



Cáncer y angiogénesis

Manuel José Gorrín-Rivas¹.

¹Cirujano mjgorrin2@yahoo.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El crecimiento tumoral requiere el riego sanguíneo, el cual aportaría de esta manera el oxígeno, los nutrientes y los factores de crecimiento necesarios para que las células tumorales puedan crecer y multiplicarse, removiendo a su vez del lecho tumoral los catabolitos producidos por estas células. Esta teoría ha impulsado las investigaciones en aras de conocer, de una manera más exacta, el complejo mecanismo de la angiogénesis y así clonar nuevas proteínas endógenas con la actividad antiangiogénica o desarrollar agentes antiangiogénicos con una acción directa sobre las células endoteliales, minimizando de esta manera los efectos colaterales del tratamiento contra el cáncer. La terapia genética antiangiogénica es una novedosa forma de tratamiento que lograría altas concentraciones y niveles sostenidos de estas proteínas inhibidoras de la angiogénesis obteniendo así un efecto continuo sin la necesidad de administrar en forma continua y cíclica el agente antiangiogénico.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los tumores más allá de 1-2 mm requiere del aporte de oxígeno y nutrientes a través del riego sanguíneo. Esta teoría originalmente formulada por Judah Folkman¹ ha impulsado dramáticamente el estudio de la angiogénesis en el área oncológica en las últimas dos décadas.

Angiogénesis (gemaciones endoteliales) es definida como el nacimiento de nuevos vasos sanguíneos (capilares) a partir de las vénulas post-capilares pre-existentes. Por su parte, vasculogénesis, es la diferenciación *in situ* de células precursoras indiferenciadas (angioblastos) en células endoteliales que posteriormente se organizan en una red vascular.

Recientemente, la comunidad científica ha centrado su atención en el descubrimiento de proteínas endógenas inhibidoras de la angiogénesis como una nueva y prometedora modalidad

terapéutica contra el cáncer. En 1994 aparece publicada la angiostatina,² la cual es un fragmento de 38 kilodaltons que contiene los kringles 1-3 del plasminógeno. Tres años después, aparece la endostatina,³ fragmento de 20 kilodaltons del colágeno XVIII. Ambas, proteínas endógenas con potente actividad antiangiogénica capaces de suprimir el crecimiento de tumores primarios e incluso, de metástasis a distancia.

AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y MECANISMOS

Angiogénesis es un proceso complejo que involucra a las células endoteliales, pericitos, factores u hormonas paracrinas, receptores, kinasas, transductores de señales y a la matrix extracelular. Sin embargo, de una forma simple y didáctica podemos decir que la angiogénesis requiere de: la degradación de la matrix extracelular, la movilización y migración de células endoteliales, factores proangiogénicos y la re-organización en estructuras tubulares (nuevos vasos sanguíneos). Por lo tanto los inhibidores de la angiogénesis están dirigidos a bloquear cada uno de estos puntos. Diferentes agentes antiangiogénicos están siendo utilizados actualmente en ensayos clínicos (Tabla 1).

Con relación a las vías moleculares involucradas en este complejo proceso, mucho falta aún por discar para llegar a un entendimiento preciso y exacto de este mecanismo, lo cual permitiría el descubrimiento de nuevos agentes antiangiogénicos y su efectiva utilización en la clínica.

Agente	Ensayo Clínico	Mecanismo
Marimastat	Fase III contra cánceres de páncreas, mama y pulmón (células pequeñas)	Inhibidor sintético de las MMPs
COL-3	Fase I/II contra tumores malignos cerebrales	Inhibidor sintético de las MMPs
Neovastat	Fase III contra cánceres de riñón y pulmón	Inhibidor natural de las MMPs
BMS-275291	Fase II/III contra cáncer avanzado o metastásico de pulmón	Inhibidor sintético de las MMPs
Talidomida ⁴	Fase I/II contra melanoma avanzado; Fase II contra sarcoma de Kaposi, sarcomas ginecológicos, glioblastoma, mieloma múltiple, y cánceres de hígado, ovario y próstata (metastásico); Fase III contra cánceres de pulmón, riñón, próstata (no metastásico) y mieloma múltiple refractario	Inhibe las células endoteliales directamente. Mecanismo desconocido
Squalamina	Fase I contra cánceres avanzados; Fase II contra cánceres de ovario y pulmón	Actúa directamente sobre las células endoteliales inhibiendo la bomba de intercambio Na^+/H^+
Endostatina ³	Fase I contra tumores sólidos	Inhibición directa de las células endoteliales
SU5416	Fase I contra tumores sólidos avanzados de cabeza y cuello, cáncer de mama (Estadio IIIB o IV), tumores cerebrales (pediátricos), cáncer de	Bloquea la señal del receptor del FCEV

	ovario; Fase I/II contra leucemia mieloblástica aguda; Fase II contra la enfermedad de von-Hippel Lindau, cáncer de próstata, mieloma múltiple, mesotelioma; Fase III contra el cáncer colorectal avanzado (metástasis)	
SU6668	Fase I contra tumores avanzados	Bloquea la señal de los receptores del FCEV, FCF, FCDP
Interferón-a ⁵	Fase II/III en pacientes pediátricos con cáncer asociado a VIH, mieloma múltiple avanzado, meningiomas recurrentes y/o irresecables, melanoma, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular, linfoma no-Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide crónica, adenocarcinoma de páncreas	Inhibe la producción del FCEV y del FCFb
Anticuerpo anti-FCEV	Fase I contra tumores sólidos refractarios a tratamiento convencional; Fase II contra cáncer renal metastásico y cáncer colorectal avanzado no tratado (en combinación con quimioterapia)	Anticuerpo monoclonal dirigido contra el FCEV
EMD 121974	Fase I en pacientes VIH positivos con sarcoma de Kaposi; Fase I/II contra glioma anaplásico	Bloquea la integrina en las células endoteliales
CAI	Fase II contra cánceres de ovario y riñón	Inhibidor del influjo de calcio
Interleukina-12 ⁶	Fase I/II contra el sarcoma de Kaposi	Estimula la producción de interferón-g y IP-10
IM 862	Fase II contra carcinoma metastásico de colon y recto; Fase III contra el sarcoma de Kaposi	Desconocido

Tabla 1. Inhibidores de la angiogénesis en ensayos clínicos (Fuente: NCI Cancer Trials – <http://cancertrials.nci.nih.gov>)

MMPs, metaloproteinasas de la matrix;
 FCEV, factor de crecimiento del endotelio vascular;
 FCF, factor de crecimiento de los fibroblastos;
 FCDP, factor de crecimiento derivado de las plaquetas;
 FCFb, factor de crecimiento de los fibroblastos (básico);
 VIH, virus de inmunodeficiencia humana;
 IP-10, proteína 10 (interferón inducible)

ANGIOSTATINA Y ENDOSTATINA

Dos de las proteínas antiangiogénicas más investigadas en los últimos años son la angiostatina y la endostatina. La utilidad de estas proteínas se ha examinado en diferentes modelos animales con

resultados sorprendentes y prometedores.⁷⁻¹⁵

Un hecho particular a destacar es que ciclos repetitivos de endostatina administrados a ratones portando tumores subcutáneos de diferentes tipos celulares (carcinoma pulmonar tipo Lewis, fibrosarcoma T241 o melanoma B16F10), no produjeron resistencia al tratamiento; lo cual sí se observó en aquellos ratones que recibieron ciclos de ciclofosfamida. Más aún, después de 6, 4 ó 2 ciclos de tratamiento con endostatina (dependiendo del tipo de tumor antes mencionado), los tumores no crecieron más, permaneciendo en un estado microscópico latente, aún después del cese completo del tratamiento.¹⁶

Las células endoteliales con mínimo, por no decir ninguno, efecto a angiotensina y la endostatina actúan directamente sobre las colaterales a nivel experimental. La angiotensina inhibe selectivamente la proliferación de células endoteliales a la vez que induce apoptosis en éstas, a través de la activación, por una vía anormal, de la kinasa de adhesión focal y bloqueo de las subunidades a y b de la ATP sintetasa endotelial a través de la matrix extracelular.¹⁹ La^{17,18} A su vez, inhibe la migración de células endostatina, por su lado, induce apoptosis en las células endoteliales, a través de una disminución marcada de las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y BCL-Xendoteliales a través de un bloqueo de la activación y actividad L;²⁰ e inhibe la invasión de células catalítica de la metaloproteína de la matriz #2 (MMP-2).²¹

A pesar de las extensas investigaciones, sigue siendo un enigma saber cuál es el receptor específico de cada una de estas proteínas.

Un aspecto resaltante es que estas proteínas aunque poseen un efecto antiangiogénico y antitumoral potente, eso es sólo a nivel experimental y no representan la cura definitiva del cáncer en pacientes. Debemos esperar que estos compuestos pasen por las diferentes fases de los ensayos clínicos, y será entonces cuando pasarán a formar parte del armamento terapéutico contra el cáncer, donde su mayor efectividad va a depender de las combinaciones adecuadas que se hagan con las modalidades terapéuticas ya existentes dependiendo del tipo de cáncer.

TERAPIA GENÉTICA ANTIANGIOGÉNICA

La necesidad de una administración continua en pacientes con cáncer de estos agentes antiangiogénicos repartidos en varios ciclos dependiendo del tipo de tumor (aún por decidir en los ensayos clínicos que se llevan a cabo actualmente), nos plantea un problema potencial: la necesidad de usar grandes cantidades de proteína recombinante, anticuerpos contra factores proangiogénicos o de drogas antiangiogénicas sintéticas, lo cual aumentaría enormemente los costos de tratamiento.

Una idea atractiva para afrontar este problema es administrar el gen que codifica a la proteína antiangiogénica local o regionalmente en aquellos tumores que estén al alcance directo, ya sea a través de endoscopia, ultrasonografía, tomografía computarizada o resonancia magnética o de una forma sistémica (intravenosa), utilizando vectores que selectivamente introduzcan el gen deseado dentro de las células tumorales blanco. De esta manera, el gen sería incluido dentro del material genético de las células tumorales, permitiendo así su replicación y transcripción en la proteína deseada a altas concentraciones en el microambiente tumoral. Estaríamos hablando entonces de terapia genética antiangiogénica.

En el futuro, este tipo de terapia podría ser utilizada:

- Después de la cirugía o luego de la radioterapia, para prevenir la recurrencia de las metástasis a distancia.
- En combinación con la quimioterapia.
- En combinación con proteínas recombinantes o anticuerpos, los cuales podrían ser descontinuados después de varios meses de tratamiento, si el huésped es capaz de mantener niveles sanguíneos adecuados de la proteína inhibidora genéticamente producida por él.
- En combinación con otros tipos de terapia genética (utilizando genes supresores de tumores como el p53).

LA METALOELASTASA DE MACRÓFAGOS: UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA INHIBIR LA ANGIOGENESIS

Mis colegas y yo en el Departamento de Cirugía y Ciencias Básicas Quirúrgicas de la Universidad de Kyoto, hemos centrado nuestros esfuerzos en una enzima llamada Metaloelastasa de Macrófagos (MME).¹⁵ Esta enzima pertenece a la familia de las Metaloproteinasas de la Matrix (MMP), conocida también como MMP-12. Su substrato principal en la matrix extracelular es la elastina, con mínima acción sobre otros componentes de la matrix como colágeno IV o gelatina tipo I, componentes principales de la membrana basal. Ella también es capaz de procesar y degradar el plasminógeno, liberando la angiostatina.^{22,23}

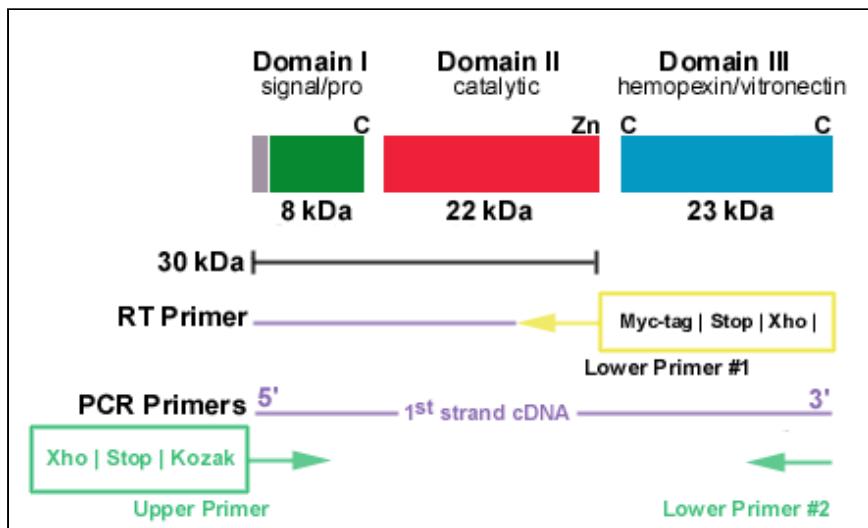


Figura 1

Construcción del ADN complementario que codifica a la metaloelastasa de macrófagos (MME). Representación esquemática de la estructura de la MME, mostrando sus 3 dominios: el dominio I o péptido señal y proenzima (8 kDa), el dominio II o catalítico (22 kDa) y el dominio III o el extremo COOH (23 kDa). La activación y procesamiento de la MME ocurre espontáneamente, inmediatamente después de su síntesis y liberación al medio extracelular a través de un proceso autocatalítico, el cual conlleva a la pérdida de los dominios I y II, alcanzando de esta manera su forma madura y activa de 22 kDa. Un ADN complementario codificando a los dominios I y II de la MME y al epitope myc fue amplificado por medio de una transcripción inversa seguido de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La secuencia del epitope myc derivado del péptido pp62 c-myc humano y que codifica a los siguientes 10 aminoácidos (EQKLISEEDL) fue fusionado al terminal 3' y una secuencia codificando al "Kozak motif" fue fusionado al terminal 5' del ADN complementario resultante, el cual fue flanqueado a su vez en ambos extremos por una posición de la enzima de restricción Xho I.

La utilización del ADN complementario que codifica al Dominio I (péptido señal y proenzima) y al Dominio II (dominio catalítico) de la metaloelastasa fue introducido en un plásmido o vector de expresión (pCAG) bajo la conducción de un facilitador de citomegalovirus (CMV enhancer) y un

promotor beta-actin (chicken beta-actin promoter), tal y como se representan esquemáticamente en las figuras 1 y 2. Luego, este plásmido fue incluido en liposomas cubiertos con el Virus Hemaglutinante del Japón (HVJ o Virus Sendai) para optimizar su transducción o transferencia dentro de las células tumorales (Fig. 3), siguiendo la metodología originalmente descrita por Y. Kaneda.²⁴

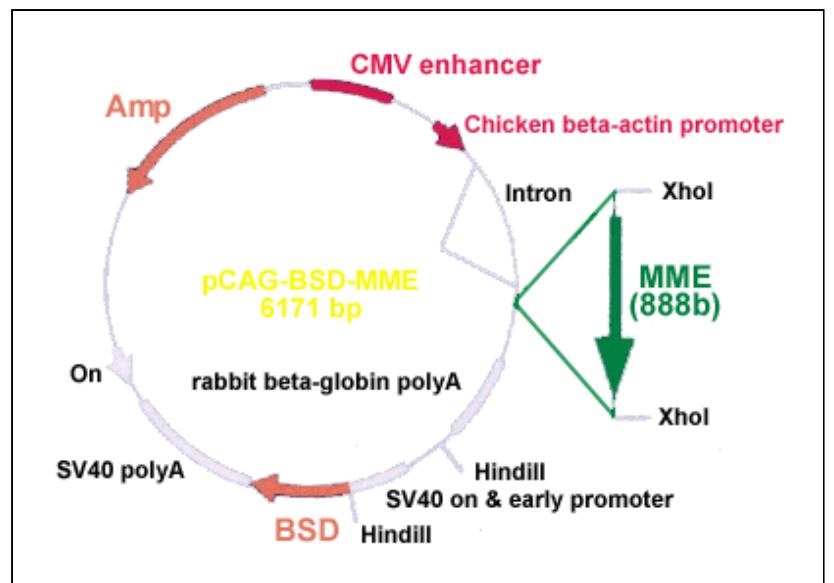


Figura 2

Construcción del vector o plásmido de expresión. El ADN complementario de 888 pares de bases que codifica a los dominios I y II de la metaloelastasa de macrófagos y al epítope myc fue clonado dentro del vector eucariota de expresión pCAG-BSD. La transcripción de la MME fue conducida por el facilitador de citomegalovirus (CMV enhancer) y el promotor beta-actín (chicken beta-actín promoter). El vector contiene también un gen llamado BSD (blasticidin S deaminase) el cual confiere resistencia hacia el antibiótico blasticidin S, necesario para el proceso de selección de aquellos clones conteniendo el vector.

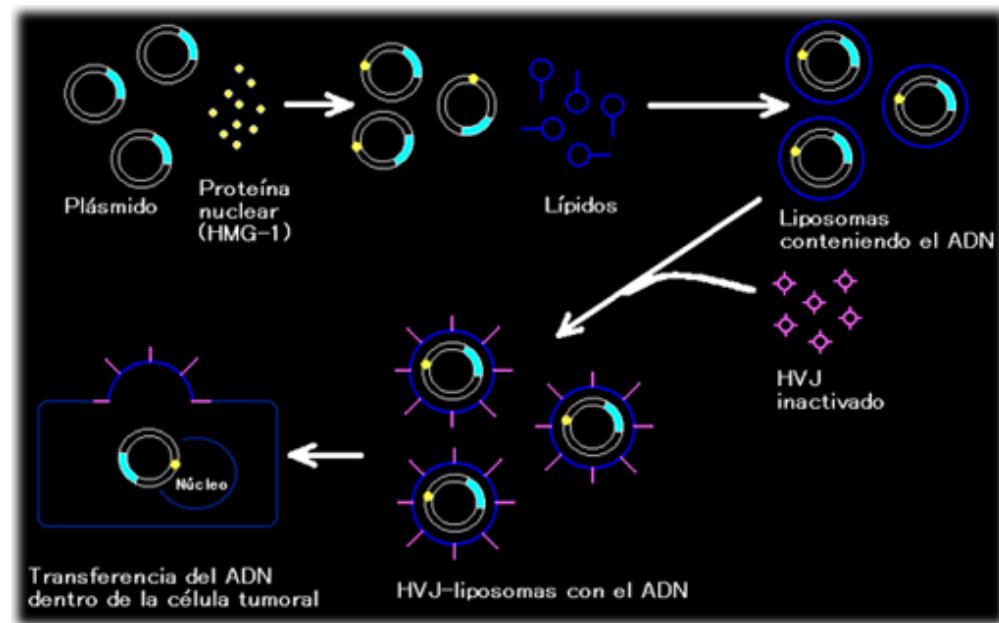


Figura 3

Procedimiento para la transducción o transferencia de genes usando liposomas asociados al Virus Hemaglutinante del Japón (HVJ). El plásmido contenido el ADN complementario de interés y la proteína nuclear (HMG-1) son incluidos en liposomas, y éstos a su vez son asociados con el HVJ. El liposoma-HVJ resultante transduce el ADN-HMG-1 dentro del citoplasma y el complejo migra rápidamente al interior del núcleo.

Experimentos conducidos en ratones portando tumores derivados de una línea celular de cáncer de colon (CT-26) demostraron que la transducción fue sólo dentro de las células tumorales, logrando la producción *in situ* de la metaloelastasa y por ende de la angiostatina a niveles terapéuticos. De esta manera, se obtuvo una disminución dramática del tamaño de los tumores (Fig. 4), a través de un efecto antiangiogénico potente como se pudo observar a través de microangiografía de los tumores (Fig. 5). He de mencionar que no se observó ningún efecto tóxico o indeseable.

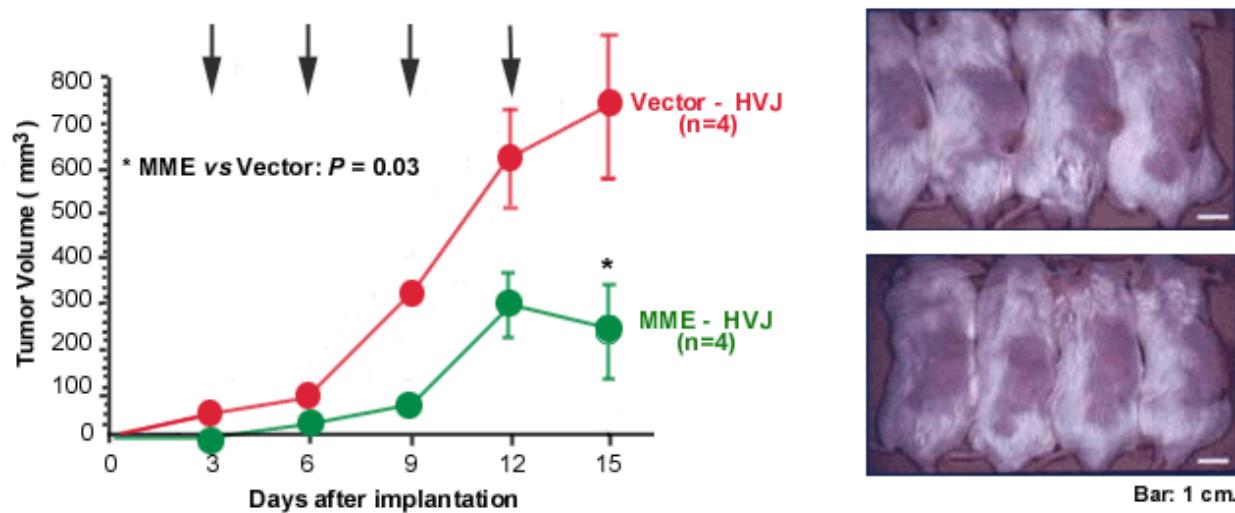


Figura 4

Inhibición del crecimiento de tumores primarios después del tratamiento con la metaloelastasa de macrófagos (MME). A la izquierda, curva del crecimiento tumoral *in vivo* de los tumores tratados con MME (MME-HVJ) o con el vector control (Vector-HVJ). Obsérvese la inhibición significante del crecimiento tumoral a los 15 días en aquellos tumores tratados con MME ($P = 0.03$). La administración de tratamiento es marcado con las flechas. A la derecha, ratones BALB/c portando tumores de colon en el espacio subcutáneo del espacio dorsal. Nótense las características macroscópicas de los tumores a los 15 días. Los tumores tratados con MME lucen planos y pálidos; mientras que aquellos tumores que recibieron sólo el vector control se visualizan abultados y con un color rojizo, típico de tumores hipervasculares.

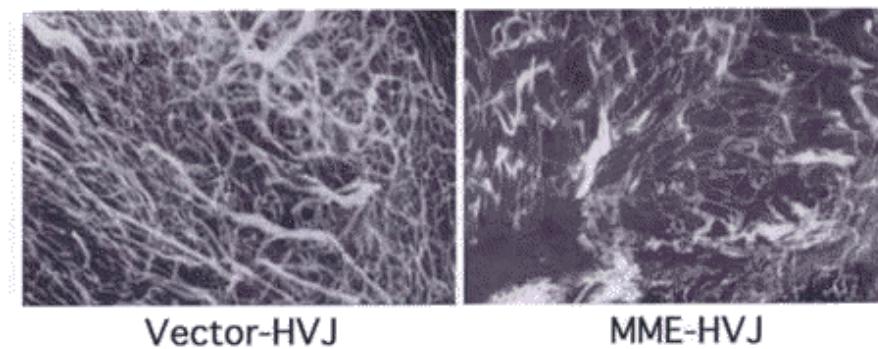


Figura 5

Evaluación temporal-espacial de los vasos sanguíneos intratumorales utilizando una técnica llamada microangiografía. Aquellos tumores que recibieron la metaloelastasa como tratamiento (MME-HVJ) muestran un patrón hipovascular con una red vascular alterada donde los capilares se visualizan acortados y disminuidos en calibre. Por el contrario, los tumores controles (Vector-HVJ) muestran una excesiva vasculatura con una red vascular bien formada.

COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIÓN

Las evidencias experimentales acumuladas hasta hoy día reafirman que el crecimiento tumoral depende en gran parte del complejo proceso de la angiogénesis. Cuando ésta es suprimida, los

tumores en animales de experimentación son limitados a un tamaño microscópico o latente. Muchos de estos agentes antiangiogénicos se encuentran actualmente en fase I, II y III de diferentes ensayos clínicos. La aparición de nuevos inhibidores de la angiogénesis, como la endostatina (actualmente en Fase I) y la angiostatina (próximo a ser incluido en ensayos clínicos), los cuales logran suprimir el crecimiento tumoral de una manera sostenida y sin inducir resistencia al tratamiento, señalan hacia un rol más determinante de estos agentes en la oncología en los próximos años.

Finalmente, la característica especial de necesitar un aporte continuo para lograr un efecto antiangiogénico sostenido, nos hace pensar que el salto de la terapia genética antiangiogénica desde el laboratorio hacia la clínica, será muy pronto una realidad.

En la próxima entrega exploraremos detalladamente el rol de la metaloelastasa en el cáncer, sus patrones de expresión en diferentes tipos de tumores del tracto gastrointestinal (hígado, colon y esófago) y su valor clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
2. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-328.
3. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-285.
4. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4082-4085.
5. Stout AJ, Gresser I, Thompson WD. Inhibition of wound healing in mice by local interferon alpha/beta injection. *Int J Exp Pathol* 1993; 74:79-85.
6. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87:581-586.
7. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996; 2:689-692.
8. Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, Soff GA, Paller AS. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1997; 57:5277-5280.
9. Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, Shing Y. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:651-654.
10. Kim Lee Sim B, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, et al. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res* 1997; 57:1329-1334.
11. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998; 188:755-763.
12. Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji R-W, Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest* 1998; 101:1055-1063.
13. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998; 58:3362-3369.

14. Chen Q-R, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59:3308-3312.
15. Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, et al. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000; 6:7647-54.
16. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407.
17. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:5579-5583.
18. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2811-2816.
19. Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999; 340:77-84.
20. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274:11721-11726.
21. Kim Y-M, Jang J-W, Lee O-H, Yeon J, Choi E-Y, Kim K-W, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res* 2000; 60:5410-5413.
22. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88:801-810.
23. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998; 161:6845-6852.
24. Kaneda Y. Virus (Sendai virus envelopes)-mediated gene transfer. In: J.E. Celis (ed.). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. San Diego: Academic Press, 1996:50-57.