amb una solució 5% de llet desnatada liofilitzada. Aquesta incubació es necessària per evitar unions inespecífiques del agents immunològics que utilitzarem per la detecció de l'antígen. La incubació es realitzarà durant dues hores a temperatura ambient o 10 hores a 4°C. La solució per diluir la llet o bé les

resta del anticòssos que utilitzarem en tot el procés serà TBS1X que el prepararem a partir de la solució concentrada estoc següent:

TBS 10X	Tris base	99mM
	NaCl	1.49M

Modifica el PH amb HCl fins a 7.4

Després de la incubació amb la solució de bloqueig es van incubar els anticòssos que reconeixen específicament a les proteïnes. Les dilucions dels anticòssos es van realitzar amb TBS 1X + 0.05% Tween 20 i 1% de llet desnatada liofilitzada. Estan detallades en la taula d'anticòssos utilitzats per Western Blot. Aquestes incubacions van ser de més de 10 hores a 4°C. Els rentats per eliminar el producte d'excés a la mostra es van realitzar amb TBS 1X + 1% Tween 20. Els anticòssos secundaris que es van utilitzar estan associats covalentment a peroxidases i reconeixen la part inespecífica de l'anticòs primari utilitzat. Només en el cas de la trombospondina-1, l'anticòs secundari estava biotinilat i es va augmentar la senyal amb complexos d'avidina i biotina.

TAULA: ANTICOSSOS UTILITZATS PER REALITZAR ELS WESTERNS BLOT

ANTÍGEN	COMERCIAL	ORIGEN	DILUCIÓ UTILITZADA
MMP2	Oncogene Research Products,CA # PC312	Policlonal d'ovella	1/150 (200 µg/ml)
MMP9	Oncogene Reserch Products,CA # PC309	Policlonal d'ovella	1/200 (2 mg/ml)
MMP14	Neomarkers Lab Vision Corp,CA #RB-1545	Policlonal de conill	1/100 (1mg/ml)
TIMP-2	Oncogene Research Products,CA #IM56L	Monoclonal de ratolí Clon: 67-4H11	1/100 (1mg/ml)
VEGF	Neomarkers Lab Vision Corp,CA #MS-35	Monoclonal mouse Clon: JH121	1/100 (200 µg/ml)
FLK-1	Santa Cruz,CA #sc-6251	Monoclonal de ratolí Clon: A-3	1/100 (200 µg/ml)
TSP-1	Santa Cruz,CA #sc-12312	Policlonal de cabra	1/500 (200 µg/ml)
Angiopietina 1 i 4	Santa Cruz,CA #sc- 9360	Policlonal de cabra	1/500 (200 µg/ml)
ERKs 1 i 2 difosforilades	SIGMA #M8159	Monoclonal de ratolí Clon: MAPK-YT	1/3.000
Akt fosforilat Ser473	Cell Signaling #9271	Policlonal de conill	1/1.000
α- Tubulina	SIGMA #T5168	Monoclonal de ratolí Clon: B 5-1-2	1/3.000
Actina	Neomarkers Lab Vision Corp,CA #MS-1295	Monoclonal de ratolí	1/400 (200 µg/ml)

REVELAT QUIMIOLUMINISCENT

La detecció de la unió dels anticossos es pot visualitzar per diferents mètodes. La quimioluminiscència a través de la peroxidases associada als anticossos és un dels mètodes més utilitzats. La peroxidasa oxida el luminol (diacilhidracid cíclica) en ambient alcalí i crea un intermediari inestable que va emetent llum. La màxima emissió es produeix entre els primers 5 i 20 minuts i va disminuint durant 60 minuts més. La llum màxima que emet aquesta reacció química és de 428nm després d'una curta exposició a llum blava.

Hem utilitzat el sistema de revelat Amersham Biosciences específic per Westerns Blot amb els principis de quimioluminiscència d'oxidació amb el luminol. (ECL Western Blotting Detection Reagents #RPN2106). Just en el moment d'utilitzar la mostra, es mesclen els dos productes a parts iguals. Es cobreix la membrana amb la solució i es realitza una curta incubació d'un minut. S'elimina l'excés de producte i s'exposa la membrana a una pel·lícula radiogràfica el temps que sigui necessari. Els senyals obtinguts a la pel·lícula radiogràfica de cada mostra en el mateix temps d'exposició és quantifiquen escanejant el resultat i mesurant la densitometria de la banda. Aquesta valoració es realitza a través del programa Phoretix . (Phoretix International Cale Cross House Newcastle upon Tyne NE1 6SU UK).

ANÀLISI DE PROTEÏNES PER ELISA.

VEGF MURÍ PER ELISA

Es va determinar la quantitat de VEGF respecte de la quantitat de proteïnes total en els lisats dels tumors subcutanis i la quantitat d'aquesta proteïna en volum de medi condicionant dels clons cel·lulars per ELISA (R&D Systems Quantikine M mouse VEGF Immunoassay #MMV00). En els casos dels lisats de teixits tumorals es van analitzar 22.5 µg de proteïna total de cada mostra, segons les lectura de la quantificació de Bradford.

En el cas dels medis condicionants les mesures es realitzaven sobre 20 µl de medi d'un cultiu controlat amb unes proporcions de 2 µl medi / 1.000 cèl·lules / 0.06 mm².

El sistema d'ELISA comercial de R&D Systems proporciona plaques de 96 pouets coactades amb l'anticòs contra el VEGF específic de ratolí i tots els reactius necessaris per realitzar la tècnica. El protocol que hem seguit és el descrit per la casa comercial. Els valors resultats de les mostres s'extrapolen a una recta patró de valor màxim 500 pg/ml i un mínim de 7.8 pg/ml que també subministra la cas comercial. Aquesta recta es processa en la mateixa placa que les mostres. Totes les mostres es mesuren per triplicat. Els resultats obtinguts sempre han estat la mitja d'aquestes tres mesures.

Les mostres s'incuben dues hores a temperatura ambient amb l'anticòs coactat i després de rentar, s'incuben dues hores més amb l'anticòs anti-VEGF conjugat amb peroxidasa. La reacció química colorimètrica es realitza posteriorment amb la peroxidasa i el cromògen tetrametilbenzidina.

La lectura de la densitat òptica a 450nm ens determina la quantitat de VEGF en cada mostra segons la correlació amb la recta patró. La sensibilitat de la tècnica permet mesures d'un mínim de 3 micrograms de VEGF.

ZIMOGRÀFIA

ELECTROFORÈSI

Els enzims són proteïnes que cal separar per tamany molecular amb dos fases de gels d'acrilamida. El gel concentrador en el cas del zimogrames es va realitzar al 5% d'acrilamida i els separadors van ser de 10 o del 7.5 % d'acrilamida segons el tamany i la separació de bandes que ens interessava localitzar. En aquests gels es barreja el substrat de reacció de l'enzim a estudiar. En el cas de les MMPs els substractes que vàrem utilitzar van ser gelatina, caseïna o transferrina.

Gel concentrador 5% d'acrilamida : (Volum final 4 ml)

5% 670ml Acrilamida 30%+Bisacrilamida 0.8%

0.1% 0.4 ml SDS 10%

125mM 1ml Tris base 0.5M pH 6.8

Gel separador 10% d'acrilamida: (Volum final 10ml)

10% 3.33ml Acrilamida 30%+Bisacrilamida 0.8%

0.1% 1ml SDS 10%

3.5mM 2.5ml Tris base 1.4M pH 8.5

1 mg/ml gelatina , caseïna o carboximetilè transferrina

Gel separador 7.5% d'acrilamida: (Volum final 10ml)

7.5% 2.5ml Acrilamida 30%+Bisacrilamida 0.8%

0.1% 1ml SDS 10%

3.5mM 2.5ml Tris base 1.4M pH 8.5

1mg/ml gelatina , caseïna o carboximetilè transferrina

La polimerització de l'acrilamida es potencia i s'accelera amb APS 1% i TEMED 0.1% que s'afegí en el moment d'escampar el gel entre els dos vidres.

Les mostres es carregaren en cada pou un cop els gels van estar polimeritzats. Es van separar en l'electroforèsi 40 µg de cada mostra amb tampó 1X Laemmli-SDS.

Tampó 4X Laemmli-SDS 20% Blau de bromofenol
 160mM Tris base pH 8.8
 10% glicerol
 7% SDS

L'electroforèsi es realitza a 4°C i a 150V.

Tractament de mostres amb APMA:

Totes les mostres han estat valorades amb i sense tractament D'APMA. L'APMA (Acetat p-aminofenilmercuríic) s'utilitza per poder activar les formes latents de les MMPs i d'aquesta manera poder-les valorar com a enzims en altres pesos moleculars que han degradat el substrate del gel. Aquests producte activa les metaloproteinases provocant que la seva activació sigui independent de la concentració de sodi. (Camins, Gabriel et al. 1998)

INCUBACIONS I REVELATS DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES.

L'electroforèsi ens ha proporcionat la separació de les proteïnes dels lisats per tamany , en aquests suport s'activen les activitats enzimàtiques que ens interessin provocant una degradació del substrat de l'enzim que tenim en el gel. Aquests serà el primer pas per arribar a detectar l'enzim. Per aconseguir les condicions idònies per l'activació enzimàtica realitzarem un seguit de rentats per tal d'eliminar els tampons de l'electroforèsi, especialment SDS que interfereix en aquesta activitat. Rentarem el gel amb aigua destil·lada , realitzarem dos rentats de 15 minuts cadascú amb 2.5% de Tritó 100X, i després dos més en 50mM de Tris

pH 7.5 + 2.5% de Tritó 100X. Els dos últims rentats són també de 15 minuts amb 50mM de Tris base pH 7.5 sense Tritó 100X.

Es va incubar el gel a 37°C , en agitació durant 22 hores cobert de tampó d'incubació per mantenir l'enzim actiu.

Tampó d'incubació: 50mM Tris base pH 7.5
150mM NaCl
10 mM CaCl
1% Tritó 100X

Per poder visualitzar la quantitat de substrat (Gelatina, transferrina o caseina) que ha transformat l'enzim, es va tenyir el substrat amb blau de Comassie. Aquest procés ens permetrà diferenciar la zona on hi ha enzim, per manca de coloració i la densitometria d'aquestes bandes ens assenyalaran la quantitat d'enzim que tenim en cada mostra.

Per tenyir el gel l'incubarem durant una hora amb blau de Comassie 0.1% + 40% d'isopropanol. Eliminarem l'excés de colorant amb àcid acètic al 7%. Per conservar i manipular millor el gel es deshidrata.

VALORACIÓ DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Els gels deshidratats s'escanegen i s'inverteixen les imatges amb el programa informàtic Quantity One de BioRad. Quan invertim la imatge podem quantificar la banda de manca de colorant amb intensitats positives. Els zimogrames s'han realitzat per triplicat amb cada mostra i amb experiments diferents. Les mitjanes i les desviacions estàndards de les intensitats analitzades les hem representat en histogrames de barres.

NORTHERN BLOT

ELECTROFORÈSI DESNATURALITZANT

L'RNA es separa en un gel d'agarosa al 1,2% i amb formaldehid per desnaturalitzar les possibles unions que s'hagin produït entre bases de l'àcid nuclèic. El gruix dels gels d'electroforèsi que després hem de blotar són importants per optimitzar la transferència posterior. Així doncs cal calcular el volum d'agarosa en funció del motlle que utilitzem i no excedint d'un gruix d'un centímetre.

Gel d'electroforèsi desnaturalitzant:

1.2%	Agarosa
0.66M	Formaldehid
1X	MOPS 10X (3-(N-Morfolí) propanolè àcid sulfònic)

MOPS 10X: 0.4M MOPS (Sigma M-1254)

0.1M Acetat sòdic

10mM EDTA pH8

Aquesta solució cal ajustar-la a pH7 amb NaOH.

La preparació d'aquests gels cal realitzar-la sota campana d'extracció de gasos per evitar exposicions als vapors de formaldehid. Vàrem dissoldre l'agarosa amb aigua estèril i un cop va recuperar cert grau de temperatura li vàrem afegir el formaldehid i el MOPS.

El tampó per realitzar la separació de les bandes de l'RNA serà MOPS 1X. Per tal d'homogeneïtzar tots els components, submergirem el gel en el tampó i farem passar 22V durant 10 minuts pel gel i el tampó.

Les mostres de l'RNA es resuspendran en el tampó de mostra i com que en el nostre cas les tenim liofilitzades podem igualar el volums (25 µl). Les concentracions finals en la mostra seran:

Tampó de mostra: 50% Formamida 100%
 6.4% Formaldehid 30%
 1X MOPS 10X
 1X Blue Juice 6X
 1 µl de Bromur d'etidi (400 µg/ml)

Blue Juice 6X: 50% Glicerol
 1mM EDTA pH8
 0.4% Blau Bromofenol (ref a 500pb)
 0.4% Xilen cianol (ref a 2Kb)

Prèviament a la càrrega de les mostres, després de resuspendre-les amb tampó mostra, incubarem 10 minuts a 65°C. Posarem en gel, centrifugarem un pols i carregarem en els pouets del gel desnaturalitzant.

Durant 20 minuts vàrem augmentar el voltatge de carregada a 80V per tal de que la mostra entres en la xarxa d'agarosa des del pou. Després l'electroforesi es va realitzar a 80V durant 4 hores.

Els colorants del tampó mostra ens senyalaran la situació de l'RNA en el gel. Amb aquestes referències es determina el final de l'electroforèsi segons ens convingui. En les cèl·lules trobarem RNAs de tots els tamanyes per tan una banda contínua per tot el gel que s'intensifica en dos punts, sobre 1800pb i al voltant d 4200pb, que corresponent als RNAs ribosòmics, sempre més abundants. Amb aquesta imatge es pot determinar si l'RNA s'ha degradat i podem tenir una mesura de la càrrega de cada mostra.

TRANSFERÈNCIA PER CAPIL·LARITAT

Abans de la transferència rentarem el gel amb aigua lliure d'RNases i incubarem durant una hora amb 20X SSC. Aquest tampó el canviarem quatre vegades durant tota la incubació. Els rentats es van realitzar amb una agitació suau.

Tampó 20X SSC: 3M NaCl
 0.3M Trisodi Citrat dihidratat
 Ajustem el pH7 amb HCl 6M.

La transferència es realitza a una membrana de nailon (Hybond N+ Amersham Pharmacia Biotech). El sistema posarà en contacte a través d'un paper altament absorbent; una solució 10X SSC amb el gel d'electroforèsi. La membrana de nailon estarà amb 20X SSC com el gel i ambdós en contacte directe sense interferències de bombolles d'aire. Per damunt de la membrana afegirem gran quantitat de papers absorbents i un pes que realitzi una força constant i homogènia per tota la superfície del gel i la membrana. Mantindrem el sistema a T.A. durant 24 hores i si es necessari afegirem paper absorbent.

La membrana la rentarem amb 3XSSC un cop realitzada la transferència i fixarem les mostres amb una exposició de 1 minut i mig a la llum ultraviolada.

MARCATGE DE LA SONDA RADIOACTIVA

La sonda que es va utilitzar per identificar mRNA del VEGF 165 va ser cDNA del VEGF-A de ratolí cedida pel Dr. Pagès des de l' Institut de Recherche-CNRS-UMR 6543-Université de Nice,

(Nice, France). 50 ng de la sonda es va marcar amb (³²P) dCTP (Amersham Biosciences). El marcatge de la sonda es va realitzar per "*Random Priming*" utilitzant el kit "Rediprime™ II d'Amersham Biosciences i 50 µCi de (α-³²P) dCTP (3000 Ci/mol, 10 mCi/ml).

HIBRIDACIÓ DE LA MEMBRANA AMB LA SONDA

La membrana es manté amb 2X SSC prèviament a una incubació amb tampó de pre-hibridació de dues hores a 42°C.

Tampó pre-hibridació:	50%	Formamida
	1X	SSPE 5X
	1X	Denhardt's 5X
	200 µg/ml	DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat.
Tampó 5X Denhardt's:	0.1%	Polivinilpirrolidona (PVP)
	0.1%	Albúmina del sèrum boví. (BSA)
	0.2%	Ficoll
	0.2%	BSA
Tampó 5X SSPE:	10mM	NaH ₂ PO ₄ pH 7.4
	150mM	NaCl
	1mM	EDTA

Després de la pre-hibridació es realitzà la hibridació amb la sonda radioactiva. Aquesta manipulació cal realitzar-la en una zona radioactiva adient que disposi de sistemes d'hibridació adequats. En el nostre cas es va utilitzar un forn d'hibridació amb la tapa de polycarbonat acrílic per evitar l'exposició a les radiacions (Amersham Biosciences). Aquest forn manté les membranes en un tub de *pyrex* en constant moviment de rotació. De manera que el tampó amb la sonda pren contacte amb tota la superfície de la membrana.

Tampó d'hibridació:	50%	Formamida
	1X	SSPE 5X
	1X	Denhardt's 5X
	0.1%	SDS
	5%	Dextran Sulfat
	200 µg/ml	DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat
	50 ng	Sonda ³² P dCTP cDNA VEGF-A murí desnaturalitzada

L'hibridació es va realitzar durant tota la nit a 42°C.

Després de l'hibridació les membranes van ser rentades amb 0.1X SSC + 0.1% SDS a 50°C durant 50 minuts.

REVELAT I VALORACIÓ DE LES MOSTRES

La lectura de la radioactivitat es realitzà a través de l'impressió que deixa aquest fenomen en una pel·lícula radiogràfica. Es va exposar la membrana hibridada amb la sonda del VEGF murí durant 12h a -80°. El revelat de la pel·lícula va determinar les bandes de VEGF murí .

Aquestes bandes van ser analitzades amb el programa informàtic Phrorètix per determinar el seu valor densitomètric.

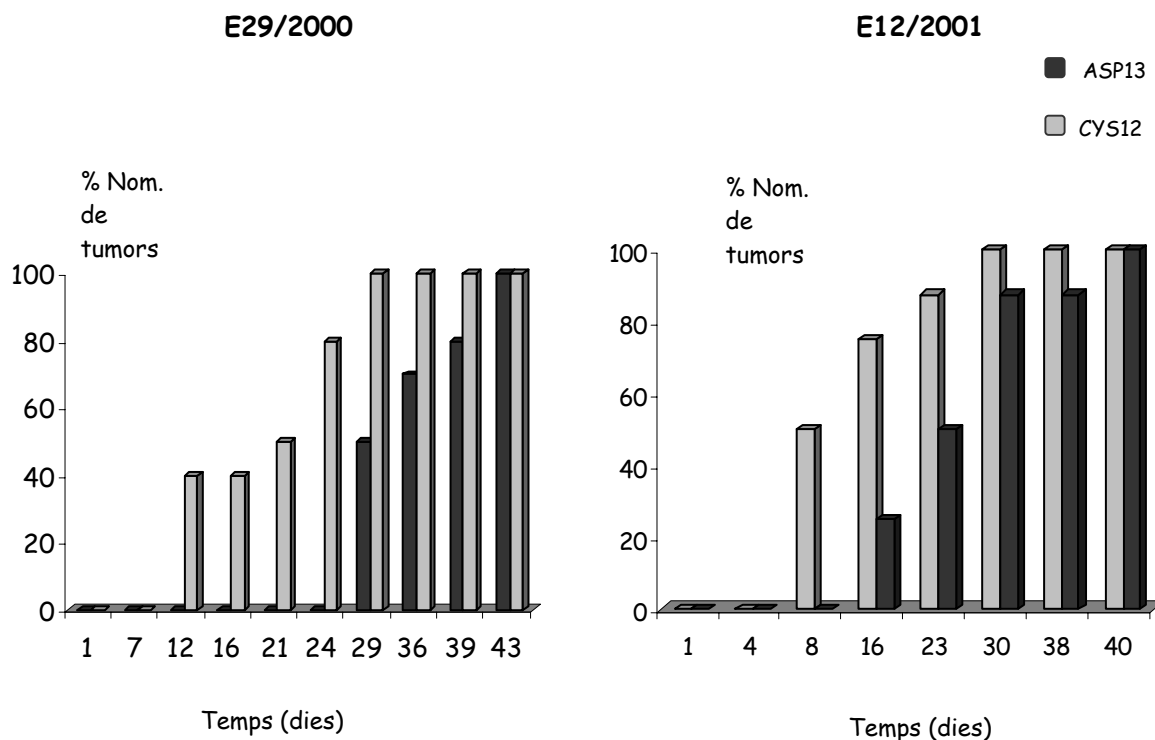
resultats



DIFERÈNCIES EN EL CREIXEMENT TUMORAL DELS TRANSFECTANTS DE K-RAS

LATÈNCIA TUMORAL

Els transfectants NIH3T3 el vàrem inocular **subcutàneament** i **intramuscularment** en ratolins atímics Swiss. Els fibroblastes NIH3T3 parentals, neo i WT no van formar mai tumors. En les dues observacions es va veure que els tumors amb la mutació *CYS12* iniciaven el seu creixement amb més rapidesa que els *ASP13*. Mentre els tumors *CYS12* subcutanis podem palpar-los i mesurar-los entre 8 i 10 dies després de l'inòcul, en el cas del tumors *ASP13* comencem a tenir mesures 16 - 25 dies després de l'inòcul. Els tumors intramusculars els comencem a palpar més tardanament, però la diferència entre el grup amb mutació *ASP13* i *CYS12* és de 7 dies. Per tan els tumors *ASP13* tenen una major latència en els inòculs subcutanis i intramusculars de ratolí, respecte els tumors *CYS12*.



\bar{X} dia de palpació ASP13 = 38.9 ± 3.8
 \bar{X} dia de palpació CYS12 = 24.4 ± 7.65
 Mann-Whitney $p < 0.001$

\bar{X} dia de palpació ASP13 = 24 ± 6.3
 \bar{X} dia de palpació CYS12 = 14.6 ± 8.23
 Mann-Whitney $p = 0.04$

FIGURA : **Latència tumoral subcutànea**. Representació del percentatge del nombre de tumors subcutanis palpables (ordenades) en els dies consecutius a l'inòcul (abscisses). E29/2000 i E12/2001 es refereixen a dos experiments independents.

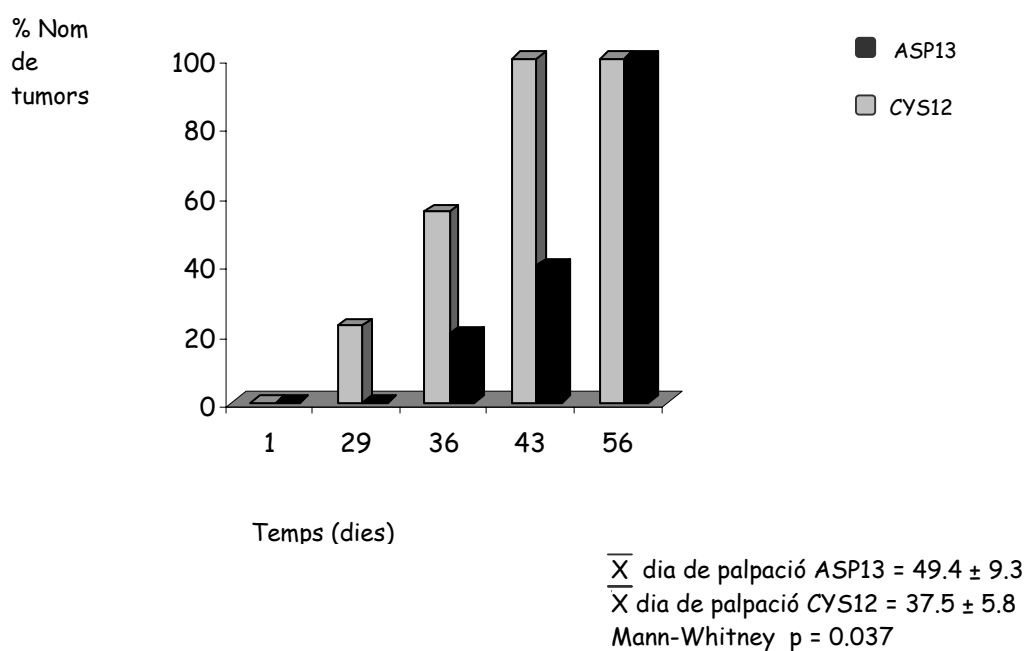


FIGURA : **Latència tumoral intramuscular.** En les ordenades representem el percentatge del nombre de tumors palpables i en les abscisses els dies consecutius a l'inòcul. A la dreta les mitjanes i la desviació estàndard de les dades en cada grup.

CREIXEMENT TUMORAL

De forma paradoxal, els tumors subcutanis ASP13 arriben a un centímetre aproximadament amb 10 dies menys que els tumors amb mutació CYS12 en K-Ras.

Els tumors intramusculars no els vàrem poder mesurar al llarg del temps. L'exèresi es va produir a partir de 40 dies després de l'inòcul i el volum final del tumor no divergeix entre els grups. La mitjana dels dies necessaris des de que es palpa el tumor fins a l'exèresi és

aproximadament de 7 dies amb un cas de creixement tardà a 30 dies i un de creixement precoç amb tres dies que es van excloure.

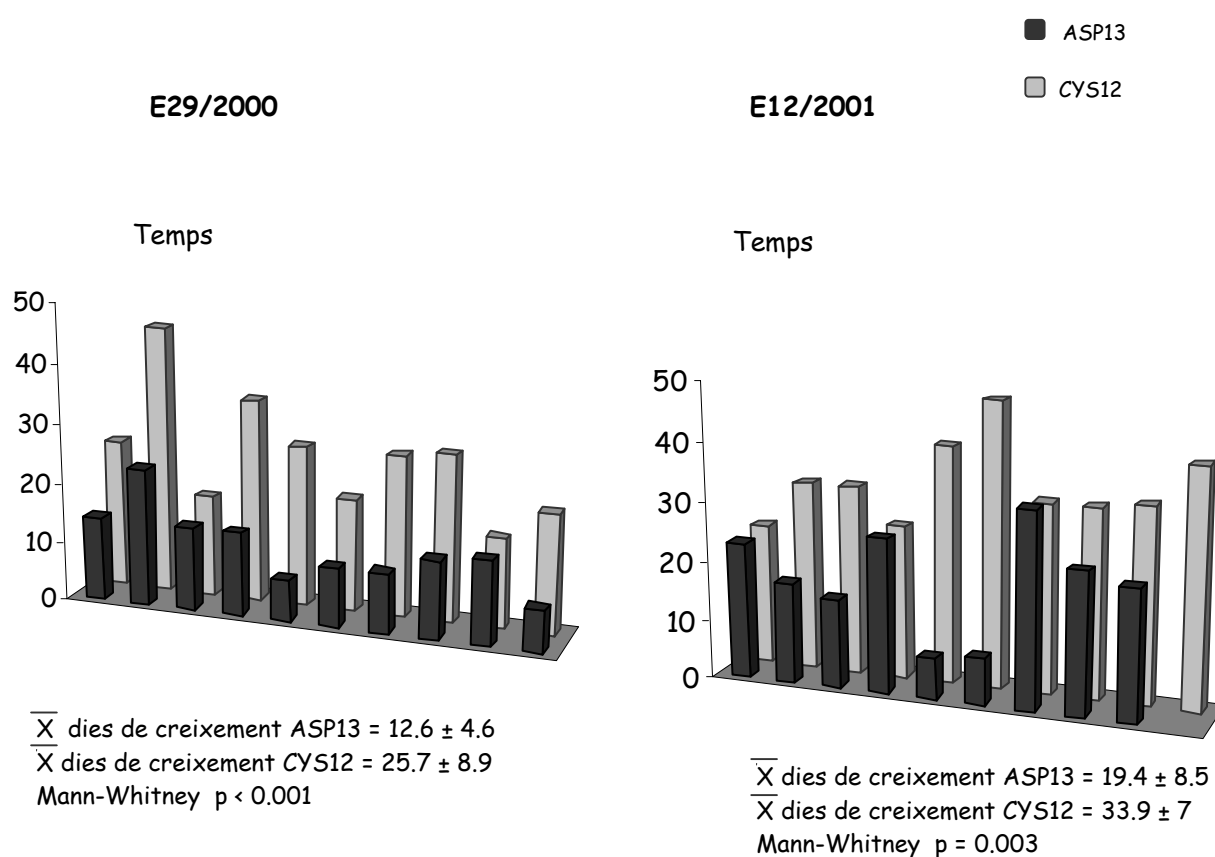
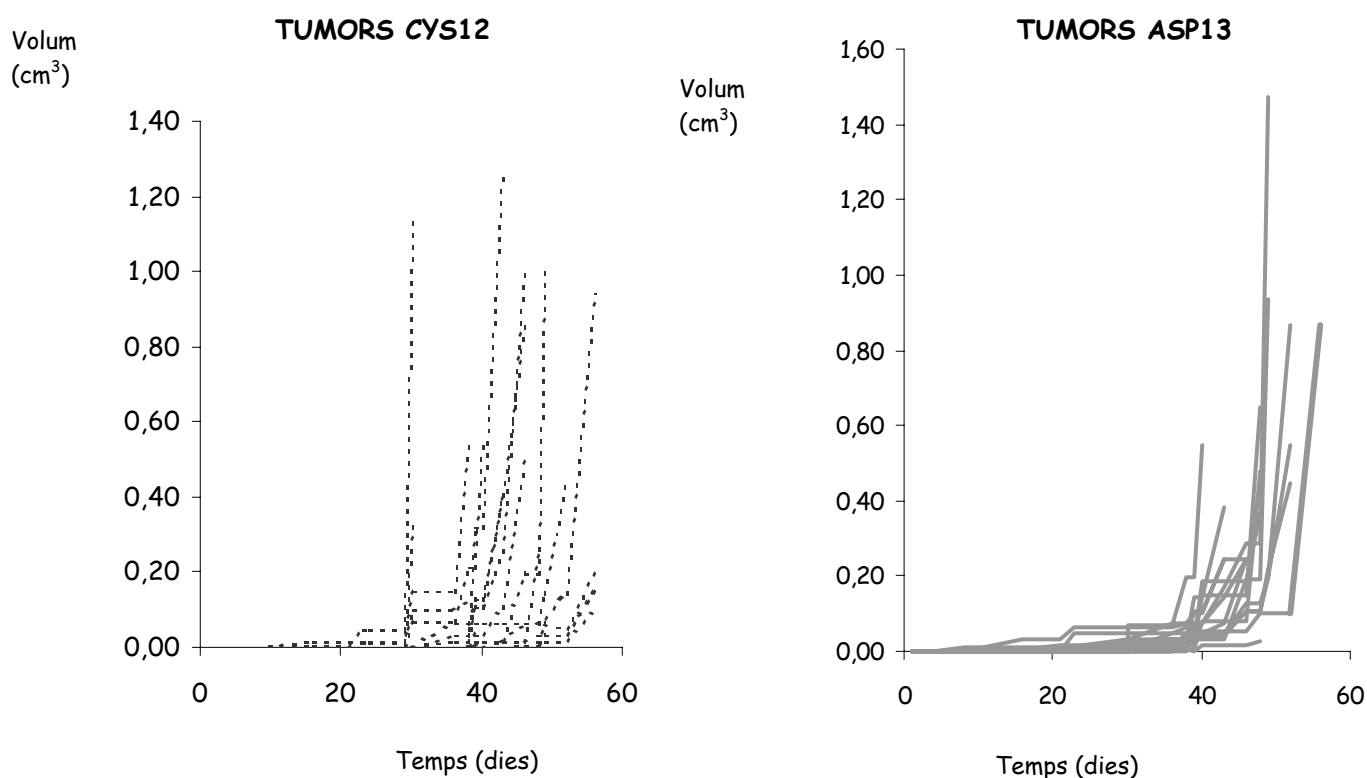


FIGURA : **Creixement tumoral**. Representació dels dies necessaris perquè cada tumor arribi a créixer fins a un centímetre de diàmetre. En l'eix de les ordenades determinem els dies del creixement i cada barra és un tumor. En la part inferior mostrem les mitjanes i les desviacions estàndard de cada grup en cada experiment i el resultat de l'anàlisi estadístic. .

Vàrem voler conèixer amb més detall la cinètica del creixement tumoral. Es van calcular el volum dels tumors subcutanis al llarg del temps tan individualment com les mitjanes de cada punt temporal. Tot i la major heterogeneïtat dels tumors ASP13, s'evidencia que els tumors CYS12 augmentant el seu volum més lentament que els tumors ASP13. En les gràfiques de les mitjanes s'observa com després de la latència la corba dels tumors ASP13 té una major pendent.



GRÀFIC : Corba de creixement tumoral individual. Representació dels volums tumorals individualment (Eix d'ordenades en cm^3) al llarg del temps (Eix de les abscisses en dies). Totes les dades d'aquestes gràfiques contenen els tumors dels dos experiments realitzats. Cada línia individual representa l'evolució d'un tumor inoculat.

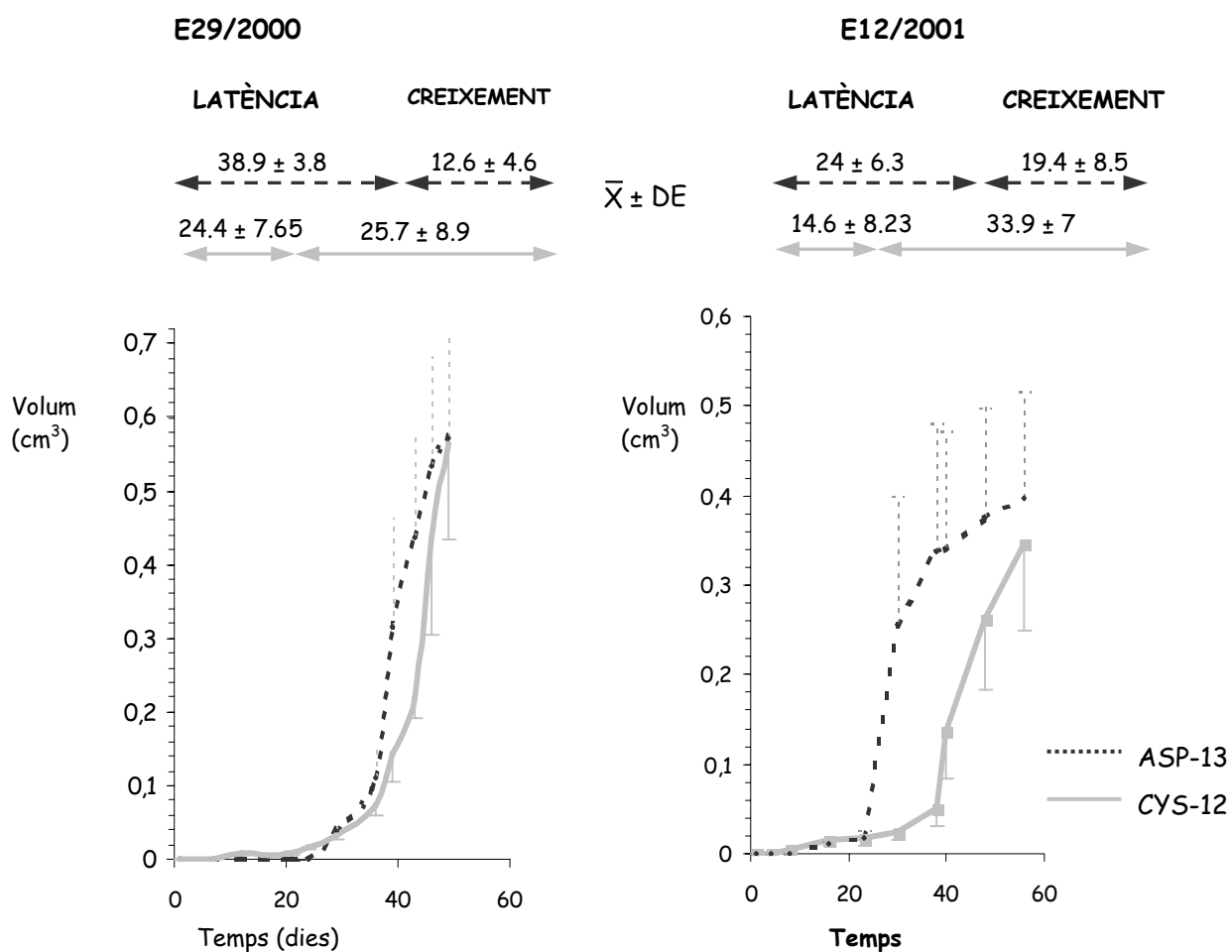


FIGURA : Corba de creixement tumoral. Es representen les mitjanes dels volums subcutanis en cada tipus de mutació i en cada experiment. Les barres verticals indiquen l'error estàndard. En la part superior hi ha les mitjanes i les desviacions estàndard de cada grup en cada experiment dels dies necessaris per començar a ser palpats (Latència) i per arribar a un centímetre (Creixement).

Els tumors ASP13 requereixen de més temps de latència que els CYS12 per iniciar el creixement de l'inòcul, però el seu creixement és més ràpid. En el grup de tumors ASP13 detectem més heterogeneïtat que en el grup amb mutació CYS12. L'experiment ha estat realitzat per duplicat en dos experiments independents.

DIFERÈNCIES EN EL FENOTIP VASCULAR

ANÀLISI DE LA DENSITAT VASCULAR

Per tal de determinar si aquestes diferències en el creixement tumoral estaven associades a diferències en les xarxes vasculars tumorals, vàrem realitzar un estudi de la densitat vascular. És va tenyir amb la lectina del tomàquet els casos parafinats dels tumors subcutanis E29/2000 per tal de comptar els vasos sanguinis dels tumors i determinar la densitat vascular microscòpica (MVD). Vàrem poder comptar el nombre de vasos en la pell normal i en els tumors CYS12 on la densitat va ser major. Va ser impossible diferenciar estructures vasculars en el casos ASP-13 degut a la gran quantitat de cèl·lules hematopoiètiques i/o del sistema immunològic que es van tenyir.

MOSTRA	n	MITJANA ± DE
Pell normal	7	10.15 ± 2.4
ASP13	8	N.V.
CYS12	7	22.3 ± 4.3

p = 0.002

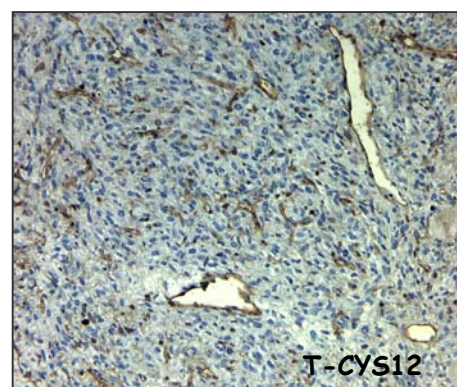
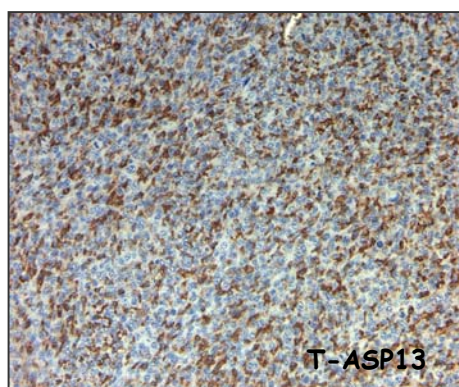
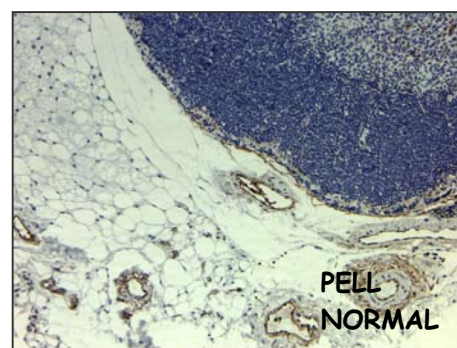


FIGURA : Marcatge amb lectina biotinilada. A/ La taula ens determina els valors mitjos i la desviació estàndard del nombre de vasos comptats en cinc camps de cada mostra. "n" és el nombre de tumors. "N.V." no valorable. B/ Pell normal de ratolí tenyida amb lectina. (40X) L'utilitzem com a referència de la qualitat de la tècnica i del nombre de vasos del teixit sense tumor. Les fotografies C i D són un exemple de cada grup tenyit a 40X. Cap dels tumors amb mutació ASP13 (C) va ser valorable per la confusió que donaven les cèl·lules no endotelials que es van tenvir.

Per poder valorar la densitat vascular microscòpica en ambdós transfectants vàrem utilitzar el marcatge de **PECAM** . El reconeixement d'aquesta proteïna específica de la cèl·lula endotelial en ratolins, ens va permetre comptar els vasos. La tècnica es va realitzar sobre els talls congelats de l'experiment E12/2001 perquè l'anticòs no reconeix la proteïna fixada en formol. La pell normal s'ha utilitzat com a control.

MOSTRA	n	MITJANA \pm DE
Pell normal	6	19.69 \pm 2.94
Tumors ASP13	8	26.95 \pm 12.45
Tumors CYS12	10	39.2 \pm 9.79

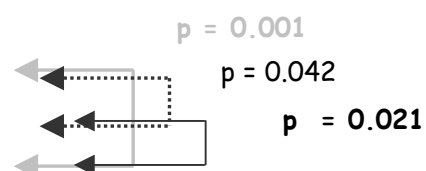
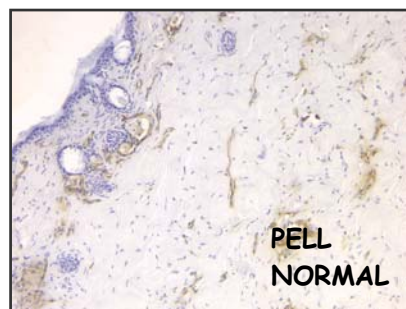


FIGURA: Marcatge de PECAM. A/ Els resultats de la taula es van comptar amb les tincions d'immunohistoquímica. Les mitjanes són el resultat de comptar cinc camps en cada mostra "n". Les "p" corresponen a l'anàlisi de Mann-Whitney. B/ Imatge de la tinció en pell normal a 40X.



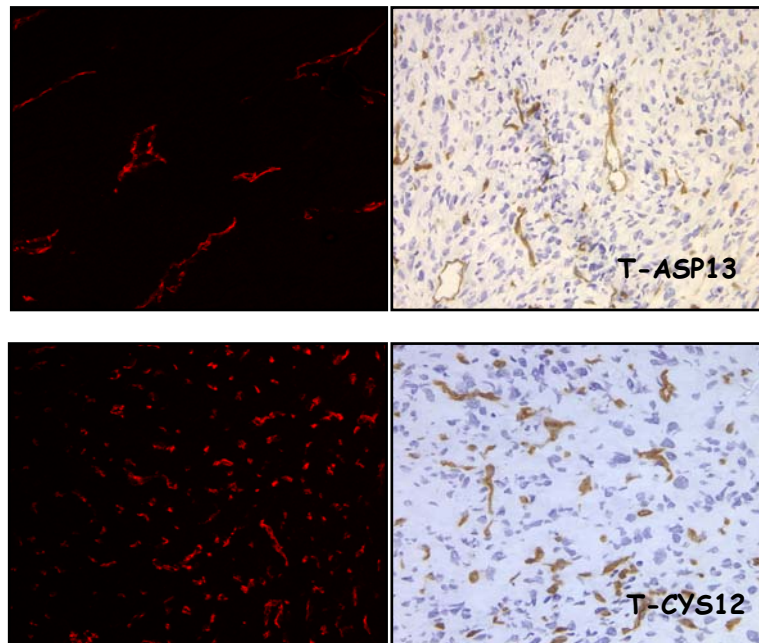


FIGURA: Marcatge de PECAM. C/ Exemple dels marcatges ASP13 a 40X. D/ Exemples dels marcatges en els tumors CYS12.

Els tumors amb mutació en el codó 12 de K-Ras (CYS12) tenen més densitat de vasos sanguinis que els tumors amb la mutació en el codó 13 (ASP13). Observant els marcatges es va fer evident que també hi havia una gran diferència de diàmetre vascular que determinava la densitat en cada un dels tipus tumorals. Per tal de quantificar aquesta observació, vàrem mesurar el diàmetre màxim de tots els vasos amb llum vascular en alguns tumors de cada grup. Com és esperable les mesures són molt heterogènies però les diferències són significatives. Els tumors ASP13 tenen vasos de mitjana cinc vegades superior als CYS12.

MOSTRA	Nom. de tumors	Nom de camps	Nom. de vasos	Mediana	Mitjana ± ES
ASP 13	5	24	39	57.38	96.4 ± 12.9
CYS 12	4	25	41	24.44	19.3 ± 2.8

← p < 0.0001

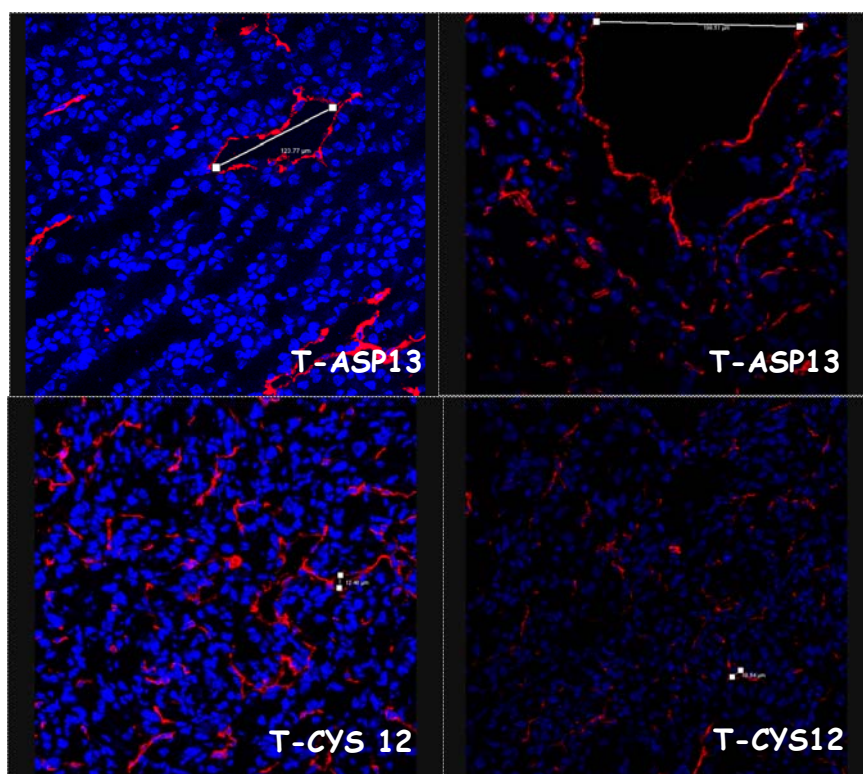


FIGURA: **Mesura dels diàmetres.** A/En la taula es reflexa el nombre de tumors subcutanis diferents utilitzats en cada grup, quants camps es van utilitzar per extreure valors de diàmetres i finalment quants vasos tenim mesurats. La mediana de la sèrie i la mitjana reflexen les diferències entre els grups. La "p" està calculada amb un anàlisi de Mann-Whitney. Es va comptar els diàmetres en les imatges del marcatge amb PECAM fluorescent. B/ Dos exemples de tumors diferents ASP13 a 40X. C/ Exemples dels tumors CYS12 amb el PECAM marcat de color vermell. En cada exemple hi ha la mesura d'un dels diàmetres amb llum vascular visible.

ANÀLISI DE LA PROLIFERACIÓ ENDOTELIAL I TUMORAL *IN VIVO*.

La valoració de la proliferació endotelial s'ha realitzat amb un doble marcatge PECAM/Ki67 murí en els teixits tumorals subcutanis. De cada tumor hem comptat un mínim de cinc camps de 10 x 63 augments. Només s'ha considerat nuclis endotelials aquells que tenien una morfologia típica d'aquestes cèl·lules i estaven envoltats de marcatge citoplasmàtic de PECAM. El Ki67 en les cèl·lules tumorals no és diferent segons el tipus de tumor. Tots els tumors entren dins d'un rang del 20-30 % de cèl·lules tumorals positives. En els tumors amb mutació ASP13 hem comptabilitzat 402 cèl·lules de les quals un 19.9% eren KI67 positives. En el cas dels tumors amb mutació CYS12 hem comptat 568 nuclis i el 16.46% eren positius per KI67. Tampoc no observem diferències de la proliferació endotelial entre els dos tipus de tumors.

TAULA: PERCENTATGES DE CÈL·LULES KI67 POSITIVES.

MOSTRA	Nom. de tumors	Mitjana ± DE Endotelials	Mitjana ± DE Tumorals
ASP 13	5	19.9 ± 9.4	26.8 ± 9.5
CYS 12	5	16.5 ± 9.9	24.5 ± 7.5

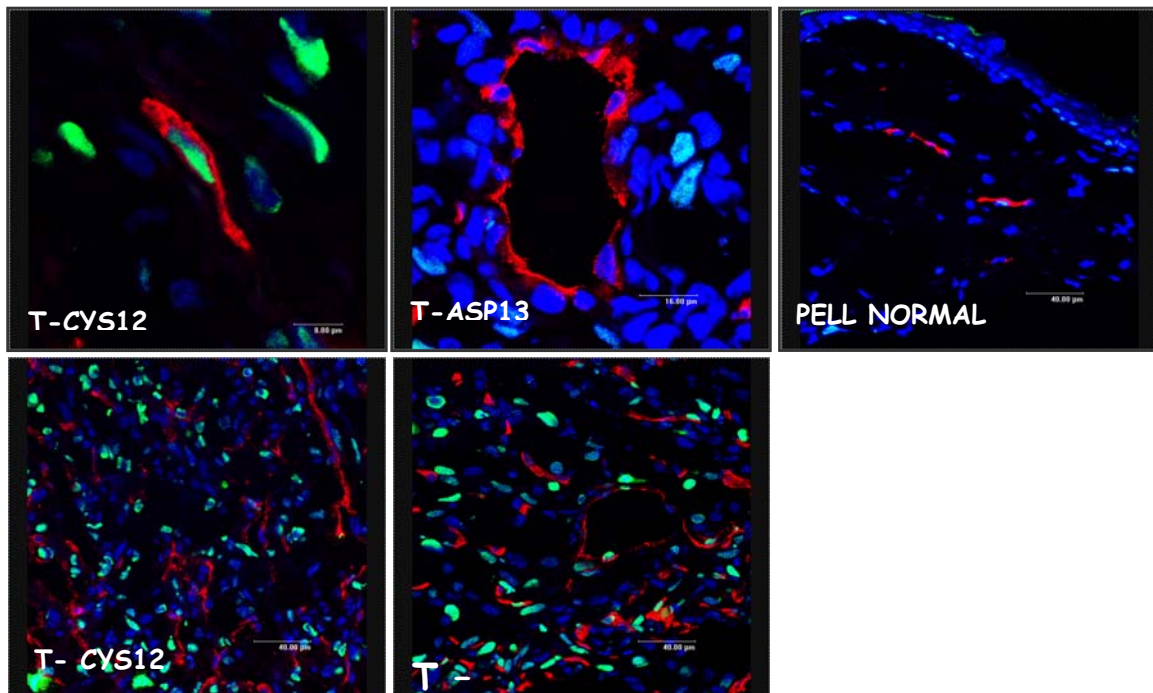


FIGURA: Doble immunofluorescència de KI67 i PECAM. El marcatge amb PECAM ha estat revelat amb fluorocrom vermell (546 nm) i el Ki67 amb fluorocrom verd (488nm). El color blau és el contrast nuclear que hem utilitzat. A/Exemple del marcatge en un tumor amb mutació CYS12. La fotografia superior ampliació d'una endotelial KI67+. B/ Exemple del marcatge en un tumor ASP13. C/ Exemple d'un marcatge en pell normal de ratolí. La capa basal de l'epidermis té cèl·lules en proliferació Ki67 positives.

ANÀLISI DE LES CÈL·LULES MURALS.

L'estudi del fenotip vascular es va ampliar per determinar l'estructura de les parets dels vasos que formen aquestes xarxes vasculars tan diferents. Es va determinar la presència de monòcits o macròfags, cèl·lules amb α -actina del múscul llis i cèl·lules amb desmina al voltant dels endotelis.

Com que morfològicament les cèl·lules que es tenyien amb la Lectina en els tumors ASP13 semblen **monòcits/macròfags**, vam començar realitzant un marcatge específic per aquestes cèl·lules (**F4/80**) per tal de confirmar el tipus cel·lular. Mentre els grans vasos dels tumors ASP13 estan envoltats per macròfags, els dels tumors amb mutació CYS12 no tenen aquests tipus de cèl·lules.

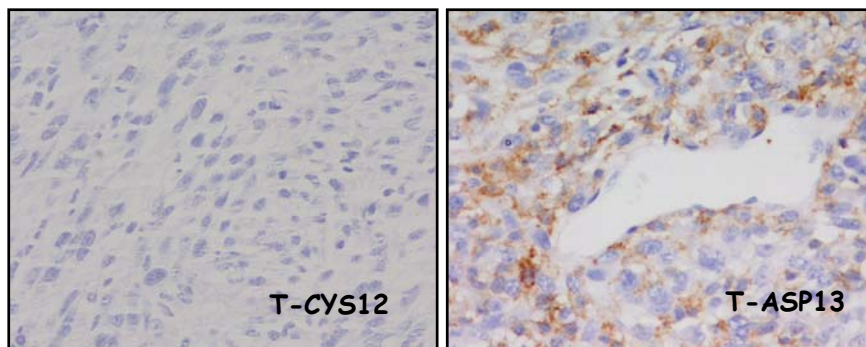


FIGURA: Marcatge específic per monòcits/macròfags amb F4/80. Les fotografies (40X) de la dreta són un exemple dels dos tipus de marcatge que hem observat en els tumors subcutanis. Un elevat nombre de cèl·lules tenyides acompanyen els tumors ASP13 i no hem trobat quasi marcatge en els tumors CYS12.

Les cèl·lules amb actina de la musculatura llisa poden ser una part del vas sanguini. Els marcatges fluorescents amb un anticòs anti **α -SMA** ens assenyalen aquelles cèl·lules que tenen les fibres d'aquesta actina, per tant podem marcar cèl·lules musculars, pericits, fibroblastes i algunes cèl·lules poc diferenciades. La majoria dels vasos dels tumors subcutanis dels clons NIH3T3 transfectats no estan recoberts per cèl·lules que tinguin aquesta proteïna. Només una minoria de vasos amb diàmetre mitjà està envoltat per cèl·lules α -SMA positives. No observem una localització diferencial d'aquests vasos en cap dels dos tipus tumorals. Com a control de la tècnica utilitzada hem marcat simultàniament altres teixits de ratolí on s'ha pogut veure el marcatge correcte. La segona proteïna amb la que hem treballat per determinar les diferents cèl·lules que poden acompanyar l'endoteli vascular és la **desmina**. Aquesta és una proteïna del citoesquelet cel·lular relacionada amb les unions intercel·lulars que es localitza en cèl·lules de la musculatura llisa, estriada o cardíaca, alguns fibroblast, pericits i altres cèl·lules poc diferenciades. Hem realitzat un marcatge doble fluorescent PECAM (vermell) / desmina (verd). Algunes de les cèl·lules tumorals expressen desmina. Malgrat això la morfologia de les cèl·lules al voltant dels vasos és molt diferent; les cèl·lules tumoral tenen els nuclis molt més grossos i no tenen prolongacions al voltant de les endotelials. La quantificació de la desmina associada a PECAM es va realitzar amb el software Leica del microscopi confocal. Mesurem les intensitats dels fluorocroms en l'eix de $265.17 \mu\text{m}$ i calculem els pics on col·localitzen els dos marcatges. El nombre de pics que col·localitzen (PECAM / Desmina) és inferior en els tumors CYS12 ($29.95\% \pm 9.21$) que en els tumors ASP13 ($84.316\% \pm 3.8$).

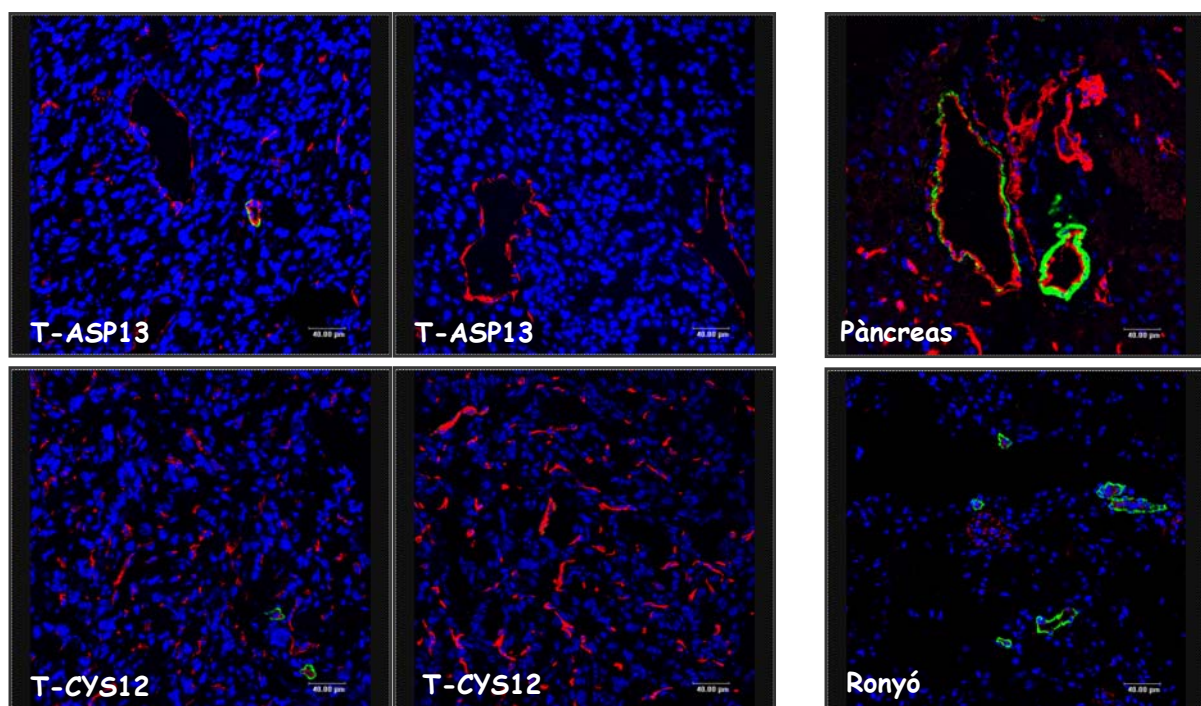


FIGURA: **Marcatge de l' α -SMA**. En totes les fotografies el marcatge vermell (546nm) és la proteïna endotelial PECAM i el verd (488nm) és l'actina de la musculatura llisa. A/ Exemples del marcatge en dos tumors subcutanis amb mutació ASP13. En la imatge de l'esquerra hi ha un vas envoltat amb cèl·lules que tenen α -SMA. B/ Ambdues imatges de tumors amb mutació CYS12. Hi ha alguns vasos envoltats amb cèl·lules amb actina a la imatge de l'esquerra. C/ Teixit pancreàtic normal d'un ratolí RIP-TAG. S'observa que té vasos amb cèl·lules murals que expressen aquest tipus d'actina. D/ Ronyó normal d'un ratolí atímic Swiss. Podem observar que els vasos fenestrats dels glomèruls renals no tenen embolcall d'actina, mentre els vasos aferents i deferents al glomèrul estan recoberts de cèl·lules que expressen aquesta proteïna, bàsicament per garantir la seva funció del control del flux sanguini.

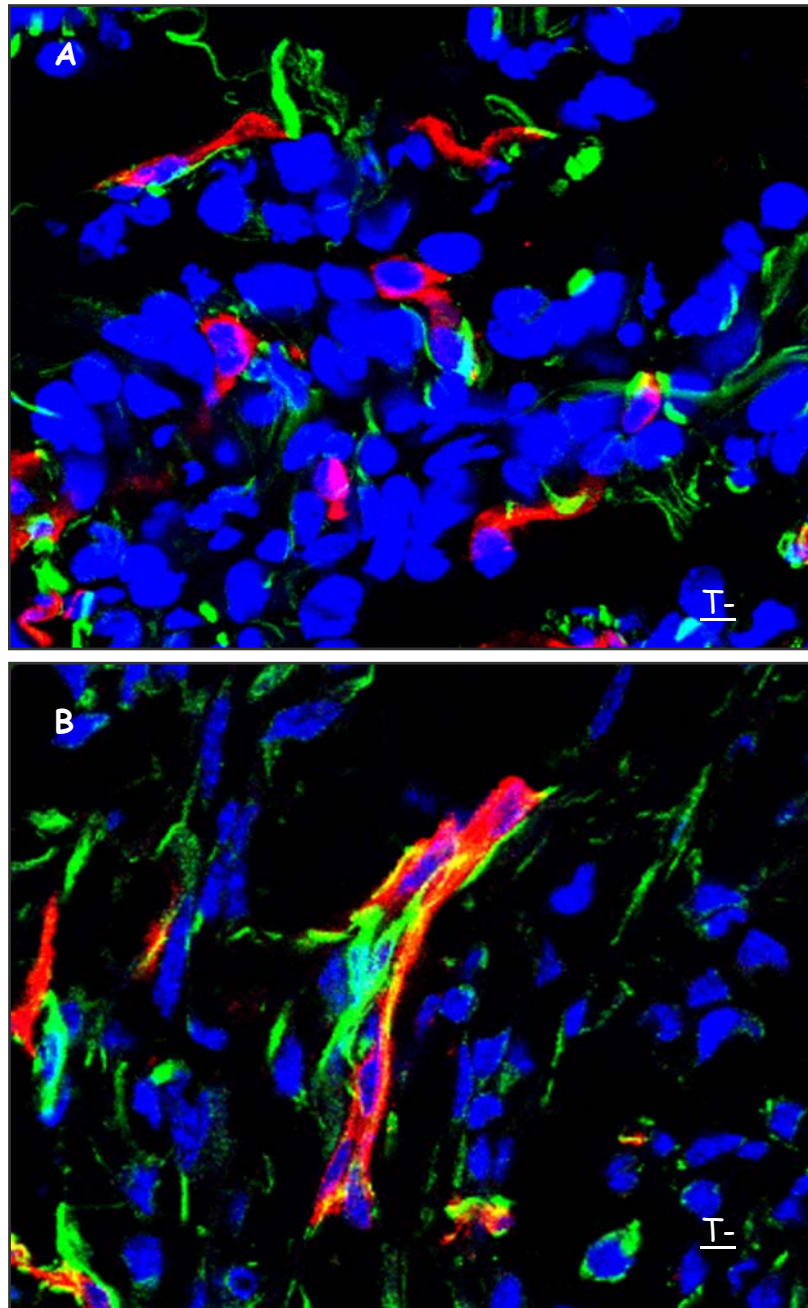


FIGURA : Doble immunofluorescència PECAM - DESMINA. A i B / Fotografies ampliades del doble marcatge desmina PECAM en tumors subcutanis.

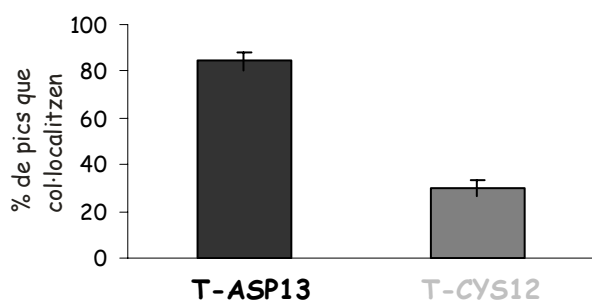
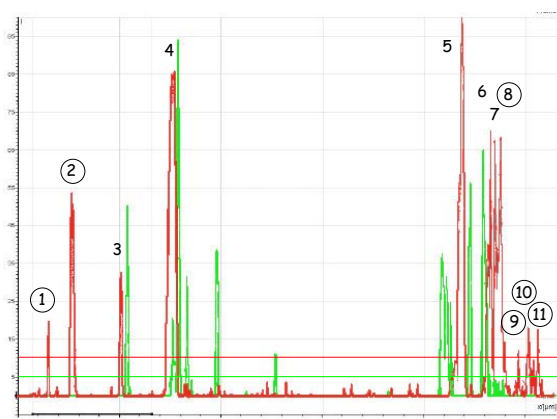
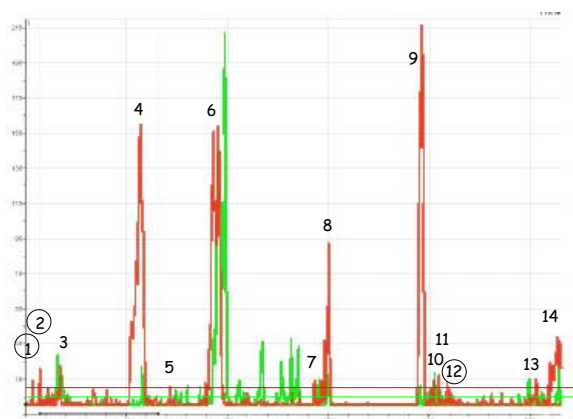
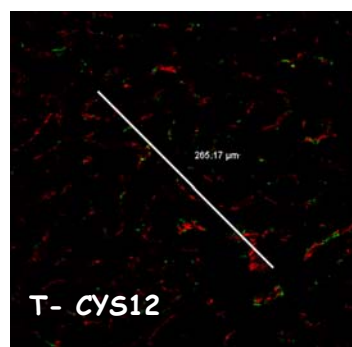
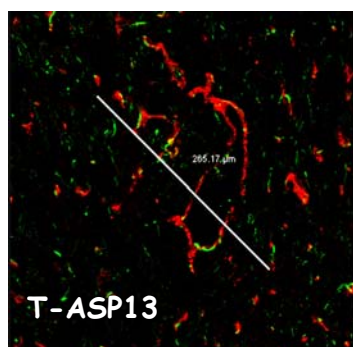


FIGURA : Doble immunofluorescència PECAM - DESMINA. C / Imatge (400x) d'un tumor representatiu del grup ASP13 i l'histograma de les intensitats en la ratlla central del camp. D / Imatge (400x) i histograma representatiu del grup CYS12. El color verd correspon a la desmina i el vermell al PECAM en totes les ocasions. Hem numerat els pics de PECAM i els encerclat correponen a aquells que no col·localitzen amb la desmina. Les ratlles horitzontals en les intensitats 5 i 10 assenyalen el límit del què hem considerat inespecífic i per tan no valorables. E / Representació del percentatge de pics que col·localitzen per cada grup de tumors. Cada barra és un grup de tumors i en l'eix de les ordenades hi ha el valor dels percentatges. Les barres d'error són les desviacions estàndard.

Els tumors subcutanis amb mutació ASP13 desenvolupen menys densitat de vasos que els tumors amb mutació CYS12 però són vasos amb més diàmetre i acompanyats amb major nombre de cèl·lules que expressen desmina i macròfags/monòcits. En cap dels dos tipus de tumors hi ha moltes cèl·lules amb actina de la musculatura llisa acompanyant els nous vasos sanguinis. L'expressió de Ki67 en les cèl·lules tumorals i endotelials és amb la mateixa proporció en els dos grups de tumors.

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE FACTORS ANGIOGÈNICS

AUGMENT DIFERENCIAL DE L'EXPRESSIÓ DEL VEGF

Les diferències morfològiques que hem descrit entre aquests tipus tumorals estan determinades les variacions en les regulacions de la balança angiogènica. Per comprovar en quin grau és certa aquesta hipòtesi, vàrem realitzar l'estudi de l'expressió del VEGF com a principal factor pro-angiogènica i clarament regulat per K-Ras. Aquest factor augmenta la seva expressió en els dos clons transfectats amb el gen K-Ras mutat respecte als fibroblasts de ratolí NIH3T3. Les cèl·lules amb mutació K-Ras ASP13 *in vitro* i *in vivo* en comparació amb les de mutació CYS12 tenen un major augment de VEGF tant a nivell d'RNA com de proteïna. La determinació de l'expressió es va realitzar en diferents tècniques. (Western Blot, Elisa, IHQ i Northern Blot).

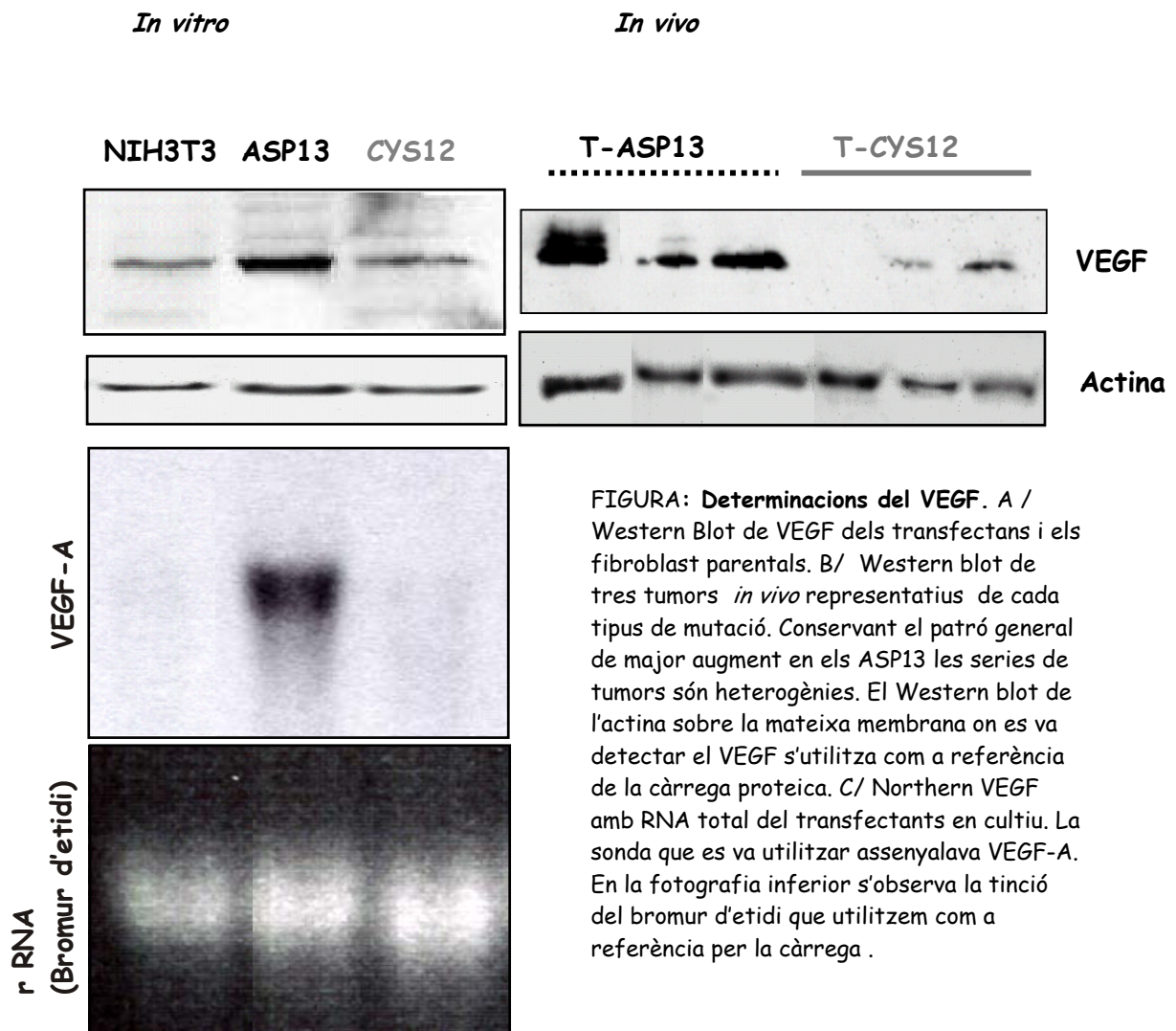


FIGURA: Determinacions del VEGF. A / Western Blot de VEGF dels transfectants i els fibroblast parentals. B/ Western blot de tres tumors *in vivo* representatius de cada tipus de mutació. Conservant el patró general de major augment en els ASP13 les series de tumors són heterogènies. El Western blot de l'actina sobre la mateixa membrana on es va detectar el VEGF s'utilitza com a referència de la càrrega proteica. C/ Northern VEGF amb RNA total del transfectants en cultiu. La sonda que es va utilitzar assenyalava VEGF-A. En la fotografia inferior s'observa la tinció del bromur d'etidi que utilitzem com a referència per la càrrega .

Les immunohistoquímiques sobre tumors *in vivo* parafinats remarca l'augment d'expressió en el cas dels ASP13 però també assenyalen que part de la producció que observem en el Western Blot la podem atribuir a cèl·lules no tumorals com el macròfags. També podem observant la heterogeneïtat dels tumors, però mantenen les diferències entre els grups.

TUMORS	Resultats
E29/2000	IHQ.
D-K13-11	-
E-K13-11	-
D-K13-12	++
E-K13-12	++
D-K13-13	++
E-K13-13	++
D-K13-14	+
E-K13-14	+
D-K13-15	+
E-K13-15	++
D-K12-16	+
E-K12-16	+
D-K12-17	-
E-K12-17	-
D-K12-18	+
D-K12-19	+
E-K12-19	++
D-K12-20	+
E-K12-20	-

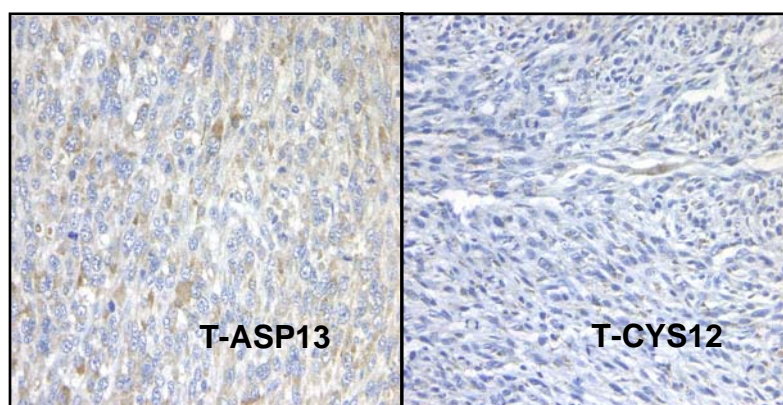


FIGURA: **Marcatge anti-VEGF**. Aquesta tècnica d'immunohistoquímica es va realitzar en els casos de l'inòcul E29/2000 parafinats. La valoració d'aquest marcatge s'ha realitzat per % de cèl·lules tumorals tenyides. ++ > 60% de cèl·lules positives, + entre un 20-60% de cèl·lules positives i - < 20% de cèl·lules positives. Les dues fotografies en el microscopi a 40X, són un exemple representatiu de la sèrie de tumors. Les cèl·lules dels tumors ASP13 a l'esquerra expressen més VEGF.

Amb una valoració per **ELISA** de llisats dels tumors subcutanis vàrem acabar de confirmar que es mantenia l'heterogenitat dins dels grups de tumors però que les diferències continuaven essent paleses. Els tumors amb mutació ASP13 expressen més quantitat de VEGF que els que tenen mutació CYS12. Per determinar la quantitat de VEGF secretat per les cèl·lules tumorals es van analitzar els medis dels cultius cel·lular en un 80% de confluència per ELISA. *In vitro* els transfectants ASP13 secreten cinc vegades més VEGF que els CYS12. Els resultats determinen que els tumors amb ASP13 tenen més secreció de VEGF que els CYS12.

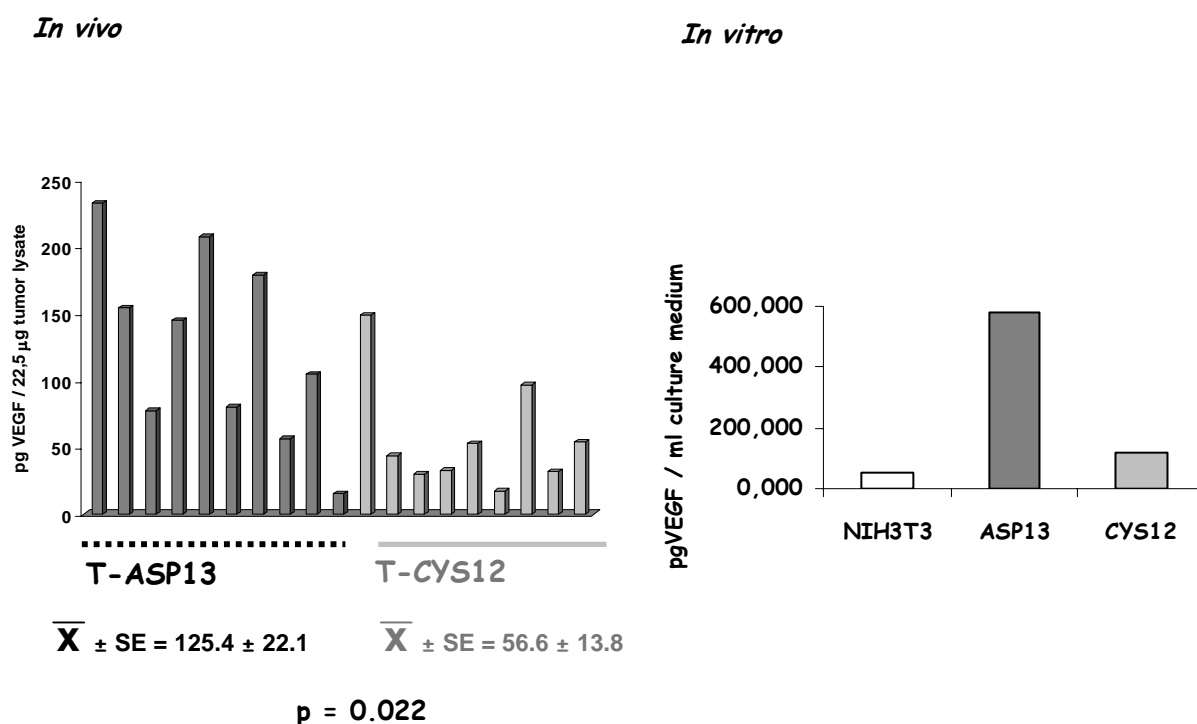


FIGURA: **ELISA VEGF**. A/ L'histograma és el resultat de l'anàlisi de 22.5 µg del llisat total dels tumors subcutanis. Les barres corresponen als valors individuals de cada tumor B/ L'histograma representa els resultats de l'ELISA en els medis condicionants cel·lulars. L'eix de les ordenades marca els pg de VEGF per ml de medi de cultiu cel·lular. Cada barra representa un tipus cel·lular. Les diferències són evidents.

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ I L'ACTIVITAT VEGFR2 *IN VITRO*.

Aquest augment d'expressió de VEGF per part de les cèl·lules *in vitro* i *in vivo* podria tenir un pes important en el creixement tumoral si existís un efecte autocrí. Per tant es va analitzar per Western Blot l'expressió de VEGFR2 en pellets dels transfectants. També es va mesura la possible activació de les vies ERKs i Akt en les cèl·lules estimulades amb VEGF. Ambdós clons són VEGFR2 negatius per Western Blot i no s'activa cap de les dues vies després de l'estimulació per VEGF *in vitro*. L'experiment s'ha realitzat paral·lelament amb les cèl·lules HUVEC com a control.

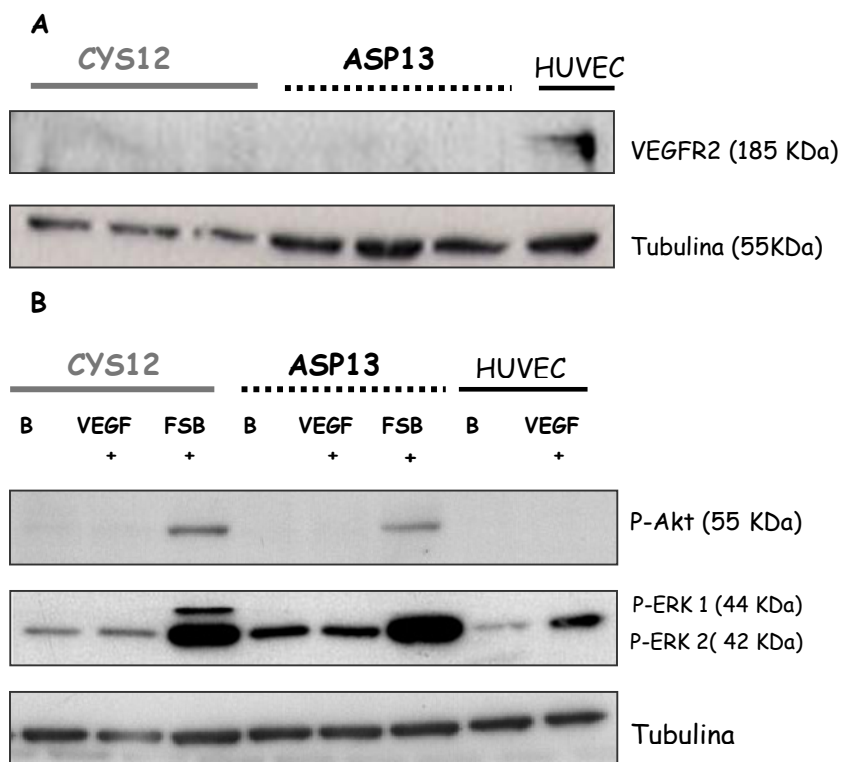


FIGURA: VEGFR2 A/ Western Blot dels llisats proteïcs dels diferents transfectants amb les mutacions de K-Ras. Cada mutació està representada per tres mostres independents de pases diferents. Les cèl·lules HUVEC són el control positiu de l'expressió i el marcatge de la Tubulina assenyalen la càrrega. B/ Western Blot de Akt, ERK 1 i ERK2 fosforil·lats. Els extractes proteïcs són els dels transfectants després de ser estimulats 10 minuts amb VEGF (VEGF+) o amb sèrum (FSB+) o bé crescudes sense sèrum, estat basal (B). La detecció en les cèl·lules HUVEC és el control de l'experiment i el marcatge amb tubulina ens assenyalen la càrrega.

ESTABILITAT DE LA TROMBOSPONDINA - 1

Dins de la balança angiogènica hem considerat que la Trombospondina podria tenir una funció rellevant per determinar les diferències del fenotip angiogènic que hem observat *in vivo*. Per analitzar l'expressió d'aquesta proteïna angiogènica s'ha realitzat un **Western Blot** en els llistats dels tumors subcutanis o en els pellets cel·lulars dels cultius al 80%. El Western Blot ens dóna molt poca senyal de la TSP-1 en aquest sistema. *In vitro* les mutacions en el gen K-Ras disminueixen l'expressió de TSP-1 però no queda demostrat una regulació diferencial segons el tipus de mutació. *In vivo* la detecció de TSP-1 és pot considera anecdòtica. Podríem interpretar que la seva absència decanta la balança cap a la neovascularió.

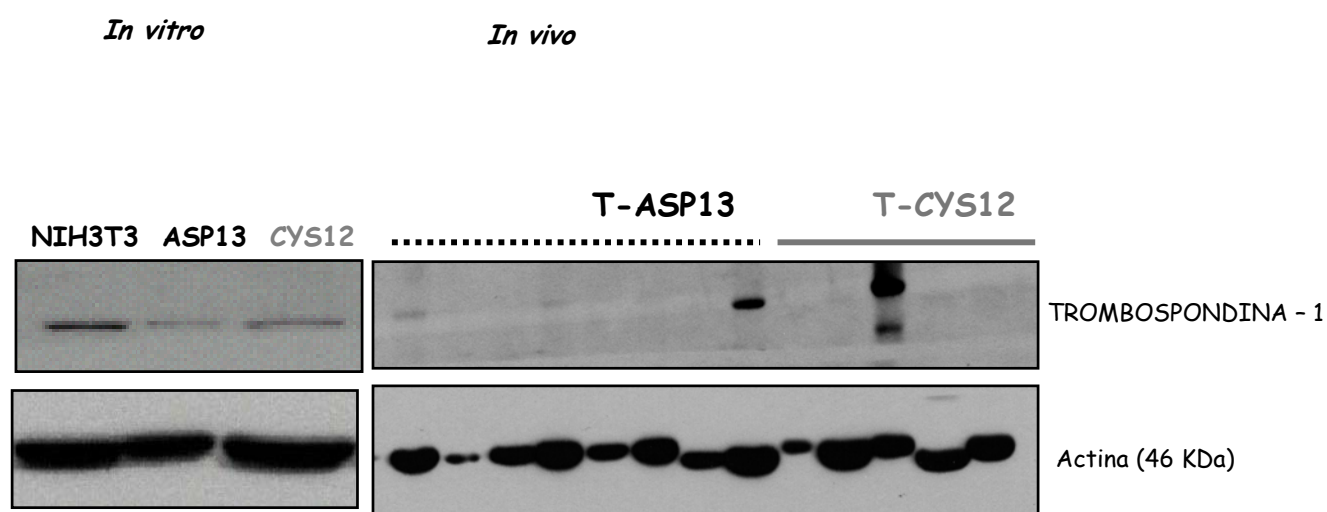


FIGURA: **Western blot de la Trombospondina - 1.** A/ Western blot de les cèl·lules transfectades amb diferents mutacions del gen K-Ras. El primer marcatge és amb l'anticòs anti trombospondina i el segon amb l'actina que l'utilitzem com a control de la càrrega proteica. B/ Western blot de vuit tumors amb mutació ASP13 i cinc amb CYS12 com exemple de la sèrie de tumors subcutanis. Les càrregues de proteïna no estan igualades i l'electroforèsi ens ha desplaçat diferencialment les mostres. El control de l'actina ens dóna la informació per contrarestar aquestes diferències.

ESTUDI DE LES ANGIOPOIETINES.

L'expressió de l'angiopoietina 1 es va analitzar *in vivo* i *in vitro* mitjançant **Western Blot**. L'anticòs utilitzat reconeix un precursor de l'angiopoietina 4 i l'angiopoietina 1 que es localitzen en el mateix tamany proteic. Considerem aquests resultats com una primera aproximació a unes molècules difícils de detectar. L'angiopoietina 1 sembla augmentada en els clons amb mutació CYS12 però la referència de càrrega de l'actina pràcticament iguala el clon CYS12 al ASP13. Els tumors subcutanis mostren alta variabilitat que impedeix extreure conclusions.

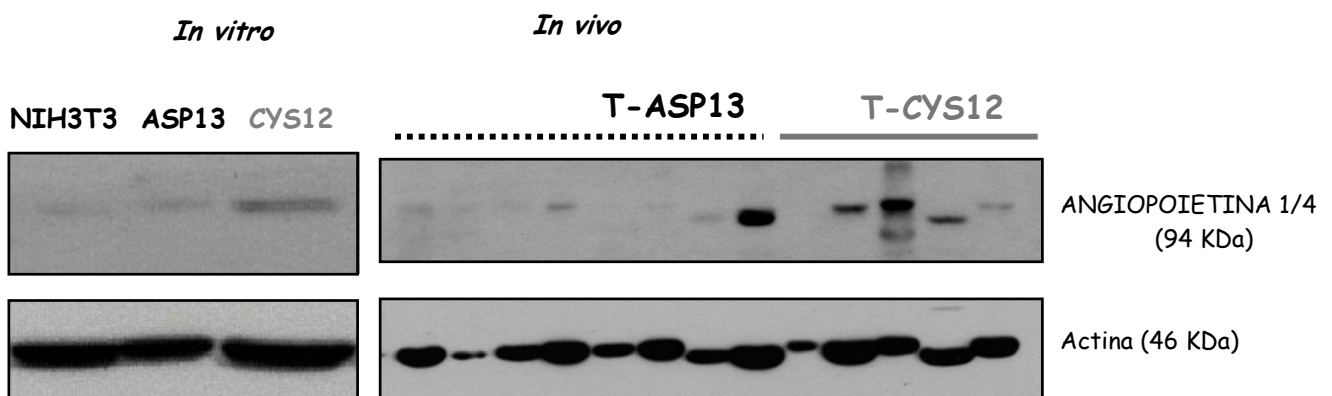


FIGURA: **Western Blot de les angiopoietines.** A/ Western blot dels pellets cel·lulars amb un marcatge de l'angiopoietina 1 i el precursor de la 4 i en la imatge inferior el control de l'actina. B/ Western blot de vuit tumors subcutanis amb mutació ASP13 i cinc tumors amb CYS12 representatiu de la sèrie de tumors subcutanis. La banda de 94 KDa és l'angiopoietina 1 junt amb el precursor de l'angiopoietina 4. A la part inferior del a membrana és va unir l'anticòs anti-actina per tenir la referència de la càrrega proteica i l'electroforèsi.

El factor pro-angiogènec VEGF està regulat diferencialment; els tumors amb mutació en el codó 13 del gen K-Ras augmenten la seva expressió respecte dels que tenen mutació Cys en el codó 12. Aquesta diferència s'observa *in vivo* i *in vitro* malgrat *in vivo* les cèl·lules ASP13 estan acompanyades per molts macròfags/ monòcits que també produeixen molt VEGF. Per Western Blot no hem detectat expressió de VEGFR2 en els transfectants *in vitro* ni tampoc activació de les vies d'ERKs o Akt en front l'estimul·lació de VEGF. L'expressió de la trombospondina-1 tendeix a augmentar en els transfectants CYS12 *in vitro* però no hem demostrat diferències *in vivo*. Les primeres proves de detecció de l'angiopoietina 1 no indiquen diferències *in vitro* i una alta heterogeneïtat entre els tumor *in vivo*.

DEGRADACIÓ DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.

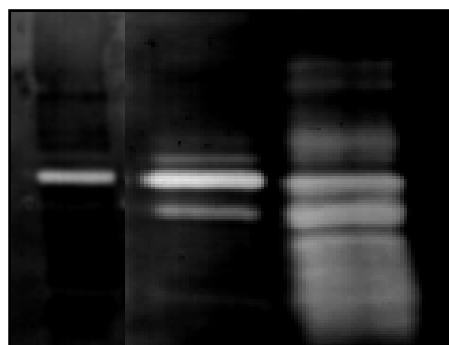
LES MMPs MÉS RELACIONADES AMB L'ANGIOGÈNESI: MMP2 , MMP9 i MMP14

Les metaloproteïnases engloben el grup dels pocs enzims coneguts capaços de degradar la majoria de les proteïnes que componen la matriu extracel·lular. Degut que en el procés de neovascularització aquestes proteïnes juguen un paper important, vàrem voler analitzar si podrien estar implicades en definir les diferències angiogèniques que observem en els tumors produïts per NIH3T3 amb diferents mutacions en el gen K-Ras.

L'expressió de la **MMP2** i la **MMP9** es va analitzar per zimografia de gelatina. *In vitro* no hem detectat mai MMP9 en els transfectant mentre que *in vivo* es poden observar les dues metaloproteïnases. Les cèl·lules amb mutacions en el gen K-Ras expressen més MMP2 que les NIH3T3 parentals. En el clon i els tumors amb CYS12 detectem més MMP2 que en el cas de la mutació ASP13. Però aquest grup de tumors ASP13 expressa més MMP9 *in vivo*. Representem en histogrames els valors mitjans de les tres repeticions en cada experiment *in vitro*. En el cas dels tumors subcutanis l'histograma representa les mitges de les densitats òptiques de les bandes en els 10 tumors de cada grup.

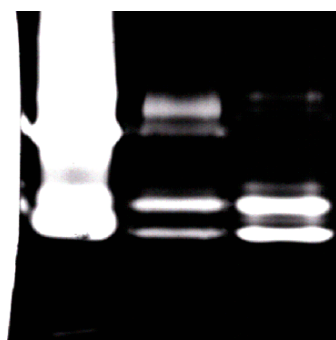
FIGURA: Zimograma de gelatina. A/ Zimograma dels llistats cel·lulars. Els tamany de les degradacions de gelatina determinen cada tipus de MMP. Aquest zimograma es va repetir tres vegades amb llistats cel·lulars de diferents passes i mai es va detectar MMP9. B/ Zimograma exemple dels resultats obtinguts en cada tipus tumoral. Pels seu tamany podem diferenciar el tipus i l'estat d'activació de cada MMP. El control és comercial i determina que la tècnica ha funcionat i els tamany de les activitats que observem corresponen.

In vitro
NIH3T3 ASP13 CYS12



← PRO-MMP2 (72 KDa)
← MMP2i (70KDa)
← MMP2a (65 KDa)

In vivo
Control T-ASP13 T-CYS12



← MMP9i (92 KDa)
← MMP9a (85KDa)
← PRO-MMP2 (72 KDa)
← MMP2i (70KDa)
← MMP2i (68KDa)
← MMP2a (65 KDa)

In vitro el clon CYS12 expressa més **MMP2** i acumula més MMP2 activa que no pas el clon ASP13. És més elevada la diferència de la MMP2 activa entre els dos clons que no pas la MMP2 total. *In vivo* els tumors CYS12 expressen més MMP2. Els CYS12 tenen el 47% de la MMP2 detectada activa mentre que en el cas del grup ASP13 només el 26% de la MMP2 detectada és activa ($p < 0.01$). Els tumors amb mutació en el codó 13 acumulen més MMP2 intermitja (62%). El Western Blot acaba de confirmar els resultats obtinguts per zimografia.

In vitro

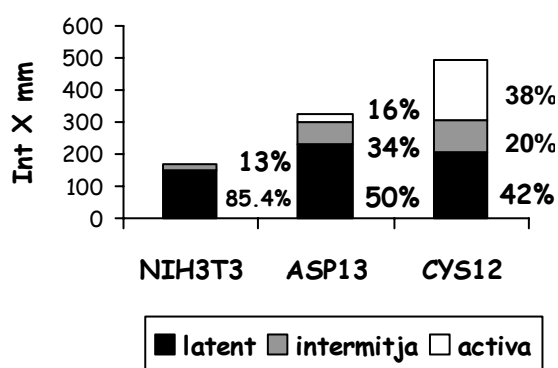


FIGURA: **MMP2 in vitro**. A/ Correspon a les valoracions dels pellets cel·lulars. Aquests resultats es realitzen amb les mitjanes de tres experiments realitzats. Els percentatges els realitzem sobre el total detectat de cada tipus cel·lular.

In vivo

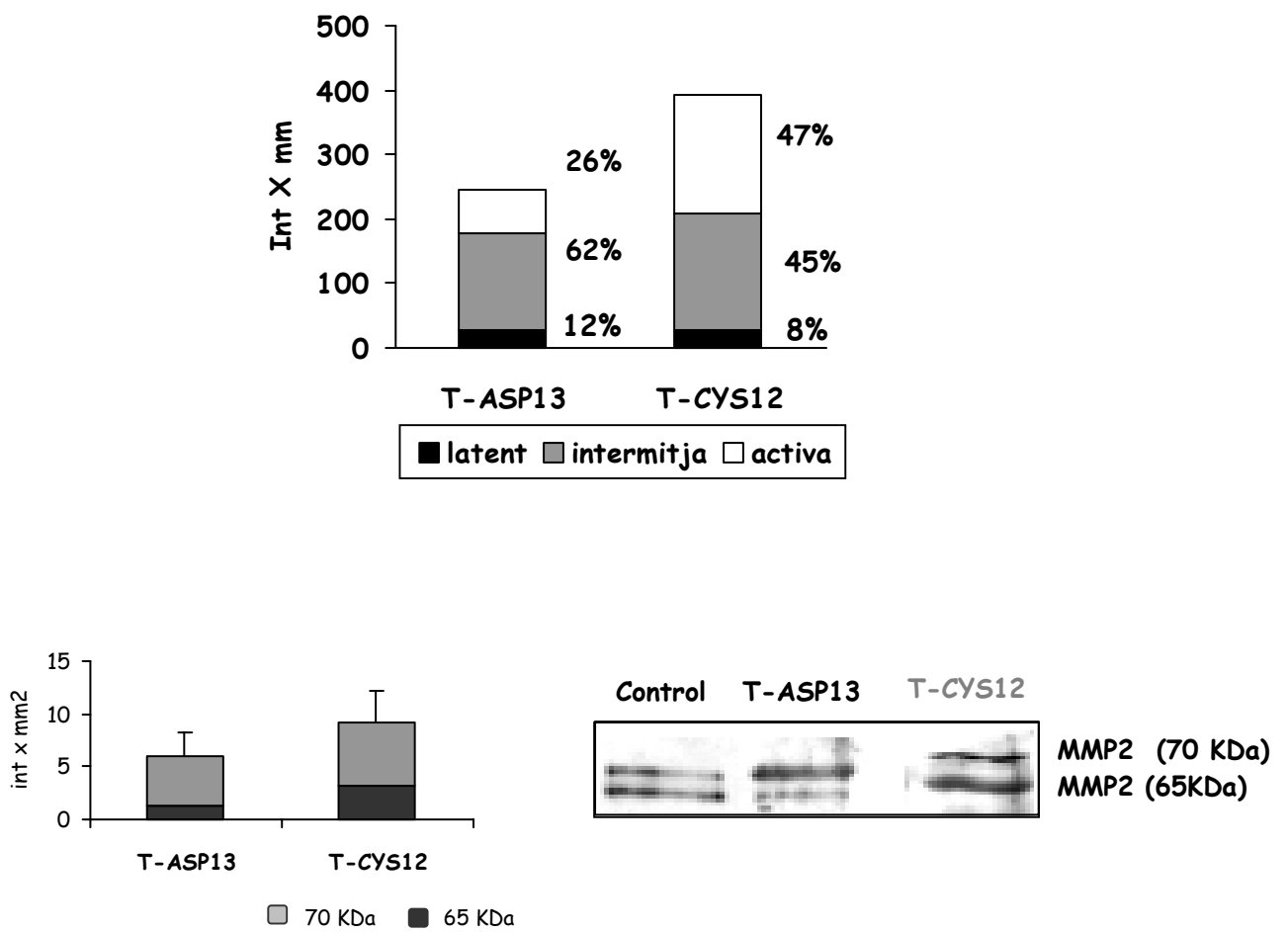
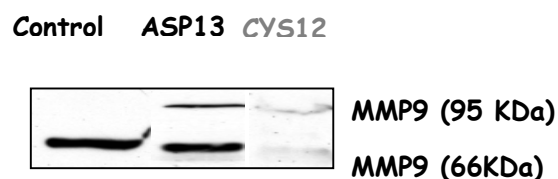
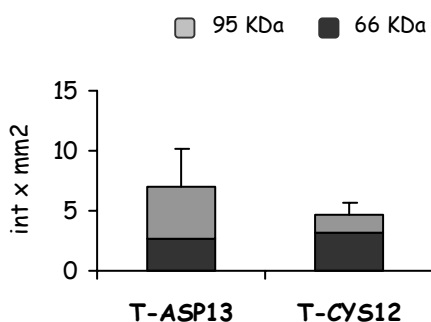
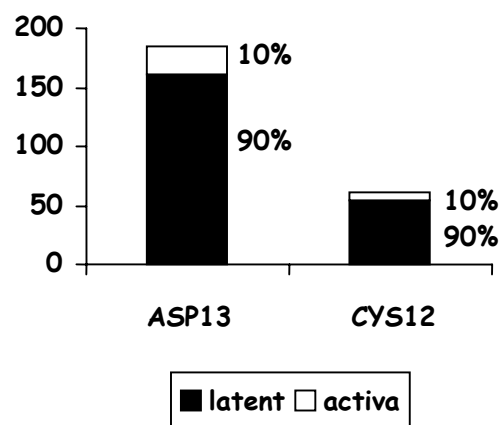


FIGURA: **MMP2 in vivo**. B/ Representació de les mitjanes de les densitats òptiques en els tumors. Els % són respecte a les lectures totals de l'activitat detectada. La fase intermitja representa la suma de bandes de 70 i 68 KDa. C/ Western Blot de dos tumors exemple de cada grup i D/ l'anàlisi densitomètric és el resultat de les mitjanes de tota la sèrie de tumors. El control ens assenjala les bandes de 65 i 70 KDa. Els CYS12 tenen la banda de 65 KDa augmentada i els ASP13 tenen més MMP2 de 70KDa.

Tal com hem dit abans la **MMP9** no l'hem detectada mai *in vitro*. Per contra, en els zimogrames dels tumors subcutanis, hem detectat MMP9 inactiva i activa que corresponen a les bandes de 92 i 85 KDa respectivament. Els tumors amb mutació ASP13 expressen més MMP9 que els CYS12 ($p < 0.01$). La proporció d'activació de l'enzim es realitza amb la mateixa eficiència en els dos tipus de tumors. L'anàlisi de l'enzim MMP9 s'ha completat amb un Western Blot que confirma que els tumors ASP13 expressen més MMP9.

FIGURA: **MMP9 in vivo.**A/ Histograma de les mitjanes densitomètriques en les bandes dels tumors subcutanis detectades per zimografia de gelatina. Els percentatges es realitzen respecte a les lectures totals de l'activitat detectada. B/ Western Blot de dos exemples dels tumors subcutanis C/ Histograma de l'anàlisi de totes les bandes dels tumors subcutanis. El control comercial ens assenyala la banda de 66 KDa.



La **MMP14** és la tercera MMP més relacionada fins a l'actualitat amb l'angiogènesi. S'ha descrit moltes relacions amb les altres dues MMPs ja que és activada per la MMP9 i activa la MMP2. L'estudi de la MMP14 es va realitzar per Western Blot. Els resultats assenyalen que els clons transfectats expressen més MMP14 que els fibroblast i entre els dos clons amb mutació diferencial de K-Ras en ASP13 se li detecta un lleu augment de l'expressió. Les diferències entre les dues mutacions són majors en l'anàlisi *in vivo*. La mitjana dels valors dels tumors subcutanis ASP13 és el doble que la dels tumors CYS12.

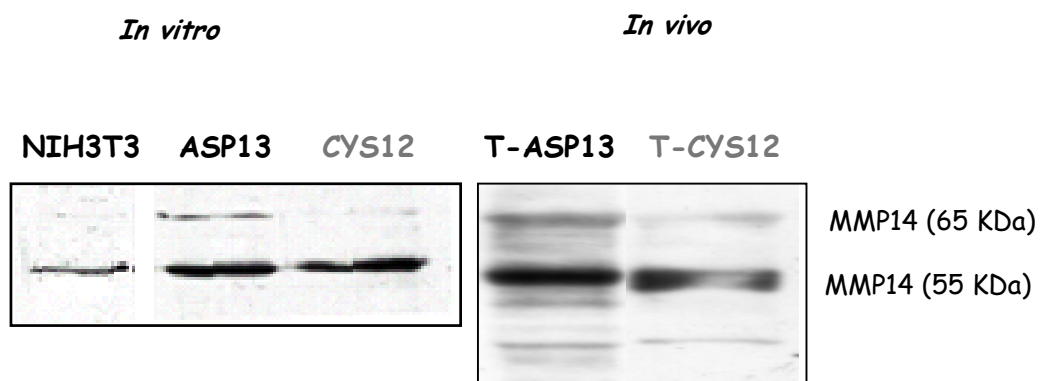
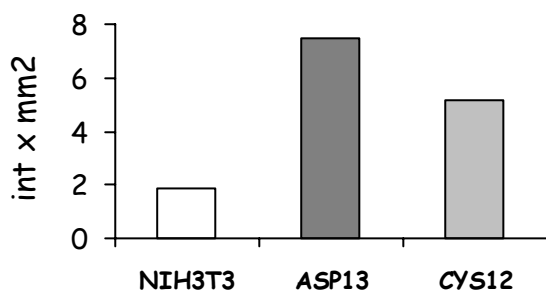


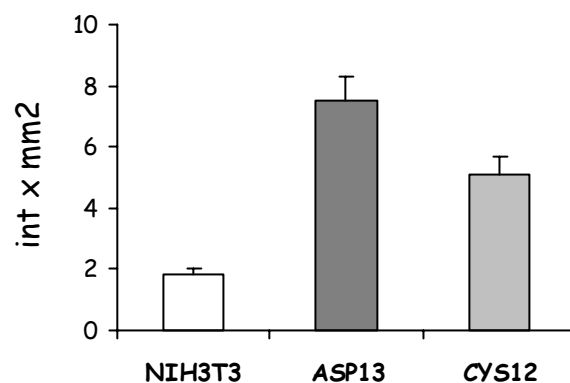
FIGURA: **MMP14**. A/ Western Blot dels transfectants *in vitro*. Es van repetir tres vegades i els anàlisi de les bandes estan representats en els histogrames C i D en la pàgina següent. B/ Representació d'un dels Western Blot en els tumors subcutanis.

In vitro

LLISAT CEL.LULAR (66 KDa)

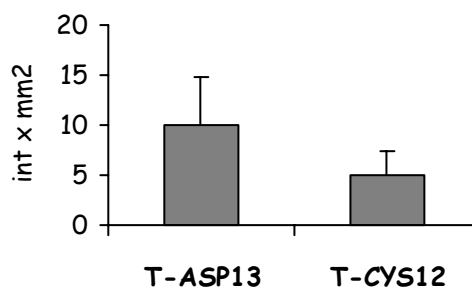


LLISAT CEL.LULAR (55 KDa)



In vivo

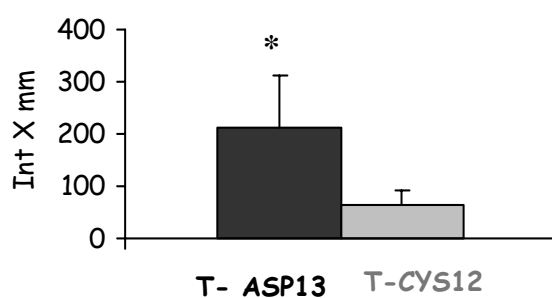
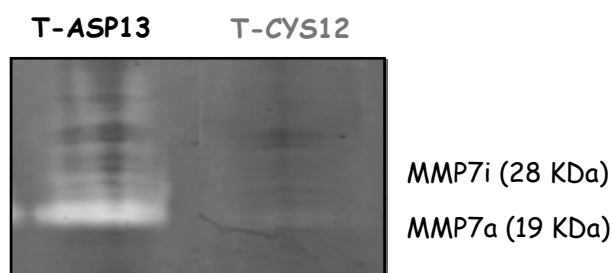
FIGURA: **MMP14**. Histogrames representatius dels valors de densitats dels Westerns Blot. Cada histograma correspon a una banda detectada. E/Les mitjanes de les intensitats en tots els tumors analitzats. Aquest anàlisi s'ha realitzat de la banda a 55 KDa.



EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE MMP7

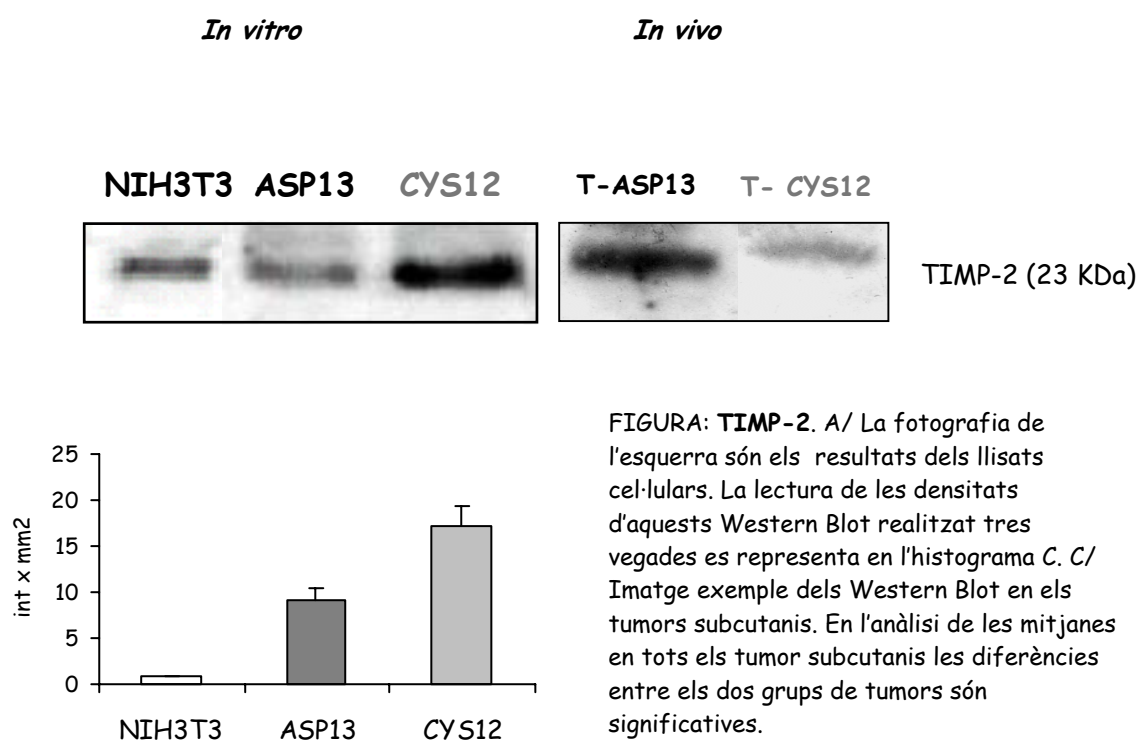
La **MMP7** és una matriolisina activada per MMP3 i plasmina, capaç d'activar MMP9. Està associada en moltes ocasions a la presència de macròfags i es va considerar interessant analitzar-la amb un zimograma de caseïna i un altre de transferrina. Nomès es va veure activitat d'aquest enzim en els tumors ASP13. No va ser detectada ni en els cultius *in vitro* ni en els tumors CYS12.

FIGURA: Zimograma de transferrina.
A/ En la fotografia s'observa un exemple representatiu de cada un dels grups de tumors. B/ Anàlisi corresponent a tots els tumors subcutanis. ($p < 0.01$)



REGULACIÓ EN L'EXPRESSIÓ DEL TIMP-2

El **TIMP-2** com a molècula vinculada a l'activació de les **MMPs** i a altres funcions angiogèniques es va considerar oportú analitzar-ne l'expressió. En els cultius cel·lulars els transfectans **CYS12** expressen més **TIMP-2** però *in vivo* els tumors amb mutació **ASP13** tenen més quantitat d'aquests regulador. Els resultats dels Westerns Blot ens indicaven que els tumors dels fibroblast **ASP13** augmentaven la seva expressió.



Els clons amb mutació ASP13 expressen menys MMP2 i TIMP-2 *in vitro* que els clons CYS12, mentre que el tumor que produeixen *in vivo* generen més MMP9 i MMP7 i un augment del TIMP-2. La MMP14 està sobreexpressada en els clons ASP13 *in vitro* i *in vivo*.

Els fibroblasts amb la mutació CYS12 en el gen K-Ras produeixen més MMP2 en tots els sistemes estudiats.

ESTUDI EN ELS CARCINOMES DE COLON I RECTE.

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE LES MMPs SEGONS LA MUTACIÓ EN K-RAS.

En el nostre centre entre l'any 1996 a 1998 es va engegar un estudi cas-control per aprofundir en el coneixement de les bases moleculars del càncer colorectal. Els casos van esdevenir una cohort que ha estat seguida prospectivament. En primer lloc d'aquesta sèrie es van escollir un petit grup de tumors amb diferent genotip K-Ras (9-10 tumors per grup) per tal de conèixer la relació entre l'activitat de MMPs i l'estat de K-Ras en tumors humans. El més destacable d'aquests resultats preliminars seria que els tumors amb mutació en el codó 12 (Siguei aspàrtic 12 o cisteïna 12) tenen menys MMP9 activa que els no mutats o mutats en el codó 13 del gen K-Ras. Els nivells de proMMP9 o MMP9 intermitja són més homogenis en tots els tipus de tumors analitzats. Els nivells de MMP2 en els carcinomes CYS12 són menors però no s'observen diferències significatives entre els tres grups.

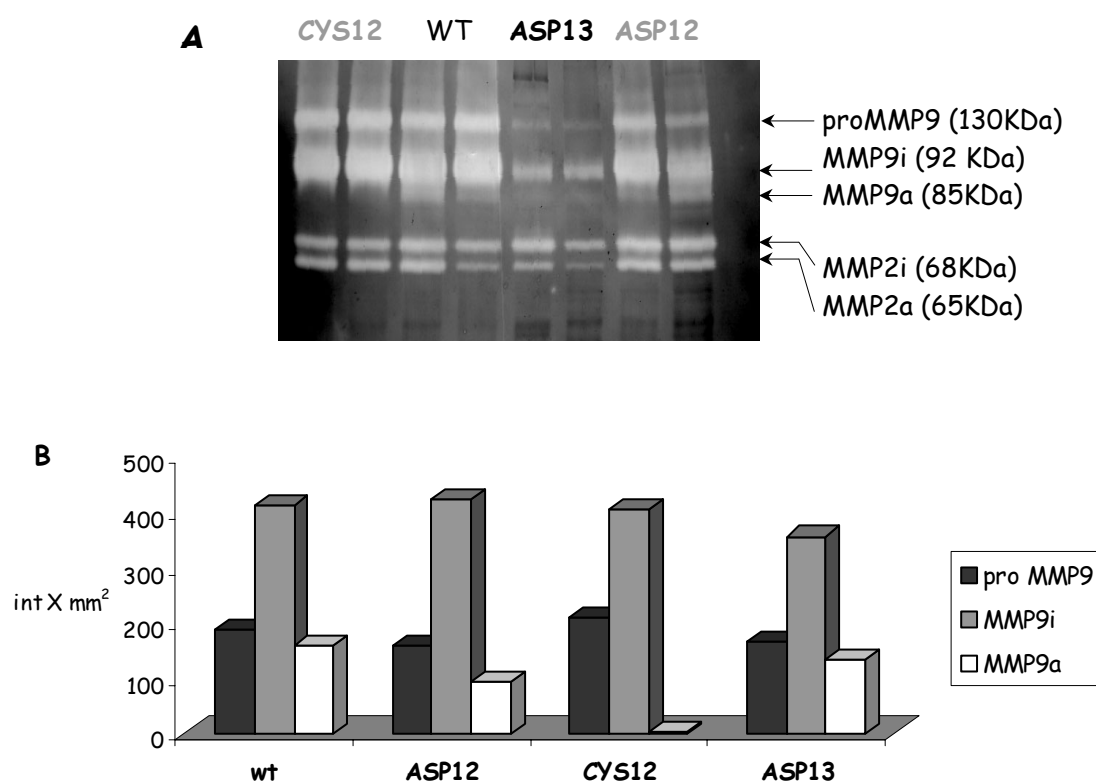


FIGURA: **MMP9 en carcinomes de colon i recte.** A/ Zimograma de gelatina amb dos exemples representatius de cada tipus de mutació. WT tumors sense mutació en el gen K-Ras, ASP13 , ASP12 i CYS12 corresponent a les mutacions de cada grup en el gen K-Ras. B/ Histograma de les intensitats mitges de MMP9 detectades en cada grup de tumors i

ANÀLISI DE LES RELACIONS ENTRE EL FENOTIP VASCULAR I LES MUTACIONS EN EL GEN K-RAS.

Per tal de conèixer si l'observat al model murí era extrapolable als tumors humans van ampliar la sèrie de tumors analitzats per zimografia a 95 casos en els quals es va estudiar la densitat vascular i la expressió de molècules angiogèniques i la seva relació amb mutacions en el gen K-Ras i amb la supervivència. En aquesta sèrie el percentatge de tumors K-Ras positiu era del 34.7% (9 VAL12, 7 ASP12, 6 ASP13, 5 CYS12, 1 SER12).

Anàlisi de la densitat vascular.

Hem processat talls parafinats de 3 micres de les mostres tumorals i normals i hem analitzat la densitat de vasos sanguinis en el teixit tumoral i normal del mateix pacient, després del marcatge per immunohistoquímica del CD31. A més del teixit tumoral també hem valorat 48 teixits normals.

Les mitjanes del nombre de vasos per camp no assenyalen diferències en la MVD (*MicroVascular Density*) entre els tumors amb mutació o sense, ni entre les mutacions puntuals de K-Ras. Existeixen diferències significatives entre el teixit normal i el tumoral. La mitjana de MVD en el colon normal és de 14.72 ± 3.4 vasos. EL 90% dels teixits normals tenen menys de 20 vasos per camp de 400X. Els teixits tumorals són més variables, amb una mitjana de 23.16 ± 7.97 però només el 35% tenen menys de 20 vasos en un camp de 400X. (test Wilcoxon, $p < 0.001$).

Per analitzar el nombre de vasos tumorals hem escollit com a mesura de tall tenir menys de 20 vasos ja que hem considerat que aquesta mesura de tall seria el més semblant al teixit normal. Observem una relació inversa del nombre de vasos i la mutació en el gen K-Ras. El 71.7% dels tumors sense mutació en K-Ras tenen més de 20 vasos sanguinis per camp mentre que aquest percentatge disminueix al 55.6% en els que tenen mutació però aquestes diferències no són

estadísticament significatives. Tampoc hem trobat diferències entre el nombre de vasos i les diferents mutacions de K-Ras.

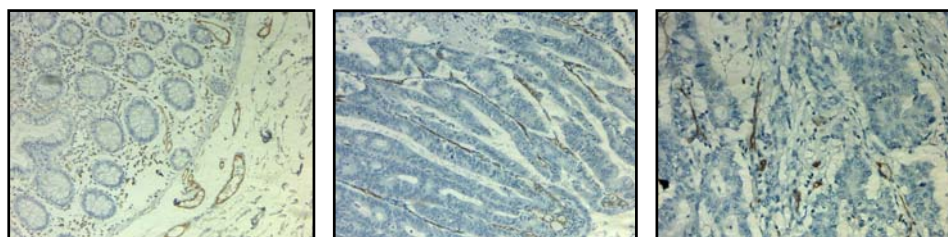
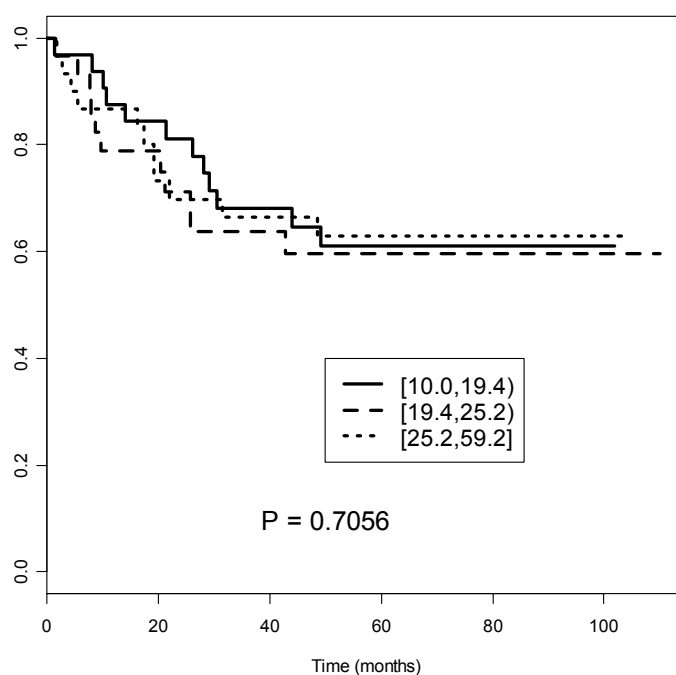


FIGURA: Tincions anti-CD31. A/Fotografia a 200X del colon normal B/Fotografia carcinoma de colon 200X C/Fotografia d'un carcinoma de colon 400X.

GRUP	n	MITJANA	D.E.
T. NORMAL	48	14.72	3.4
T. T. SENSE MUTACIÓ	62	23.44	8.39
T. T. MUTAT EN K-RAS	32	22.92	7.1
T.T. ASP13	6	25.17	5
T.T. CYS12	5	23.48	6.59
T.T. VAL12	10	19.56	4.71
T.T.ASP12	9	23.51	10.22
T.T. ARG12	1	31.4	
T.T. SER12	1	26.4	

TAULA: MITJANES DEL NUMERO DE VASOS T. Teixit , T.T. Teixit tumoral, n Nombre de mostres de diferents pacients, D.E. Desviació Estandar. En un dels teixit tumorals no vàrem tenir mostra per analitzar el gen K-Ras.

Altres estudis han suggerit que pot existir una bona correlació entre la densitat vascular i la supervivència dels tumors colorectals. En el nostre cas la densitat vascular no s'associa a una pitjor supervivència (logrank test $p=0.7056$).



GRAFICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGONS LES DENSITATS VASCULARS. En l'eix de les ordenades representem els tant per 1 dels casos morts i en l'eix de les abscisses en temps en mesos. Els tercils són 10-19.4 $n = 32$, 19.4-25.2 $n=32$ i 25.2-59.2 $n=31$. Tenir més o menys vasos no millora ni empitjora la supervivència global.

Anàlisi de l'expressió de VEGFR2.

En un primer moment vàrem voler analitzar la expressió de VEGF per IHQ per estudiar la seva correlació amb la presència de mutacions al gen K-Ras. La dificultat d'interpretació del marcatge ens va portar a abandonar-ho. Aleshores vam continuar l'anàlisi amb el receptor VEGFR2 que podria ser positiu als endotelis i a les pròpies cèl·lules tumorals. El 50% dels endotelis del teixit normal tenen un nivell de positivitat molt baix i la resta no mostren cap positivitat. El 78.95% de les cèl·lules tumorals expressen receptor tipus 2 del VEGF amb una intensitat de 2 (48.42%) i 3 (30.53%). Per contra els vasos associats al tumor no varien significativament respecte als de la mucosa normal del colon.

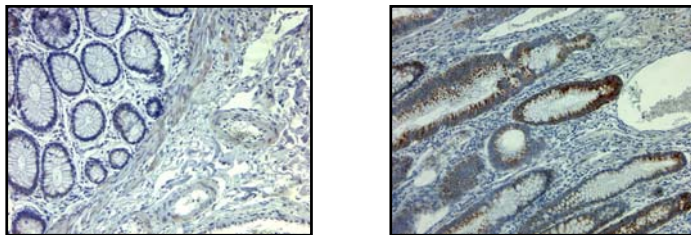


FIGURA: **Marcatge anti-VEGFR2.** A/Fotografia a 200X del colon normal
B/Fotografia carcinoma de colon 200X .

L'expressió de VEGFR2 en els teixits tumorals està relacionada amb la mutació en el gen K-Ras. (Test de Pearson's de la χ^2 , $p = 0.02479$), essent els tumors K-Ras positius els que tenen més possibilitats d'expressar K-Ras mutat.

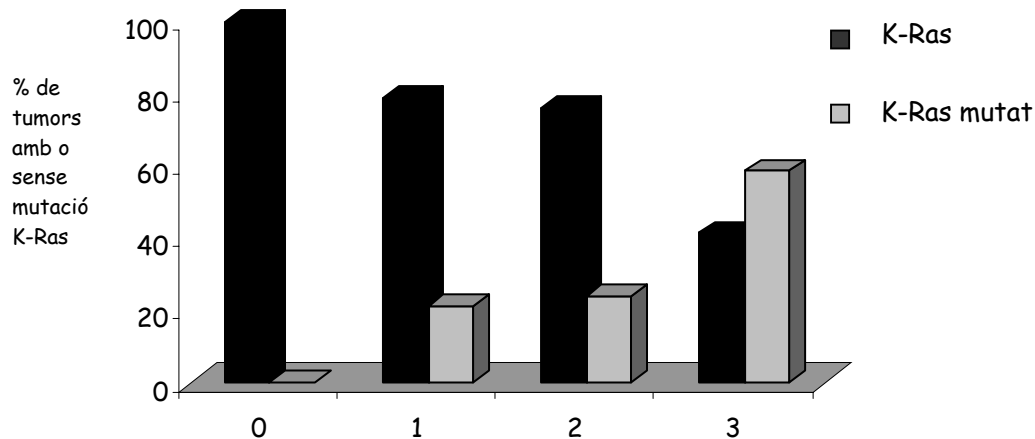
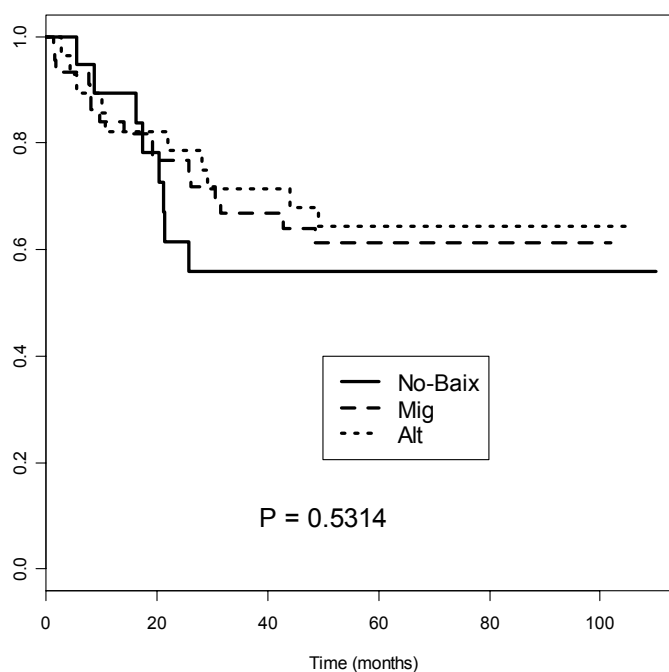
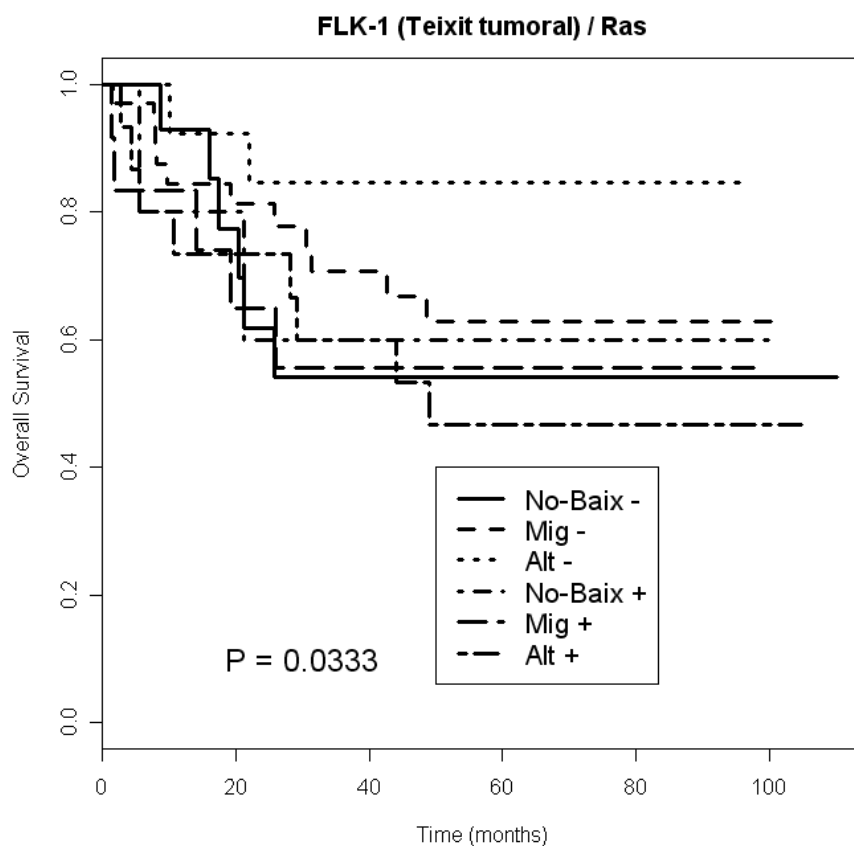


FIGURA : Mutació en el gen K-Ras i expressió de VEGFR2. En l'eix de les abscisses expressem numèricament els quatre grups de tumors segons l'expressió de VEGFR2. Ordenats de menor expressió a major. El grup 0-1 no expressa aquest el receptor o en molt poca quantitat visible ($n = 20$). El grup 2 té major expressió visible ($n=46$) i el grup 3 és el que més expressa aquest receptor ($n= 29$). L'eix de les ordenades determinem el percentatge de tumors dins de cada grup que tenen o no mutació en el gen K-Ras. Així el grup que expressa més VEGFR2 té més percentatge de tumors amb mutació.

L'expressió de VEGFR2 no correlaciona amb una pitjor supervivència. Per contra quan analitzem les dades de supervivència respecte VEGFR2 tenint en compte la mutació de K-Ras els resultats ens indiquen que: Els tumors amb mutació K-Ras disminueixen la supervivència del pacient si expressen VEGFR2. Quan no tenen mutació en K-Ras la supervivència no és dependent de l'expressió de VEGFR2.



GRAFICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGONS L'EXPRESSIÓ DE VEGFR2. En la corba de Kaplan-Meier representem: En l'eix de les ordenades es determina els tant per 1 dels casos morts i en l'eix de les abscisses en temps en mesos. Els grups representats corresponen a les diferents expressions de VEGFR2 de la següent manera: No-Baix intensitats de 0-1; Mig a la intensitat de 2 i Alt a la intensitat de 3.



GRAFICA: SUPERVIVÈNCIA GLOBAL SEGONS L'EXPRESSIÓ DE VEGFR2. En l'eix de les ordenades de la corba de Kaplan-Meier representem els tant per 1 dels casos morts i en l'eix de les abscisses en temps en mesos. Els grups representats corresponen a les diferents expressions de VEGFR2 de la següent manera: No-Baix intensitats de 0-1; Mig a la intensitat de 2 i Alt a la intensitat de 3. (-) No mutació en K-Ras i (+) K-Ras mutat. El coeficient de Logrank sense ajustar per Dukes, és $p = 0.033$.

En tumors humans hem observat que la mutació ASP en el codó 13 s'associa a sobreexpressió de MMP9. Les mutacions en K-Ras s'associen a més expressió de VEGFR2 en les cèl·lules tumorals. El risc de mort és més elevat quan s'associa mutació de K-Ras i sobreexpressió de VEGFR2.

discusió



La importància de la naturalesa molecular de la mutació K-Ras

La importància del gen K-Ras en oncologia queda palesa per la freqüència i la transformació cel·lular que comporten les seves alteracions. Una mutació simple en el gen K-Ras comporta canvis en la transformació cel·lular, inducció a la progressió i agressivitat tumoral, apoptosi, metabolisme... (Downward 1997) (Soussi and Lozano 2005) Aquestes mutacions en el gen K-Ras estan descrites en les primeres fases fins i tot no malignes (tumors epitelials benignes o adenomes) del procés cancerigen i per tant constitueix un dels primers passos cap a la neoplàsia maligne en molts carcinomes i sarcomes. (Kahn, Yamamoto et al. 1987; Bos 1989). També sabem que la presència de mutacions de forma aïllada, sense altres alteracions genètiques associades, no s'associa a la transformació neoplàsica. (Guerra, Mijimolle et al. 2003)

Des de fa anys s'ha fet palès que no es només la presència de mutacions en el gen K-Ras (Que condiona la transformació neoplàsica) sinó la seva naturalesa molecular la que pot influir en la biologia tumoral. En neoplàsies colorectals malignes hi ha una més gran proporció de mutacions en el codó 12 del gen K-Ras, comparat amb el codó 13. El que suggereix que les mutacions en el codó 13 no són seleccionades tan fàcilment *in vivo*. (Shibata, Schaeffer et al. 1993) Altres autors han demostrat que la presència de mutacions en el codó 13 s'associa a millor pronòstic que les mutacions en el codó 12. Ja fa anys es va demostrar *in vitro* que els transfectants amb mutacions al codó 13 generen menys focus transformats en NIH3T3 que els transfectants al codó 12. El nostre grup ha anat aprofundint en aquestes diferències fenotípiques associades a mutacions específiques en el gen K-Ras. Utilitzant fibroblasts de ratolí NIH3T3 transfectats amb el gen K-Ras humà mutat en els dos codons més freqüents (Codó 12 i codó 13) vàrem observar diferències *in vitro* (Guerrero, Casanova et al. 2000; Vizan, Boros et al. 2005) i diferents patrons de creixement tumoral *in vivo*. (Guerrero, Figueras et al. 2002) Les conclusions d'aquestes diferències ens van portar a estudiar com els diferents genotips K-Ras influeixen en el fenotip angiogènic.

Després de la inoculació subcutània clàssica dels transfectants, hem pogut observar de forma reproduïble que els tumors amb mutació ASP13 apareixen 8-10 dies més tard que els tumors amb mutació CYS12. Aquest retràs significatiu també es detecta en els inòculs intramusculars, el que indica que és independent de la naturalesa de l'entorn tumoral. Això és rellevant ja que els fibroblasts de diferents localitzacions anatòmiques expressen diferent repertori de molècules (Togo, Shimada et al. 1995) i per tant el microambient inicial no sembla una de les principals causes en el diferent comportament en el creixement *in vivo* dels transfectants. Per altra banda i paradoxalment, un cop iniciat el creixement, els tumors amb mutació ASP13 es desenvolupen amb més rapidesa. Els nostres anàlisis demostren diferents patrons angiogènics en els tumors amb mutació CYS12 respecte els que tenen mutació ASP13. Les diferències en el creixement les podríem atribuir en part als sistemes vasculars que ha desenvolupat cada tipus tumoral.

Diferències en el fenotip vascular tumoral.

Hem demostrat diferències importants en la morfologia vascular entre els transfectants: els tumors CYS12 mantenen una major densitat vascular que els tumors ASP13. També hi ha diferències en el diàmetre vascular, la majoria dels vasos sanguinis dels tumors ASP13 tenen diàmetres majors que en els tumors CYS12. El diàmetre vascular és una diferència molt notòria que està determinant la diferent densitat vascular. Aquesta distribució podria estar condicionant el fet que hem observat més espais de necrosi en els tumors ASP13 que no en els CYS12. Sabem, però els paràmetres de densitat vascular i diàmetre no determinen *per se* l'eficiència del vas a nodrir les cèl·lules tumorals i patrocinar el creixement o a desenvolupar metàstasi. Ja ha quedat demostrat en la literatura que el fet de tenir més número de vasos (MVD) no necessàriament es relaciona amb elevada taxa de creixement. (Hlatky, Hahnfeldt et al. 2002; Rak and Yu 2004) Així com la diversitat entre diferents tipus de tumors del valor pronòstic que tenen aquestes dades. (Kreuter, Bieker et al. 2004; Stavropoulos, Bouropoulos et al. 2004).

Els vasos que es formen en els tumors no mantenen les característiques dels vasos en els teixits normals i poden adoptar moltes diferents característiques en cada creixement tumoral. (Carmeliet and Jain 2000; Eberhard, Kahlert et al. 2000) (Yancopoulos, Davis et al. 2000), (Bergers and Song 2005). Sovint la definició de vas madur es determina per les característiques i organització de les cèl·lules de les túniques en relació al seu diàmetre. Per tan es defineix més o menys madur segons s'acosta a l'estructura del vas amb el mateix diàmetre i funció en un teixit normal. La maduresa del vas s'associa a una major eficàcia de distribució de nutrients i oxigen com és el cas de la situació en els teixits normals on les cèl·lules estan en harmonia. Però en el cas del creixement tumoral les necessitats cel·lulars són diferents, l'eficiència del vas cal mesurar-la en el fet de que estigui millor o pitjor adaptat al tipus cel·lular que acompanya.

La desmina, l'alfa actina de la musculatura llisa, el proteoglicà condroití sulfat anomenat antigen de la neuroglia 2 (NG2) i el PDGFR són els marcadors de cèl·lules murals més coneguts i utilitzats, però a l'hora els més inespecífics per marcar tipus cel·lulars concrets. La desmina és una proteïna que forma filaments intermitjos i està implicada en l'unió del citoesquelet cel·lular amb els disc Z membranals que comuniquen les cèl·lules. Es localitza en la musculatura llisa, esquelètica i cardíaca, en fibroblasts i altres cèl·lules poc diferenciades. (Granger and Lazarides 1979) L'alfa actina de la musculatura llisa s'expressa en les cèl·lules musculars madures i immadures i en els pericits de tots els tipus de vasos circulitoris. (Hughes and Chan-Ling 2004) El proteoglicà NG2 s'expressa en pericits, neurones, cèl·lules gials progenitores i progenitors dels oligodendrocits. (Ozerdem and Stallcup 2003). El PDGFR està implicat en la comunicació entre les cèl·lules endotelials i el pericits però encara no s'han acabat de definir clarament totes les seves possibles funcions. També s'expressa en fibroblast i altres cèl·lules immadures (Song, Ewald et al. 2005).

Amb la doble immunofluorecència PECAM/ α -actina de la musculatura llisa hem evidenciat amb ambdós transfectants, que els vasos amb recobriment muscular són pocs, es situen en general en les perifèries del tumor subcutani i tenen un diàmetre vascular mig. No es pot descartar

que sigui un vas *co-optat* pel tumor, per tant no de nova formació sinó que existia en la pell del ratolí i el tumor l'ha envoltat. (Carmeliet and Jain 2000). El fet de que els vasos tumorals no estiguin recoberts per cèl·lules que expressin aquesta actina no determinen que les cèl·lules acompanyants no puguin expressar altres tipus d'actina per formar fibres contràctils i tenir una mínima regulació del flux circulant.

La doble immunofluorecència PECAM/desmina ens ha mostrat que els tumors amb mutació CYS12 el percentatge de cèl·lules desmina positives que acompanyen els vasos és menor que en el cas del tumor subcutani amb mutació ASP13. Tot ens assenyala que els tumors amb mutació ASP13 desenvolupen uns vasos més madurs i estructurats que els CYS12. Tot i no tenir informació sobre altres cèl·lules acompanyants a l'endoteli i no haver determinat la permeabilitat dels vasos; es pot especular que els tumors amb mutació ASP13 desenvolupen una vasculatura més complexa que pot cobrir millor les seves necessitats energètiques i que un cop el procés està iniciat li dóna una major rapidesa de creixement posterior.

Dependència dels factors angiogènics sobre el creixement *in vivo* / *in vitro* .

L'angiogènesi depèn del balanç entre diferents factors amb funció inhibidora , activadora i estabilitzadora sobre la vasculatura. El VEGF s'ha definit com el més potent dels factors angiogènics descrits fins a l'actualitat. En el nostre estudi és el factor on hem trobat més diferències d'expressió entre els diferents clons mutats de K-Ras: Les cèl·lules transfectades amb la mutació ASP13 expressen molta més quantitat de VEGF *in vitro* i *in vivo* que els transfectants CYS12. La regulació de VEGF ha estat associada prèviament a l'expressió de RAS. (Rak and Yu 2004) (Kranenburg, Gebbink et al. 2004). La caracterització prèvia d'aquests clons ja ens va definir que l'expressió de K-Ras en els clons és superior a la de la soca parental NIH3T3 però no hi ha diferències d'expressió entre els clons de diferents mutacions. (Guerrero, Casanova et al. 2000) Per tant les diferències que observem no les podem atribuir a la quantitat de Ras sinó a la seva naturalesa molecular.

Una de les funcions del VEGF descrita en cèl·lules neoplàssiques és autocrina . Observant característiques dels clons com els diferents patrons de creixement i aquestes diferències de concentracions de VEGF, hem contemplat la possibilitat de que expressin diferencialment receptors de creixement endotelial. Tenint com a referència que hi ha descrit tumors humans amb mutacions en K-Ras elevades que expressen VEGFR2 {Kim, 2005 #277} i tenint en compte els nostres propis resultats dels tumors de còlon i recte humans; hem analitzat l'expressió i l'activació d'aquest receptor en els clons NIH3T3 mutats *in vitro*. Els clons no expressen VEGFR2 ni el VEGF exerceix cap acció detectable sobre ells. Aquesta diferent producció de VEGF dels clons està afectant a la proliferació endotelial i no a la tumoral i ens pot explicar part de les diferències en el fenotip angiogènic. L'efecte directe del VEGF sobre la proliferació de les cèl·lules endotelials no l'hem pogut confirmar amb les mostres dels tumors subcutanis. Aquests tumors estan en un punt d'equilibri , d'expansió exponencial on la proliferació endotelial no depent només del VEGF. En els dos tipus de tumors les estratègies utilitzades són diferents però no per això més o menys eficients. Per tan no hem vist diferències de proliferació endotelial entre un tumor que expressi més o menys VEGF. Seria molt interessant determinar aquest factor de proliferació en les fases inicials del creixement tumoral on hem observat diferències i on la proliferació endotelial podria ser més dependent de VEGF. Ens donaria informació de com i quan comencen a realitzar nova vasculatura i podríem explicar en part les diferents latències tumorals *in vivo*.

Els tumors i les cèl·lules en cultiu amb la mutació ASP13 en el gen K-Ras sobreexpressen amb més quantitat el VEGF, essent evidents aquestes diferències a tots els nivells analitzats: immunohistoquímica , ELISA, Western i Northern blot. La producció d'aquest factor *in vivo*, especialment en els tumors amb mutació ASP13 no es pot atribuir de manera directa i completa a les cèl·lules tumorals. Aquests tumors s'han envoltat de macròfags que també són capaços de produir VEGF i altres factors angiogènics. Sense poder descartar el fet de que cada transfectant pugui provocar més o menys reacció immunològica, els macròfags semblen estar condicionant *in vivo* les diferències que hem descrit en aquests dos tipus de

tumors.(Barbera-Guillem, Nyhus et al. 2002) (Busund, Killie et al. 2002) A diferència de les cèl·lules amb mutació CYS12, les ASP13 han atret amb factors quimiotàctics, com podria ser el propi VEGF, aquesta població de macròfags que en general estan relacionats amb un augment del diàmetre vascular i vasos més madurs. (Duyndam, Hilhorst et al. 2002) Estudis anteriors descriuen la relació entre la sobre expressió del VEGF i el diàmetre dels vasos tumorals i el recobriment per cèl·lules murals. Són dues característiques que poden està en part determinades per l'expressió d'aquest factor de creixement endotelial. (Benjamin, Hemo et al. 1998; Larcher, Murillas et al. 1998; Drake and Little 1999; Carmeliet and Jain 2000). Altres factors pro i anti angiogènics poden contribuir a aquest fenotip. El descens de la expressió de TSP-1 en tots dos clons és compatible amb resultats previs amb transfectants Ras però no expliquen les diferències entre els dos clons ja que no hem trobat diferències d'expressió de TSP-1 entre les diferents transfectants *in vitro*. *In vivo* la expressió de TSP-1 ha estat indetectable per Western Blot, però no podem descartar que la sensibilitat de la tècnica no permeti evidenciar diferències biològicament rellevants. S'ha descrit una relació quimiotàctica entre alguns dominis proteïcs de TSP-1 i les cèl·lules musculars que expressen actina de la musculatura llisa vascular. (Lee, Nesselroth et al. 2003) Els nostres resultats suggereixen que els vasos d'aquests tumors no han utilitzat el suport de TSP-1 per formar-se i madurar. *In vitro* els clons CYS12 expressen més angiopoietina 1 i 4 que el clon ASP13. Hi ha una tendència a mantenir la diferència en els tumors subcutanis però l'heterogeneïtat la fa no tant evident. Ens manca determinar l'estat dels receptors TIEs en les cèl·lules endotelials de cada tipus tumoral per poder definir amb més detall les funcions d'aquestes angiopoietines en aquest model.No obstant es pot especular que aquest augment d'angiopoietines 1 i 4 promouria la remodelació, la maduració, augment de la via PI3K baixant l'apoptosi i l'estabilització dels vasos. Aquestes són les funcions més relacionades amb aquestes proteïnes quan actuen unir-se al receptor TIE2. Però la seva acció no és limitada a aquest receptor. També s'ha descrit que s'uneix a TIE1 sense poder definir la seva funció i sabem que els *knock out* d'angiopoietina 1 presenten fenotips iguals que els *knock out* de VEGF. (Davis, Aldrich et al. 1996). Potser en

les cèl·lules amb mutació CYS12 on hi ha menys expressió de VEGF, l'angiopoietina 1 està realitzant una activació de la migració endotelial (Kim, Ryu et al. 2002) que en els cas dels ASP13 està determinada per l'abundància de VEGF. En un tipus de tumor es produeix més proliferació i menys migració per efectes del VEGF (T-ASP13) i en l'altre més migració i menys proliferació per la cooperació del VEGF amb l'angiopoietina-1 (T-CYS12). (Lee, Cho et al. 2004; Cho, Kim et al. 2005; Saharinen, Kerkela et al. 2005).

Estudi de l'expressió de les MMPs i l'angiogènesi.

L'angiogènesi no és exclusivament dependent del que sempre s'ha classificat com a factors angiogènics (factors de creixement, quimiotàctics de comunicació, entre altres.) , sinó que en la balança de factors els mecanismes d'adhesió i proteolítics intervenen en gran mesura. (Heissig, Hattori et al. 2003) Per això es va creure molt interessant l'estudi de la producció de les MMPs, una de les famílies d'enzims proteolítics de la matriu extracel·lular més rellevants en tumorogènesi. La regulació d'aquests enzims està determinada en part per vies de transducció de senyal del gen K-Ras i és dependent del tipus cel·lular. (Campbell and Der 2004) Les proves formals de la implicació de les MMPs en l'estimulació de l'angiogènesi en cèl·lules que expressen Ras oncogènic són escasses . MMP9 i MMP2 són les metaloproteïnases més relacionades directament amb el K-Ras mutat o sobreexpressat. (Kranenburg, Gebbink et al. 2004).

MMP9 i MMP7

La MMP9 i la MMP7 només han estat detectades en els tumors subcutanis *in vivo* dels clons transfectats amb diferents mutacions de K-Ras i en els carcinomes colorectals humans. Els estudis realitzats fins ara relacionen la MMP9 amb alliberació de factors angiogènics, (Rodriguez-Manzanares, Lane et al. 2001), la promoció del reclutament de cèl·lules SMA positives (Chantrain, Shimada et al. 2004) i està implicada en la formació de branques dels capil·lars. (Johnson, Sung et al. 2004). Les funcions de la MMP7 estan relacionades amb

l'estimul·lació de citoquines, factors de creixement com el VEGF, i la proliferació i invasió tumoral en general. (Wang, Wang et al. 2005). Està demostrat que la MMP7 activa és capaç d'induir i accelerar la proliferació endotelial i la inducció a l'apoptosi d'altres tipus cel·lulars. (Powell, Fingleton et al. 1999; Huo, Ichikawa et al. 2002).

L'associació de la mutació en el codó 13 (ASP13) en gen K-Ras i la sobreexpressió de MMP9 i MMP7 és molt més significativa que en la mutació en el codó 12 (CYS12) tant en els inòculs dels transfectants com en els tumors colorectals humans. En una sèrie de pocs tumors humans de còlon i recte hem pogut comprovar que els mutats en K-Ras ASP13 expressen més MMP9 que la resta de casos amb altres mutacions. El fet de que les dues MMPs no es detectin en els cultius cel·lulars ens determina que la seva expressió depèn de cèl·lules no tumorals, inflamatòries o endotelials. (Coussens, Tinkle et al. 2000) (Huang, Van Arsdall et al. 2002). En el model *in vivo* l'augment és produït en els tumors amb K-Ras ASP13 on s'observen gran quantitat de macròfags. Reforçant les teories de l'expressió de MMP9 i MMP7 per les cèl·lules acompanyants, en els tumors CYS12 no localitzem macròfags i hi ha poca o nul·la expressió d'aquestes proteïnes. L'expressió de MMP7 per part de macròfags s'ha condicionat en altres estudis a la pressió d'oxigen; de manera que un augment de la hipòxia indueix a l'expressió. (Burke, Giannoudis et al. 2003) La importància de les cèl·lules acompanyants inflamatòries i altres en el procés de desenvolupament tumoral és clara (Pollard 2004). (Wyckoff, Wang et al. 2004) , i són les mateixes cèl·lules tumorals les que sintetitzen els factors que atrauen aquestes cèl·lules. S'ha descrit que el VEGF pot realitzar aquesta funció quimiotàctica pels macròfags/monòcits i cèl·lules inflamatòries circulants. (Lewis, Landers et al. 2000; Barbera-Guillem, Nyhus et al. 2002; Duyndam, Hilhorst et al. 2002). Fins i tot hi ha estudis que determinen l'existència d'híbrids de fusió cel·lular espontània entre cèl·lules tumorals i macròfags que augmenten la capacitat angiogènica del tumors i li donen avantatges de creixement i invasió. En els tumors subcutanis amb mutació ASP13 quedaria per determinar si les cèl·lules marcades amb anti-F4/80 podrien ser híbrids de cèl·lules tumorals i macròfags. (Busund, Killie et al. 2002). El que no està encara del tot clar és que aquesta MMP7 estigui

induint més proliferació endotelial en els ASP13 respecte dels CYS12 que no l'expressen. Només hem pogut observar aquest fenomen en el punt final del creixement però no podem descartar que pugui realitzar aquestes funcions en altres moments més significatius com a l'inici del desenvolupament tumoral.

MMP2, TIMP-2 I MMP14

Els transfectants i els tumors subcutanis amb mutació CYS12 sobreexpressen MMP2 activa i els tumors ASP13 sobreexpressen MMP14 i TIMP-2 però no MMP2 activa. Per tan l'activació de la MMP2 en aquests model no està clarament determinada pel mecanisme que va descriure Sato l'any 1996 a través de la MMP14. Les condicions d'hipòxia afavoreixen l'activació de MMP2 independentment de MMP14 i TIMP-2 i promou que es patrocini la migració endotelial. (Ben-Yosef, Miller et al. 2005) L'augment de la migració endotelial podria explicar en part el major número de vasos de menys diàmetre. Per altra banda, l'expressió de KI67 no denota que promogui l'apoptosi endotelial. S'ha descrit que TIMP-2 disminueix la proliferació endotelial induïda per VEGF i ens podria donar explicació d'aquest punt final de creixement tumoral dels clons ASP13. Aquests tumors tenen un gran augment de producció de VEGF però la seva proliferació endotelial no és major que els tumors CYS12. L'acció del TIMP-2 podria estar explicant en part la menor eficiència del VEGF. (Seo, Li et al. 2003; Terasaki, Kanzaki et al. 2003; Oh, Seo et al. 2004). Per altra banda aquests tumors *in vivo* amb mutació ASP13 sobreexpressen MMP14. S'ha demostrat que MMP14 independent de MMP2 potencia el creixement tumoral i angiogènic i indueix a l'alliberació de VEGF. En els tumors ASP13 aquesta metaloproteïna actua potenciant aquests fenòmens. (Deryugina, Soroceanu et al. 2002).

Estudi de la densitat vascular i la detecció de VEGFR2 en carcinomes colorectals humans.

Aquestes diferències observades en els tumors humans no sempre han estat confirmades en els tumors humans. En la literatura hi ha molts estudis que determinen la densitat vascular en diferents neoplàsies utilitzant diferents mètodes i amb diversitat de resultats. (Kreuter, Bieker et al. 2004) (Saad, Liu et al. 2004) (Gontero, Banisadr et al. 2004). El diferents

marcatges, la diversitat de criteris per definir els camps i com comptar-los poden ser responsables de les discrepàncies en els resultats obtinguts. Fins i tot hi ha estudis dedicats a mesurar aquesta possible diversitat. (Uzzan, Nicolas et al. 2004) Hem marcat l'endoteli amb CD31, aquesta proteïna ens assenyalava les unions entre cèl·lules i està implicada en la migració transendotelial dels leucòcits, l'activació d'integrines i en processos angiogènics en general. La mutació del gen K-Ras no sembla està molt directament relacionada amb el número de vasos sanguinis CD31 positius que podem comptar en un camp del microscopi. Ni quan separem els tumors en dos grans grups amb o sense mutació en el gen K-Ras ni quan comparem les dades entre els grups de les diferents mutacions. Tampoc hem trobat relació entre la densitat vascular i la supervivència a la malaltia. La gran quantitat de factors que determina aquest paràmetre en els tumors humans, enmascara l'efecte que pot arribar a tenir la mutació puntual de K-Ras observat en altres sistemes molt més controlats, com en el model *in vivo* dels transfectants NIH3T3. En el cas dels tumors colorectals ens podríem plantejar de realitzar en comptatge de vasos amb un marcatge de molècules més informatives. L'endoglina CD105 és una glicoproteïna homodimèrica de membrana que és pot localitzar en endotelis, perieritroblast i monòcits activats entre altres. És un lligant del receptor TGFβ1 i està més expressada en els endotelis tumorals que no pas CD31. En la literatura els estudis amb CD31 i càncer colorectal (Maeda, Chung et al. 1996; Abdalla, Behzad et al. 1999) són més heterogenis en els resultats de correlació amb el pronòstic que no pas els realitzats amb CD105. (Li, Gardy et al. 2003) Un canvi en els marcatges de vasos en aquests sentit seria en base a determinar més característiques d'aquests vas. En aquest major coneixement que requereixen els sistemes més complicats l'estudi dels factors que determinen aquest patró de vasos és molt important. El VEGF ha estat el factor amb més diferències en el model de les diferents mutacions en K-Ras. Vàrem iniciar l'estudi d'aquests factor en els tumors humans que vam haver d'abandonar per no ser capaços d'obtenir resultats convincents en mostres fixades i parafinades. Desconeixem l'estat del VEGF en aquests tumors però hem analitzat l'expressió de VEGFR2 en les cèl·lules tumorals i en les endotelials. La detecció d'aquest receptor en les cèl·lules

vasculars per immunohistoquímica és molt fluixa i no hi ha diferències significatives entre els tumors. Per altra banda hem detectat el receptor dos del VEGF en les cèl·lules tumorals. Sugerint d'aquesta manera que pot existir un efecte autocrí en la funció del VEGF. La manca de resultats amb el VEGF impedeix confirmar-ho. La correlació més important que hem pogut demostrar és el fet de que els tumors amb mutació en el gen K-Ras, tenen més alta probabilitat d'expressar el receptor en les cèl·lules tumorals, però no hi ha diferències entre les diferents mutacions del gen. L'expressió d'aquest receptor depent en gran part de la hipòxia . De manera que podem especular que K-Ras pot condicionar la dependència de les cèl·lules tumorals a la hipòxia, determinant l'expressió del VEGF i indirectament la del VEGFR2. La relació estadística que determinem entre la mutació del K-Ras en general i l'expressió del receptor podria ser interpretada a través de la hipòxia i l'expressió del VEGF. L'aprofundiment de l'estudi del VEGF i els seus receptors junt amb la resta de factors de la balança angiogènica podria aportar-nos més informació dels tumors colorectal i aproximar-nos a trobar les diferències entre les diferents mutacions del K-Ras que hem observat en el model *in vivo*.

Consideracions

K-Ras pot promoure fenotips angiogènics diferencialment depent de la mutació puntual específica en un model tumoral de clons NIH3T3. En aquest model han estat descrites característiques diferencials entre les mutacions en el codó 13 (ASP13) i el codó 12 (CYS12) que poden influir en el procés tumoral per mitjà de diferents mecanismes com ara: la resistència a l'apoptosi, la capacitat d'eludir l'inhibició per contacte i el metabolisme. Els clons amb la mutació de K-Ras CYS12 tenen un augment en l'expressió d'Akt , BCL-2 i altres components, que li donen un fenotip de major resistència a l'apoptosi en absència d'adhesió al substrat respecte el clon amb mutació ASP13 en el gen K-Ras. (Guerrero, Casanova et al. 2000). Aquesta diferent capacitat cel·lular podria influir en escurçar la latència del creixement de l'inòcul. L'expressió de K-Ras o de Ras en general està associada al metabolisme

dels glúcids, a la dels lípids i fins i tot al metabolisme dels nucleòtids. (Erdman, Shellenberger et al. 2000). Els estudis *in vitro* en els transfectans NIH3T3 evidencien que el clon ASP13 augmenta la glicòlisi oxidativa per la via de les pentoses fosfats i la del piruvat deshidoxigenasa mentre que en els clons CYS12, la síntesi d'àcids nuclèics i lípids per aquestes vies oxidatives funciona més lentament. {Vizan, 2005 #190}. D'aquesta manera, els clons ASP13 augmenten la seva dependència de l'oxigen i els nutrients, característica que podria contribuir a la més llarga latència del creixement d'aquest clon. Molts estudis han demostrat que la capacitat angiogènica es determina en els estadiatges inicial del creixement tumoral, per tan pensem que l'estudi d'aquestes etapes inicials és molt important. El nostre coneixement d'aquestes cèl·lules ens fa definir dues possibles hipòtesis per explicar aquestes etapes: 1.- Les diferències entre els clons provoquen que l'estrès de l'inòcul provoqui la mort cel·lular de manera diferencial entre els diferents clons. Així doncs, les cèl·lules ASP13 resistirien menys l'estrès i en les primeres etapes d'adaptació perden un elevat percentatge de cèl·lules comparat amb el clon CYS12 de manera que l'inici del creixement tumoral podria anar per darrera. 2.- Les diferents necessitats metabòliques dels clons provoquen que l'inici sigui diferencial. Les cèl·lules CYS12 podrien començar la proliferació més ràpidament per tenir menys requeriments de pressions d'oxigen i nutrients que les cèl·lules ASP13 i per tant serien menys dependents del nou microambient que reorganitzen. Trobar els punts on es comencen a produir factors angiogènics seria una bona prioritat per estudis futurs. Ara hem definit una balança molt decantada per VEGF en un estat d'expansió tumoral, però observar la situació de la balança en els estadis inicials podria determinar millor les estratègies seguides en cada cas.

Aquest model tumoral ens aporta una balança angiogènica diferent en cada tipus de mutació en K-Ras. Sembla que el VEGF té un pes important en la diferenciació dels dos casos però no descartem la importància de la no presència de TSP-1 i el paper que poden estar realitzant les angiopoietines. Encara no hem acabat de treballar amb aquestes proteïnes, creiem que poden estar realitzant un paper molt important, especialment definint el fenotip del clon CYS12. Per

acabar de determinar la importància del VEGF i les angiopoietines pensem realitzar inòculs subcutanis sota el tractament de teràpies amb anticossos contra VEGF o contra elements de les vies d'actuació de les angiopoietines. També ens manca definir els mecanismes moleculars pels quals K-Ras amb una mutació o altra acaba desenvolupant un o altre patró angiogènic i com altres característiques que determina K-Ras poden influenciar influir en les diferències observades. Treballar amb fibroblastes transformats i només amb un dels clons ens allunya en certa manera de la realitat neoplàssica tumoral humana però ens apropa molt a la dependència del fenotip de les mutacions puntuals. Els tumors humans estan formats per diferents clons que evolucionen i es seleccionen; el nostre model es podrà extrapolar en més èxit en aquells tumors on el clon seleccionat estigui el més a prop possible del fenotip d'experimentació. Trobar fins a quin punt els resultats *in vitro* i *in vivo* es poden observar en una sèrie de tumors humans ens pot ajudar a determinar l'aport d'aquesta informació al diagnòstic, al pronòstic i a la realització de futures teràpies. L'estructura del vas pot influir en la resposta a la teràpia i en la possibilitat de realitzar metastasi d'aquesta cèl·lula tumoral.

CONCLUSIONS

- 1.- Les mutacions CYS12 i ASP13 del gen K-Ras comporten diferències importants en el patró vascular observat en un model d'inòculs subcutanis de NIH3T3 transfectades amb K-Ras mutat. Aquestes diferències s'associen a una diferent expressió de VEGF i d'algunes metaloproteases com MMP9 i MMP2.
- 2.- Algunes de les diferències observades en el model experimental com la sobreexpressió de MMP9, es poden confirmar en tumors humans.
- 3.- El model d'inòculs subcutanis de NIH3T3 transfectades amb K-Ras mutat podria ser un bon model per estudiar les estratègies angiogèniques de la cèl·lula tumoral i per l'avaluació de les estratègies adreçades contra la vasculatura tumoral.

abreviatures i símbols



5-FU	5 Fluorouracil
aa	Aminoàcids
AP 1 o 2	Proteïna activadora 1 o 2
APMA	Acetat p- aminofenilmercuric
APS	Persulfat d'amoni
ASP13	Mutació aspàrtic en el codó 13 del gen K-Ras
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina de sèrum boví
CYS12	Mutació cisteïna en el codó 12 del gen K-Ras
DE	Desviació estàndard
DFS	Supervivència lliure de malaltia
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Àcid Nuclèic Desoxi Ribosa
END	Cèl·lules endotelials
ES	Error estàndard
FSB	Sèrum fetal boví
G418	Geneticina 418
HP	Heparan sulfat
HUVEC	Cèl·lules endotelials del cordó umbilical
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Quilodaltos
MMP/ MMPs	Metaloproteïnasa/es
MOPS	3-(N-Morfí) àcid propanolè-sulfònic
MVD	Densitat vascular microscòpica
NEO	Neomicina
nm	Nanòmetres
OS	Supervivència global
PBS	Tampó fosfats
PECAM	Molècula d'adhesió plaquetària en les cèl·lules endotelials .
PMSF	Fenil Sulfonil Fluorídric
Ponce S.	3-Hidroxi-4-(2-sulfo-4-penilazo)-2,7-Naftalè disulfúric àcid
PVDF	Fluorat de Polivinil-lidene
PVP	Polivinil pirrolidona
r.p.m.	Revolucions per minut
RNA	Àcid Nuclèic Ribosa
SSCP	Simple Stain
T.A.	Temperatura ambient
T75	Flascó de cultiu cel·lular amb una superfície de 75 cm ² .
T-ASP13	Tumors subcutanis a partir dels clons amb mutació en el codó 13 del gen K-Ras. La mutació comporta el canvi de glicina a aspàrtic.

TBS	Tampó de TRIS
T-CYS12	Tumors subcutanis a partir dels clons amb mutació en el codó 12 del gen K-Ras. La mutació comporta el canvi de glicina a cisteïna.
TEMED	N,N,N,N Tetrametil etilèdiamina
TIMP-2	Inhibidor de les metaloproteinases en els teixits.
TSP-1	Trombospondina-1
VEGF	Factor vascular de creixement endotelial
α -SMA	Alfa actina del múscul llis

referències



- Abdalla, S. A., F. Behzad, et al. (1999). "Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours." *Oncol Rep* **6**(4): 839-42.
- Acker, T. and K. H. Plate (2002). "A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology." *J Mol Med* **80**: 562-75.
- Adams, J. C. (1997). "Thrombospondin-1." *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 861-5.
- Akiri, G., D. Nahari, et al. (1998). "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription." *Oncogene* **17**: 227-36.
- Alessi, P., C. Ebbinghaus, et al. (2004). "Molecular targeting of angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1654**: 39-49.
- Al-Mulla, F. and E. M. MacKenzie (2001). "Differences in in vitro invasive capacity induced by differences in Ki-Ras protein mutations." *J Pathol* **195**(5): 549-56.
- Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. (2001). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." *Br J Cancer* **85**(5): 692-6.
- Andreyev, H. J., A. R. Norman, et al. (1998). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter 'RASCAL' study." *J Natl Cancer Inst* **90**(9): 675-84.
- Ascierto, P. A., E. Leonardi, et al. (2004). "Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients: a pilot study." *Anticancer Res* **24**: 4255-8.
- Audero, E., I. Cascone, et al. (2004). "Adaptor ShcA protein binds tyrosine kinase Tie2 receptor and regulates migration and sprouting but not survival of endothelial cells." *J Biol Chem* **279**: 13224-33.
- Bando, H., H. A. Weich, et al. (2005). "Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer." *Br J Cancer* **92**: 553-61.
- Barbera-Guillem, E., J. K. Nyhus, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process." *Cancer Res* **62**: 7042-9.
- Barkhordari, A., R. W. Stoddart, et al. (2004). "Lectin histochemistry of normal human lung." *J Mol Histol* **35**(2): 147-56.
- Barr, L. F., S. E. Campbell, et al. (2000). "c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Res* **60**: 143-9.
- Bartsch, D., D. Bastian, et al. (1998). "K-ras oncogene mutations indicate malignancy in cystic tumors of the pancreas." *Ann Surg* **228**(1): 79-86.
- Bein, K. and M. Simons (2000). "Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity." *J Biol Chem* **275**: 32167-73.

- Benjamin, L. E., I. Hemo, et al. (1998). "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF." *Development* **125**: 1591-8.
- Ben-Yosef, Y., A. Miller, et al. (2005). "Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(5): C1321-31.
- Bergers, G., R. Brekken, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." *Nat Cell Biol* **2**: 737-44.
- Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." *Neuro-oncol* **7**(4): 452-64.
- Bies, C., C. M. Lehr, et al. (2004). "Lectin-mediated drug targeting: history and applications." *Adv Drug Deliv Rev* **56**: 425-35.
- Blancher, C., J. W. Moore, et al. (2001). "Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway." *Cancer Res* **61**(19): 7349-55.
- Bondy, G. P., S. Wilson, et al. (1985). "Experimental metastatic ability of H-ras-transformed NIH3T3 cells." *Cancer Res* **45**: 6005-9.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res* **49**: 4682-9.
- Bos, J. L., D. Toksoz, et al. (1985). "Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia." *Nature* **315**: 726-30.
- Brattstrom, D., M. Bergqvist, et al. (2004). "Serum VEGF and bFGF adds prognostic information in patients with normal platelet counts when sampled before, during and after treatment for locally advanced non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **43**: 55-62.
- Burke, B., A. Giannoudis, et al. (2003). "Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy." *Am J Pathol* **163**: 1233-43.
- Busund, L. T., M. K. Killie, et al. (2002). "Spontaneously formed tumorigenic hybrids of Meth A sarcoma and macrophages grow faster and are better vascularized than the parental tumor." *Int J Cancer* **100**: 407-13.
- Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)." *J Cell Mol Med* **9**(4): 777-94.
- Camins, A., C. Gabriel, et al. (1998). "Flow cytometric study of mitochondrial dysfunction after AMPA receptor activation." *J Neurosci Res* **52**: 684-90.
- Campbell, P. M. and C. J. Der (2004). "Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis." *Semin Cancer Biol* **14**: 105-14.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**: 249-57.

- Chan, R. J., M. B. Leedy, et al. (2005). "Human somatic PTPN11 mutations induce hematopoietic-cell hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **105**(9): 3737-42.
- Chantrain, C. F., H. Shimada, et al. (2004). "Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment." *Cancer Res* **64**: 1675-86.
- Cho, C. H., K. E. Kim, et al. (2005). "Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow." *Circ Res* **97**: 86-94.
- Christopherson, K. S., E. M. Ullian, et al. (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." *Cell* **120**: 421-33.
- Connolly, D. T., D. M. Heuvelman, et al. (1989). "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis." *J Clin Invest* **84**: 1470-8.
- Cooper, C. S., P. R. Tempest, et al. (1986). "Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts." *Embo J* **5**: 2623-8.
- Coussens, L. M., C. L. Tinkle, et al. (2000). "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis." *Cell* **103**: 481-90.
- Dales, J. P., S. Garcia, et al. (2003). "Tie2/Tek expression in breast carcinoma: correlations of immunohistochemical assays and long-term follow-up in a series of 909 patients." *Int J Oncol* **22**: 391-7.
- Dameron, K. M., O. V. Volpert, et al. (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." *Science* **265**: 1582-4.
- Daneva, T., E. Spinedi, et al. (1995). "Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in Swiss nude athymic mice." *Neuroendocrinology* **62**: 79-86.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." *Cell* **87**: 1161-9.
- De Vita, F., M. Orditura, et al. (2004). "Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma." *Cancer* **100**: 270-8.
- DeBusk, L. M., D. E. Hallahan, et al. (2004). "Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway." *Exp Cell Res* **298**: 167-77.
- Deryugina, E. I., L. Soroceanu, et al. (2002). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis." *Cancer Res* **62**: 580-8.
- Dhanabal, M., M. Jeffers, et al. (2005). "Anti-angiogenic therapy as a cancer treatment paradigm." *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **5**: 115-30.
- Dong, Z., R. Kumar, et al. (1997). "Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma." *Cell* **88**: 801-10.
- Donnini, S., L. Morbidelli, et al. (2004). "ERK1-2 and p38 MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium." *Life Sci* **74**: 2975-85.

- Dowell, J. E., R. H. Amirkhan, et al. (2004). "Survival in small cell lung cancer is independent of tumor expression of VEGF and COX-2." Anticancer Res **24**: 2367-73.
- Downward, J. (1997). "Cell cycle: Routine role for Ras." Current Biology **7**: 258 - 260.
- Drake, C. J. and C. D. Little (1999). "VEGF and vascular fusion: implications for normal and pathological vessels." J Histochem Cytochem **47**: 1351-6.
- Duyndam, M. C., M. C. Hilhorst, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts." Am J Pathol **160**: 537-48.
- Eberhard, A., S. Kahlert, et al. (2000). "Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies." Cancer Res **60**: 1388-93.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**: 161-74.
- Eliceiri, B. P. and D. A. Cheresh (1999). "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development." J Clin Invest **103**: 1227-30.
- Erdman, R. A., K. E. Shellenberger, et al. (2000). "Rab24 is an atypical member of the Rab GTPase family. Deficient GTPase activity, GDP dissociation inhibitor interaction, and prenylation of Rab24 expressed in cultured cells." J Biol Chem **275**: 3848-56.
- Feig, L. A., T. Urano, et al. (1996). "Evidence for a Ras/Ral signaling cascade." Trends Biochem Sci **21**(11): 438-41.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**: 851-8.
- Fiedler, U., M. Scharpfenecker, et al. (2004). "The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies." Blood **103**: 4150-6.
- Finkelstein, S. D., R. Sayegh, et al. (1993). "Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis." Arch Surg **128**: 526-31; discussion 531-2.
- Fleming, R. Y., L. M. Ellis, et al. (1997). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon carcinoma cells by activity of src kinase." Surgery **122**(2): 501-7.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Angiogenic factors." Science **235**: 442-7.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Vascular physiology. A family of angiogenic peptides." Nature **329**: 671-2.
- Gahtan, V., X. J. Wang, et al. (1999). "Thrombospondin-1 regulation of smooth muscle cell chemotaxis is extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 dependent." Surgery **126**: 203-7.

- Gale, N. W., G. Thurston, et al. (2002). "Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1." Dev Cell **3**: 411-23.
- Gan, L., M. Miocic, et al. (2000). "Distinct regulation of vascular endothelial growth factor in intact human conduit vessels exposed to laminar fluid shear stress and pressure." Biochem Biophys Res Commun **272**: 490-6.
- Gerber, H. P., F. Condorelli, et al. (1997). "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." J Biol Chem **272**: 23659-67.
- Gille, J., R. A. Swerlick, et al. (1997). "Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation." Embo J **16**: 750-9.
- Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, et al. (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." Nature **389**(6646): 77-81.
- Gontero, P., S. Banisadr, et al. (2004). "Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations." Eur Urol **46**: 296-311.
- Good, D. J., P. J. Polverini, et al. (1990). "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 6624-8.
- Grady, W. M. and S. D. Markowitz (2002). "Genetic and epigenetic alterations in colon cancer." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 101-28.
- Granger, B. L. and E. Lazarides (1979). "Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc." Cell **18**(4): 1053-63.
- Gray, M. J., J. S. Wey, et al. (2005). "Neuropilin-1 suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors." Cancer Res **65**(9): 3664-70.
- Gross, J. (2004). "How tadpoles lose their tails: path to discovery of the first matrix metalloproteinase." Matrix Biol **23**(1): 3-13.
- Guerra, C., N. Mijimolle, et al. (2003). "Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context." Cancer Cell **4**(2): 111-20.
- Guerrero, S., I. Casanova, et al. (2000). "K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression." Cancer Res **60**: 6750-6.
- Guerrero, S., A. Figueras, et al. (2002). "Codon 12 and codon 13 mutations at the K-ras gene induce different soft tissue sarcoma types in nude mice." Faseb J **16**: 1642-4.
- Hata, K., K. Nakayama, et al. (2004). "Expression of the angopoietin-1, angopoietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol **93**: 215-22.
- Heissig, B., K. Hattori, et al. (2003). "Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases." Curr Opin Hematol **10**: 136-41.

- Herbert, T. P., A. R. Tee, et al. (2002). "The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites." J Biol Chem **277**(13): 11591-6.
- Hiramatsu, A., H. Miwa, et al. (2006). "Disease-specific expression of VEGF and its receptors in AML cells: possible autocrine pathway of VEGF/type1 receptor of VEGF in t(15;17) AML and VEGF/type2 receptor of VEGF in t(8;21) AML." Leuk Lymphoma **47**(1): 89-95.
- Hlatky, L., P. Hahnfeldt, et al. (2002). "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us." J Natl Cancer Inst **94**: 883-93.
- Hsieh, C. Y., C. A. Chen, et al. (2004). "Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis." J Biomed Sci **11**: 249-59.
- Huang, S., M. Van Arsdall, et al. (2002). "Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice." J Natl Cancer Inst **94**: 1134-42.
- Hughes, S. and T. Chan-Ling (2004). "Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(8): 2795-806.
- Huo, N., Y. Ichikawa, et al. (2002). "MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells." Cancer Lett **177**: 95-100.
- Hyder, S. M., J. C. Huang, et al. (2000). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins." Environ Health Perspect **108 Suppl 5**: 785-90.
- Iivanainen, E., L. Nelimarkka, et al. (2003). "Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor." Faseb J **17**: 1609-21.
- Ince, W. L., A. M. Jubb, et al. (2005). "Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab." J Natl Cancer Inst **97**: 981-9.
- Iruela-Arispe, M. L., P. Porter, et al. (1996). "Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium." J Clin Invest **97**: 403-12.
- Ito, T., M. Ito, et al. (1999). "Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor." Mod Pathol **12**: 669-74.
- Jimenez, B., O. V. Volpert, et al. (2000). "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1." Nat Med **6**: 41-8.
- Johnson, C. and Z. S. Galis (2004). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**: 54-60.
- Johnson, C., H. J. Sung, et al. (2004). "Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching." Circ Res **94**: 262-8.

- Jones, N. and D. J. Dumont (1998). "The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R." Oncogene **17**: 1097-108.
- Jurek, D., N. Udilova, et al. (2005). "Dietary lipid hydroperoxides induce expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal tumor cells." Faseb J **19**: 97-9.
- Kahn, S., F. Yamamoto, et al. (1987). "The c-K-ras gene and human cancer (review)." Anticancer Res **7**: 639-52.
- Kaio, E., S. Tanaka, et al. (2003). "Clinical significance of thrombospondin-1 expression in relation to vascular endothelial growth factor and interleukin-10 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma." Int J Oncol **23**(4): 901-11.
- Kallio, P. J., I. Pongratz, et al. (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 5667-72.
- Kanayama, H., K. Yokota, et al. (1998). "Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer." Cancer **82**: 1359-66.
- Kanda, K., M. Takahashi, et al. (2000). "The role of the activated form of matrix metalloproteinase-2 in urothelial cancer." BJU Int **86**: 553-7.
- Kim, I., Y. S. Ryu, et al. (2002). "EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells." Faseb J **16**: 1126-8.
- Klump, B., O. Nehls, et al. (2004). "Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data and review of the literature." Int J Colorectal Dis **19**(1): 23-42.
- Kranenburg, O., M. F. Gebbink, et al. (2004). "Stimulation of angiogenesis by Ras proteins." Biochim Biophys Acta **1654**: 23-37.
- Kreuter, M., R. Bieker, et al. (2004). "Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma." Clin Cancer Res **10**: 8531-7.
- Lambert, V., B. Wielockx, et al. (2003). "MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization." Faseb J **17**: 2290-2.
- Lammert, E., O. Cleaver, et al. (2001). "Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels." Science **294**: 564-7.
- Larcher, F., R. Murillas, et al. (1998). "VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development." Oncogene **17**: 303-11.
- Lee, H. J., C. H. Cho, et al. (2004). "Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4." Faseb J **18**: 1200-8.
- Lee, T., N. Esemuede, et al. (2003). "Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells." J Vasc Surg **38**: 147-54.

- Lee, T., S. M. Nesselroth, et al. (2003). "Thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell chemotaxis: the role of the type 3 repeat and carboxyl terminal domains." J Cell Biochem **89**: 500-6.
- Lewis, J. S., R. J. Landers, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas." J Pathol **192**: 150-8.
- Li, C., R. Gardy, et al. (2003). "Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis." Br J Cancer **88**(9): 1424-31.
- Lin, R., R. A. Cerione, et al. (1999). "Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation." J Biol Chem **274**: 23633-41.
- Linderholm, B., E. Karlsson, et al. (2004). "Thrombospondin-1 expression in relation to p53 status and VEGF expression in human breast cancers." Eur J Cancer **40**(16): 2417-23.
- Linderholm, B. K., T. Lindahl, et al. (2001). "The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer." Cancer Res **61**: 2256-60.
- Loges, S., G. Heil, et al. (2005). "Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival." J Clin Oncol **23**(6): 1109-17.
- Loughna, S. and T. N. Sato (2001). "Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development." Matrix Biol **20**: 319-25.
- Maeda, K., Y. S. Chung, et al. (1996). "Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma." Cancer **77**(5): 858-63.
- Maeta, H., S. Ohgi, et al. (2001). "Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas." Virchows Arch **438**: 121-8.
- Masood, R., J. Cai, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors." Blood **98**(6): 1904-13.
- Mettouchi, A., F. Cabon, et al. (1994). "SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts." Embo J **13**(23): 5668-78.
- Milanini-Mongiati, J., J. Pouyssegur, et al. (2002). "Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription." J Biol Chem **277**: 20631-9.
- Nakano, H., F. Yamamoto, et al. (1984). "Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(1): 71-5.
- Nikkola, J., P. Vihinen, et al. (2002). "High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma." Int J Cancer **97**: 432-8.

- Nisato, R. E., G. Hosseini, et al. (2005). "Dissecting the role of matrix metalloproteinases (MMP) and integrin alpha(v)beta3 in angiogenesis in vitro: absence of hemopexin C domain bioactivity, but membrane-Type 1-MMP and alpha(v)beta3 are critical." Cancer Res **65**(20): 9377-87.
- Ochiumi, T., S. Tanaka, et al. (2004). "Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma." Int J Oncol **24**: 539-47.
- Ogawa, E., K. Takenaka, et al. (2004). "Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients." Br J Cancer **91**: 498-503.
- Oh, J., D. W. Seo, et al. (2004). "Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK." Cancer Res **64**(24): 9062-9.
- Ohyama, C., S. Kanto, et al. (2002). "Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 13789-94.
- Okada, K., T. Satoh, et al. (2004). "Interaction between morphology and angiogenesis in human early colorectal cancers." Pathol Int **54**: 490-7.
- Oliva, J. L., N. Zarich, et al. (2004). "The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras." J Biol Chem **279**(32): 33480-91.
- Ozderdem, U. and W. B. Stallcup (2003). "Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation." Angiogenesis **6**(3): 241-9.
- Pages, G., E. Berra, et al. (2000). "Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability." J Biol Chem **275**(34): 26484-91.
- Pages, G. and J. Pouyssegur (2005). "Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene-a concert of activating factors." Cardiovasc Res **65**: 564-73.
- Papathoma, A. S., C. Petraki, et al. (2000). "Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer." Anticancer Res **20**: 2009-13.
- Passlick, B., W. Siel, et al. (2000). "Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **6**: 3944-8.
- Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." Nat Rev Cancer **4**: 71-8.
- Poon, R. T., J. W. Ho, et al. (2004). "Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma." Br J Surg **91**: 1354-60.
- Powell, W. C., B. Fingleton, et al. (1999). "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis." Curr Biol **9**: 1441-7.
- Qi, J. H., Q. Ebrahim, et al. (2003). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and Sorsby fundus dystrophy." Adv Exp Med Biol **533**: 97-105.

- Qian, X., V. L. Rothman, et al. (2001). "Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production." Pathol Oncol Res **7**: 251-9.
- Rak, J., Y. Mitsushashi, et al. (1995). "Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis." Cancer Res **55**: 4575-80.
- Rak, J., Y. Mitsushashi, et al. (2000). "Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts." Cancer Res **60**: 490-8.
- Rak, J. and J. L. Yu (2004). "Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"." Semin Cancer Biol **14**: 93-104.
- Ramnath, N. and P. J. Creaven (2004). "Matrix metalloproteinase inhibitors." Curr Oncol Rep **6**: 96-102.
- Ribatti, D. (2005). "The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review." Br J Haematol **128**: 303-9.
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (2000). "The discovery of angiogenic factors: a historical review." Gen Pharmacol **35**: 227-31.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**: 671-4.
- Rivard, A., L. Berthou-Soulie, et al. (2000). "Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity." J Biol Chem **275**: 29643-7.
- Rodriguez-Manzanique, J. C., T. F. Lane, et al. (2001). "Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 12485-90.
- Rutter, J. L., T. I. Mitchell, et al. (1998). "A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription." Cancer Res **58**: 5321-5.
- Saad, R. S., Y. L. Liu, et al. (2004). "Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer." Mod Pathol **17**: 197-203.
- Saharinen, P., K. Kerkela, et al. (2005). "Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2." J Cell Biol **169**: 239-43.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1996). "Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." FEBS Lett **385**: 238-40.
- Scharpfenecker, M., U. Fiedler, et al. (2005). "The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism." J Cell Sci **118**: 771-80.

- Schmalfeldt, B., D. Prechtel, et al. (2001). "Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer." Clin Cancer Res **7**: 2396-404.
- Schultz-Cherry, S., H. Chen, et al. (1995). "Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1." J Biol Chem **270**: 7304-10.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J **9**(9): 726-35.
- Seko, Y., K. Tobe, et al. (1996). "Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Src family tyrosine kinases and p21ras in cultured rat cardiac myocytes." Biochem Biophys Res Commun **226**(2): 530-5.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**: 983-5.
- Seo, D. W., H. Li, et al. (2003). "TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism." Cell **114**(2): 171-80.
- Sheen, I. S., K. S. Jeng, et al. (2005). "Clinical significance of the expression of isoform 165 vascular endothelial growth factor mRNA in noncancerous liver remnants of patients with hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **11**: 187-92.
- Shibata, D., J. Schaeffer, et al. (1993). "Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas." J Natl Cancer Inst **85**(13): 1058-63.
- Slaton, J. W., R. Millikan, et al. (2004). "Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy." J Urol **171**: 570-4.
- Sloan, S. R., E. W. Newcomb, et al. (1990). "Neutron radiation can activate K-ras via a point mutation in codon 146 and induces a different spectrum of ras mutations than does gamma radiation." Mol Cell Biol **10**: 405-8.
- Sodhi, A., S. Montaner, et al. (2001). "MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 292-300.
- Song, S., A. J. Ewald, et al. (2005). "PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival." Nat Cell Biol **7**(9): 870-9.
- Sounni, N. E., L. Devy, et al. (2002). "MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression." Faseb J **16**: 555-64.
- Soussi, T. and G. Lozano (2005). "p53 mutation heterogeneity in cancer." Biochem Biophys Res Commun **331**: 834-42.
- Stavropoulos, N. E., C. Bouropoulos, et al. (2004). "Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer." Int Urol Nephrol **36**: 163-7.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention." J Clin Invest **103**: 1237-41.

- Stoner, M., M. Wormke, et al. (2004). "Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins." *Oncogene* **23**: 1052-63.
- Sutton, C. D., K. O'Byrne, et al. (2005). "Expression of thrombospondin-1 in resected colorectal liver metastases predicts poor prognosis." *Clin Cancer Res* **11**(18): 6567-73.
- Tachado, S. D., M. W. Mayhew, et al. (2002). "Regulation of tumor invasion and metastasis in protein kinase C epsilon-transformed NIH3T3 fibroblasts." *J Cell Biochem* **85**: 785-97.
- Takanami, I. (2004). "Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis." *Oncol Rep* **12**: 849-53.
- Tammela, T., B. Enholm, et al. (2005). "The biology of vascular endothelial growth factors." *Cardiovasc Res* **65**: 550-63.
- Taraboletti, G., D. Roberts, et al. (1990). "Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor." *J Cell Biol* **111**: 765-72.
- Terasaki, K., T. Kanzaki, et al. (2003). "Effects of recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (rh-TIMP-2) on migration of epidermal keratinocytes in vitro and wound healing in vivo." *J Dermatol* **30**(3): 165-72.
- Tischer, E., R. Mitchell, et al. (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." *J Biol Chem* **266**: 11947-54.
- Togo, S., H. Shimada, et al. (1995). "Host organ specifically determines cancer progression." *Cancer Res* **55**(3): 681-4.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.
- Ulfing, N., J. Bohl, et al. (2004). "Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus." *Brain Dev* **26**: 307-15.
- Uray, I. P., Y. Liang, et al. (2004). "Estradiol down-regulates CD36 expression in human breast cancer cells." *Cancer Lett* **207**: 101-7.
- Uzzan, B., P. Nicolas, et al. (2004). "Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis." *Cancer Res* **64**: 2941-55.
- Veikkola, T., M. Karkkainen, et al. (2000). "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors." *Cancer Res* **60**: 203-12.
- Vihinen, P. and V. M. Kahari (2002). "Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets." *Int J Cancer* **99**: 157-66.
- Vikis, H. G., S. Stewart, et al. (2002). "SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms." *Oncogene* **21**(15): 2425-32.

- Vizan, P., L. G. Boros, et al. (2005). "K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in human fibroblasts." *Cancer Res* **65**: 5512-5.
- Volpert, O. V., R. Pili, et al. (2002). "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1." *Cancer Cell* **2**: 473-83.
- Wang, G. Y., S. J. Wang, et al. (2005). "[Detecting bone marrow micrometastasis of gastric cancer by magnetic activated cell sorting combined with fluorescent activated cell sorting]." *Ai Zheng* **24**: 605-10.
- Wang, L., N. Wakisaka, et al. (2004). "The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors." *Cancer Res* **64**: 2774-81.
- Wartenberg, M., F. Donmez, et al. (2001). "Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells." *Faseb J* **15**: 995-1005.
- Watnick, R. S., Y. N. Cheng, et al. (2003). "Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis." *Cancer Cell* **3**: 219-31.
- Wey, J. S., M. J. Gray, et al. (2005). "Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells." *Br J Cancer* **93**(2): 233-41.
- Wilson, K. E., Z. Li, et al. (1999). "Beta 1 integrin- and proteoglycan-mediated stimulation of T lymphoma cell adhesion and mitogen-activated protein kinase signaling by thrombospondin-1 and thrombospondin-1 peptides." *J Immunol* **163**: 3621-8.
- Wittinghofer, A. (2005). "Phosphoryl transfer in Ras proteins, conclusive or elusive?" *Trends Biochem Sci.*
- Wyckoff, J., W. Wang, et al. (2004). "A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors." *Cancer Res* **64**: 7022-9.
- Yamamoto, F. and M. Perucho (1984). "Activation of a human c-K-ras oncogene." *Nucleic Acids Res* **12**(23): 8873-85.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." *Nature* **407**: 242-8.
- Yang, C. C., K. C. Chu, et al. (2004). "The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression." *Urol Oncol* **22**: 1-6.
- Yokoyama, W. M., S. Kim, et al. (2004). "The dynamic life of natural killer cells." *Annu Rev Immunol* **22**: 405-29.
- Young, G. D. and J. E. Murphy-Ullrich (2004). "The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex." *J Biol Chem* **279**: 47633-42.
- Zhang, L., D. Yu, et al. (2000). "Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Res* **60**: 3655-61.

Zinzindohoue, F., T. Lecomte, et al. (2005). "Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **11**: 594-9.