

Título del capítulo: LA ANGIOGÉNESIS Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

AULA ABIERTA UMA

## INTRODUCCIÓN

### La angiogénesis y sus implicaciones clínicas.

El término *angiogénesis* designa el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente.

Las *células endoteliales* se encuentran entre las de más larga vida media en el cuerpo. En un vaso adulto normal, solo un 0.01% de sus células endoteliales se encuentra en el ciclo de división celular en cualquier momento.<sup>327</sup> Por comparación, aproximadamente el 14% de las células epiteliales normales están en el ciclo de división celular.<sup>306</sup> Las células endoteliales forman una monocapa que tapiza la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, independientemente de su calibre. Estas células se encuentran ligadas a la *lámina basal*, un tipo de matriz extracelular que rodea los vasos sanguíneos y que a su vez está relacionada estrechamente con células musculares lisas (pericitos) y con el tejido conectivo circundante. Las células endoteliales, por formar parte de las estructuras capilares responsables del abastecimiento de nutrientes hasta todos los puntos del organismo, son extraordinariamente sensibles a los cambios en las necesidades nutricionales de los tejidos que irrigan, cambios que se manifiestan en forma de señales químicas procedentes de las células de dichos tejidos. Por tanto, aunque la angiogénesis se encuentra normalmente suprimida, en diversos procesos fisiológicos ha de producirse necesariamente para satisfacer las necesidades de nutrición y de excreción de tejidos que se están desarrollando activamente, tanto durante el desarrollo embrionario como en el individuo adulto. En este último, la angiogénesis queda reducida básicamente a determinados procesos relacionados con los ciclos reproductivos (formación del cuerpo lúteo, vascularización del endometrio, desarrollo placentario) y a la cicatrización de heridas y la reparación de fracturas óseas. En todos estos casos, la angiogénesis tiene lugar como un proceso finamente regulado y *transitorio*, de forma que, cuando desaparece el estímulo original, el proceso se detiene y eventualmente se produce la desaparición de los vasos sanguíneos.

Por contra, una angiogénesis *mantenida y persistente* es característica de enfermedades como la diabetes, psoriasis o artritis reumatoide y es esencial para el crecimiento tumoral y la metástasis.<sup>224,226</sup>

El estudio de la angiogénesis y de los mecanismos que la regulan no es sólo de interés biológico sino que también puede contribuir a un diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas, tanto para su inhibición en el tratamiento de aquellas enfermedades en las que está implicada una angiogénesis mantenida y persistente, como para su estimulación en el tratamiento de patologías asociadas a una deficiente irrigación. Esto último constituye lo que se denomina *angiogénesis terapéutica*.

Actualmente, ya se sabe que los mecanismos celulares y moleculares de la angiogénesis pueden diferir de forma sutil pero significativa en función de su localización. Por ejemplo, en la piel psoriática predominan los vasos grandes y, en cambio, en la retina isquémica predominan los brotes y pequeñas ramificaciones. Por tanto, la estimulación o inhibición terapéutica de la angiogénesis deberían ajustarse a las características propias del tejido diana.

Aunque la mayor atención se le ha dedicado a las células endoteliales, ellas por sí solas pueden iniciar pero no pueden completar la angiogénesis. Las células periendotheliales son esenciales para la maduración de los vasos.<sup>110</sup> Durante la "miogénesis vascular" las células murales estabilizan el vaso naciente inhibiendo la proliferación y migración endotelial y estimulando la producción de matriz extracelular. Estas células acompañantes, por tanto, proporcionan un control hemostático y protegen a los nuevos vasos contra la ruptura o la regresión. De hecho, los vasos regresionan mucho más fácilmente mientras no estén cubiertos por células musculares lisas.<sup>58</sup> La pérdida de los pericitos alrededor de los vasos retinianos en pacientes diabéticos causa dilatación aneurismal, sangrado y ceguera. Durante la subsiguiente arteriogénesis, los vasos van siendo cubiertos por una capa muscular, dotándolos con propiedades viscoelásticas y vasomotoras necesarias para acomodar las necesidades cambiantes de perfusión tisular.

No obstante todo lo hasta aquí dicho, antes de continuar conviene advertir que el desarrollo histórico del interés científico por la angiogénesis está íntimamente asociado a las relaciones de la angiogénesis con el cáncer

y que una abrumadora mayoría de la investigación que actualmente se realiza con respecto a la angiogénesis está centrada en la *angiogénesis tumoral*.

### **Diferentes procesos de generación de vasos.**

La formación de vasos puede ocurrir por diferentes procesos.<sup>110,605,641</sup> La angiogénesis se diferencia de otros procesos morfológicamente similares como la *vasculogénesis*, la *arteriogénesis* y la *linfangiogénesis*.

Durante el desarrollo embrionario las células endoteliales se diferencian a partir de células del mesodermo denominadas angioblastos, y se agrupan formando una red vascular inmadura constituida por vasos de calibre y ramificación homogénea, en un proceso que se conoce como vasculogénesis.<sup>646,779</sup> Posteriormente, este plexo vascular inmaduro es remodelado para constituir una red vascular jerarquizada en distintos tamaños, calibres y grados de ramificación mediante angiogénesis y por regresión, división y fusión de los vasos preexistentes, para ajustar la densidad vascular en función de los requerimientos metabólicos de los tejidos y órganos. Finalmente, las células endoteliales de la red vascular madura reclutan células musculares lisas (pericitos) que engloban a los vasos sanguíneos. Aunque la vasculogénesis se produce esencialmente en tejidos embrionarios, también se ha descrito la posibilidad de vasculogénesis en tejidos adultos.<sup>672</sup>

Por otra parte, la arteriogénesis se refiere al crecimiento de arteriolas colaterales preexistentes que conduce a la formación de arterias con elevada conductancia capaces de compensar la pérdida de función de arterias ocluidas.<sup>733</sup> Se trata, pues, de un proceso de adaptación y respuesta fisiológica a una oclusión arterial patológica.<sup>641</sup>

La linfangiogénesis es la formación de vasos linfáticos a partir de vasos preexistentes<sup>763,764</sup> y se produce paralelamente a la formación de vasos sanguíneos durante la angiogénesis. El sistema linfático está también constituido por células endoteliales diferenciadas fenotípicamente de las células endoteliales del sistema circulatorio sanguíneo. Sus funciones básicas son tres: participa en la absorción intestinal de lípidos, es

constituyente básico del sistema inmune y auxilia al sistema circulatorio sanguíneo en la recuperación de células, proteínas y fluidos extravasados a través de los capilares. Aunque los vasos linfáticos fueron descubiertos y descritos como "venas lechosas" por Gasparo Asellius en 1627,<sup>24</sup> han sido mucho menos estudiados que los vasos sanguíneos, en buena parte a causa de las dificultades que han persistido hasta hace poco para reconocer estos vasos en los tejidos, debido a la carencia de marcadores específicos. Estas circunstancias están cambiando con la identificación de moléculas que controlan específicamente el crecimiento de los vasos linfáticos.<sup>14</sup>

### **Perspectiva histórica del nacimiento y desarrollo del interés científico por la angiogénesis.**

La primera descripción científica desde el punto de vista morfológico de la angiogénesis se remonta a 1787, año en que el cirujano británico John Hunter observó que el proceso se producía durante el desarrollo de la cornamenta de los renos.<sup>342</sup>

La primera observación recogida en la literatura científica de que se produce angiogénesis alrededor de los tumores se hizo hace unos 100 años.<sup>273</sup> Durante la primera mitad del siglo XX se suceden algunas esporádicas observaciones en la misma dirección.<sup>13,346</sup> Sin embargo, puede decirse que la investigación sobre la angiogénesis no comenzó hasta la primera mitad de los años sesenta del pasado siglo. En 1963, el grupo de Judah Folkman (un nombre clave en la historia de la investigación sobre angiogénesis) observó que células tumorales implantadas en órganos aislados perfundidos no pudieron crecer más allá de un diámetro de 1-2 mm y permanecieron avasculares, lo que les indujo a plantearse buscar los mecanismos por los que se rige la angiogénesis tumoral.<sup>225</sup> La hipótesis de que los tumores podrían producir alguna sustancia angiogénica fue establecida en 1968.<sup>189,283</sup> Folkman propuso que el crecimiento tumoral y la metástasis son dependientes de angiogénesis y, por tanto, que bloquear la angiogénesis podría ser una estrategia para frenar la progresión tumoral.<sup>223</sup> De hecho, poco después se publicaba la primera demostración experimental de que la inhibición de la angiogénesis puede hacer que los tumores entren

en "dormancia".<sup>266</sup> Pero esta hipótesis no fue bien recibida a causa de la prevalente asunción en aquellos tiempos de que la hipervascularización de los tumores se debía a vasos "dilatados" del hospedador y no a nuevos vasos. Para contrarrestar este argumento, se demostró que las células endoteliales en los vasos que irrigaban un tumor incorporaban timidina tritiada.<sup>118</sup> Sin embargo, no se aceptó definitivamente que los tumores podían inducir la proliferación de nuevos vasos capilares hasta que se implantaron tumores en la córnea del conejo y se pudo observar que nuevos vasos crecían a través de una córnea avascular.<sup>265</sup> Nuevas críticas argumentaron que quizá cualquier célula de rápido crecimiento pudiera inducir la neovascularización. Esta asunción fue desechada cuando se demostró que células tumorales irradiadas, no proliferantes, eran tan angiogénicas como las células proliferantes.<sup>26</sup>

Durante los años setenta y ochenta del pasado siglo se suceden los aislamientos e identificaciones de los primeros factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos.<sup>66,86,231,441,653</sup> Y así llegamos a un artículo clave que, en cierta forma, marca un antes y un después en la investigación sobre angiogénesis.<sup>224</sup> En 1990, el *Journal of the National Cancer Institute* publica un muy influyente editorial firmado por Judah Folkman y titulado "*What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?*" (o sea, "¿Cuál es la evidencia de que los tumores son dependientes de angiogénesis?"). En este editorial, se enumeran las 14 evidencias experimentales principales que a finales de 1989 apoyaban la hipótesis de que el crecimiento tumoral es, en efecto, dependiente de angiogénesis. Desde la publicación de este artículo, el número de nuevas publicaciones en este campo de investigación ha ido creciendo exponencialmente año tras año y se ha progresado enormemente en el grado de conocimiento de las bases moleculares y celulares que regulan la angiogénesis y sus relaciones con el cáncer y otras enfermedades.<sup>66,96,110,114,226,227,235,306,356,457,605,717,779,789</sup>

## ANGIOGÉNESIS TUMORAL

**Cáncer: bases comunes dentro de la diversidad y complejidad del problema.**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte. Aunque se reconocen más de un centenar de enfermedades neoplásicas y cada una presenta peculiaridades específicas, es posible describir pautas y patrones comunes en la génesis y desarrollo de la práctica totalidad de los tumores.<sup>307</sup> En las últimas décadas, se ha avanzado muchísimo en la elucidación de las bases moleculares del cáncer y se han hecho progresos significativos en la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas.

En la evolución de un tumor, pueden distinguirse tres fases o etapas: 1. Transformación neoplásica. 2. Progresión tumoral *in situ* dependiente de angiogénesis. 3. Invasión y metástasis. No todos los tumores pasan por las tres fases. Así, en las leucemias no se puede hablar de un crecimiento *in situ*, al tratarse de células sanguíneas circulantes. Por otra parte, hay numerosos ejemplos de tumores que permanecen encapsulados y nunca manifiestan capacidad invasiva, no dando -por tanto- lugar a metástasis, que son las últimas responsables de la mayoría de las muertes por cáncer.<sup>238</sup>

Los tumores son monoclonales, es decir, derivan de una sola célula. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes a lo largo de un período de crecimiento que dura años o décadas hasta que se hace aparente. Durante este proceso dinámico de tipo evolutivo, se produce una selección darwiniana: aquellas células que van adquiriendo alteraciones en su material genético que proporcionan una ventaja en cuanto al crecimiento van siendo seleccionadas y serán mayoritarias en el tumor. La inestabilidad genética que caracteriza a las células cancerosas las lleva posteriormente a adquirir capacidad invasiva y metastásica.

La transformación neoplásica es la consecuencia de mutaciones que producen la expresión anormal de un número reducido de nuestros genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del DNA. Además, en la aparición del cáncer intervienen otros genes denominados genes de susceptibilidad o modificadores, cuyas variantes o polimorfismos modulan la activación y/o metabolismo de los

agentes carcinogénicos o la respuesta a factores de crecimiento o supervivencia. Como resultado de la acumulación de mutaciones en estos tipos de genes reguladores, las células neoplásicas adquieren un potencial replicativo ilimitado, son capaces de proliferar en ausencia de señales estimuladoras de la proliferación, se hacen insensibles a señales antiproliferativas y/o adquieren capacidad para evadir la muerte celular programada.<sup>307</sup>

El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, a partir de un cierto diámetro (de tan sólo unos pocos milímetros) requiere su vascularización. Sin ella, las células tumorales mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y por falta de eliminación de sustancias de desecho. La angiogénesis es, por tanto, esencial para la progresión tumoral. Las células tumorales que adquieren el fenotipo angiogénico son capaces, por sí mismas o en cooperación con células del estroma del hospedador, de inducir una respuesta proangiogénica en endotelios vasculares relativamente cercanos. El resultado final es la formación de una nueva red vascular, derivada de la preexistente, que irriga el tumor, aportándole los nutrientes y el oxígeno que requiere para expandirse.

La adquisición de la capacidad angiogénica favorece, además, la diseminación del tumor. Para ello, las células tumorales deben acceder a la circulación sanguínea o linfática atravesando las paredes de los vasos. Para formar metástasis, las células deben soportar deformaciones que dependerán de la rigidez de las paredes y la disparidad entre su propio diámetro y el del vaso, y también sobrevivir al probable ataque del sistema inmune, adherirse a la pared de los vasos y extravasarse. Afortunadamente, éste es un proceso muy poco eficiente. Tras extravasarse, las células tumorales inician una segunda etapa de proliferación descontrolada y angiogénesis para dar lugar a tumores secundarios.

Debe remarcarse que las metástasis son dependientes de angiogénesis en dos fases de la cascada metastásica.<sup>213</sup> Primero, un tumor primario tiene que haberse vascularizado antes de que se "liberen" de él células típicamente metastásicas.<sup>456</sup> Segundo, al llegar al órgano diana, las células metastásicas dependen de nuevo de angiogénesis para crecer a un tamaño detectable clínicamente. En ausencia de actividad angiogénica, las

células tumorales metastásicas pueden formar agregados perivasculares microscópicos alrededor de los microvasos a partir de los cuales abandonaron la circulación. Un análisis detallado de estas colonias metastásicas durmientes en pulmón de ratón revela que tienen un diámetro inferior a 0.3 mm, tienen alta tasa de replicación, alta tasa de apoptosis y no están neovascularizados.<sup>226,331</sup>

Para alcanzar la tercera fase, de invasión y metástasis, las células tumorales deben haber adquirido no sólo un fenotipo angiogénico sino, además, un fenotipo invasivo. La invasividad es, por tanto, la característica esencial del tumor maligno. Si bien conocemos muchas mutaciones que explican el aumento en la proliferación celular, es mucho menos lo conocido sobre las mutaciones responsables de que las células se hagan invasivas. La invasividad incluye a su vez varios procesos: pérdida de la adhesión celular, degradación de la matriz extracelular y movilidad. El proceso de aparición de células invasivas comienza en una fase relativamente temprana. Es muy probable que cuando se detecta inicialmente un tumor existan ya en él células que son potencialmente invasivas y/o angiogénicas.

### **La angiogénesis tumoral es un sello distintivo de la progresión tumoral y la metástasis.**

Buena parte de la investigación sobre cáncer desarrollada en los pasados cincuenta años se ha dedicado al análisis de las diferencias celulares y moleculares entre células transformadas y no transformadas, con especial énfasis en los genes que se expresan en las células tumorales de forma diferente a como se expresan en sus contrapartidas no tumorales.<sup>66,791</sup> Este enfoque, que ha sido denominado *genocéntrico*,<sup>230</sup> ha producido, sin lugar a dudas, una enorme cantidad de valiosa información acerca de los orígenes del cáncer y su progresión. Sin embargo, este paradigma prevalente puede conducir a la errónea simplificación de asumir que el cáncer es el resultado, exclusivamente, de mutaciones génicas específicas y que, por tanto, podría ser terapéuticamente tratable sólo con revertir dichas alteraciones mutacionales o utilizando a las mismas como dianas para eliminar el tumor. Sin embargo, cada vez se hace más abrumadora la

acumulación de evidencias científicas en favor de la importancia de los mecanismos epigenéticos y las influencias de las células del entorno y del propio medio extracelular en la progresión tumoral.<sup>96,230</sup> Parece claro, pues, que el cáncer es algo más que una enfermedad causada por alteraciones de genes específicos. Más bien, una característica común a todo tipo de cáncer es la elevada inestabilidad del genoma de la célula tumoral.<sup>105</sup>

Estas limitaciones del enfoque geno-céntrico han conducido a que algunos científicos sugieran la necesidad de establecer nuevos paradigmas que estén basados en principios subyacentes fundamentales, de forma que se pueda restaurar una percepción unificadora de la enfermedad neoplásica.<sup>96,230,307,681</sup> La cuestión no sería tanto conocer cómo difieren genéticamente un cáncer de mama y uno de colon, por ejemplo, sino identificar en qué aspectos fundamentales estos tumores muy distintos son similares. En esta línea de pensamiento, una reciente -y, no obstante, ya "clásica"- revisión de Hanahan y Weinberg anticipa que, en un futuro cercano, la investigación oncológica va a desarrollarse generando un cuerpo lógico de ciencia donde la extrema complejidad de la enfermedad descrita en el laboratorio y la clínica podrá ser entendible en términos de unos pocos principios generales subyacentes.<sup>307</sup> Estos autores sugieren que el vasto catálogo de genotipos neoplásicos es una manifestación de seis alteraciones en la fisiología celular (que ellos denominan "*hallmarks*", esto es, "*sellos distintivos*" del cáncer) que *colectivamente* dictan el crecimiento tumoral maligno: 1) Autosuficiencia en señales para el crecimiento. 2) Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento. 3) Evasión de la muerte celular programada. 4) Potencial replicativo ilimitado. 5) Angiogénesis mantenida. 6) Invasión y metástasis.

Remarquemos aquí que una *angiogénesis mantenida y persistente es un sello distintivo del cáncer*. Basado en esta percepción, se ha propuesto un paradigma "*endotelio-céntrico*", que permite trascender los detalles de la presentación genética de las neoplasias. Se centra, en cambio, en aspectos generales del comportamiento de los tumores que no están sujetos a los problemas y limitaciones asociados a la alta tasa de mutación de las células tumorales.<sup>96,230,304</sup> Además, como las células endoteliales no tienen la inestabilidad genética de las células neoplásicas, cabría esperar que

estrategias terapéuticas basadas en este enfoque endotelio-céntrico pudieran ser aplicables a muy distintos tipos de cáncer y con menor riesgo de que aparezcan mecanismos de resistencia que en terapias antineoplásicas más convencionales.<sup>226</sup>

### **Vascularización de los tumores: Conexión del *interruptor angiogénico*.**

Las células de mamíferos requieren oxígeno y nutrientes para sobrevivir y, por tanto, se hallan localizadas a no más de 100-200 micras (el límite de difusión del oxígeno) de algún vaso sanguíneo.<sup>114</sup> Las células tumorales no son una excepción a estos requerimientos. Un gramo de tumor vascularizado contiene aproximadamente 20 millones de células endoteliales y entre 100 y 1000 millones de células tumorales. Así que cada 10-100 nuevas células tumorales requieren al menos una nueva célula endotelial.<sup>227</sup> Para iniciar la neovascularización, un tumor avascular debe adquirir un *fenotipo angiogénico* que le permite "encender" el *interruptor angiogénico*. Obviamente, el mecanismo mediante el que se "conecta" el *interruptor angiogénico* debería involucrar sensores de presiones parciales de oxígeno suficientemente sensibles para detectar rápidamente la hipoxia (al menos parcial) producida en el interior del tumor sólido avascular. De hecho, la respuesta hipóxica es un tema de plena actualidad, habiéndose ya demostrado la participación de un factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF-1) en la inducción de genes claves en el control de las respuestas fisiológicas a la hipoxia,<sup>79,754</sup> una de las cuales es justamente la inducción de la angiogénesis; en este contexto, la inducción del gen que codifica la proteína VEGF (el más potente inductor angiogénico descrito) en condiciones de hipoxia es especialmente relevante<sup>656</sup> pero, muy probablemente, otros factores pueden jugar un papel en la respuesta del tumor a la hipoxia.<sup>66,657</sup>

Gullino demostró en 1976 que las células de tejidos precancerosos adquieren capacidad angiogénica en su proceso de transformación en cancerosas y propuso este concepto para diseñar estrategias para prevenir el cáncer.<sup>294</sup> Posteriormente, ha quedado plenamente confirmado que la

adquisición del fenotipo angiogénico ocurre en etapas tempranas del desarrollo tumoral y es un paso limitante en la progresión tumoral.<sup>114,232,235,306</sup>

Actualmente se admite que el interruptor angiogénico está "apagado" mientras el efecto de las moléculas pro-angiogénicas quede contrarrestado por el de moléculas anti-angiogénicas y que dicho interruptor se enciende cuando el balance neto se desplaza a favor de la angiogénesis.<sup>73,306,457</sup> La actividad angiogénica neta de un tumor es, pues, el resultado del desequilibrio entre señales estimuladoras e inhibidoras. Los tumores pueden permanecer en dormancia durante años a causa de un equilibrio entre proliferación y apoptosis. Los propios tumores primarios generan promotores angiogénicos de corta vida media e inhibidores de más larga vida media. Como consecuencia de su mayor vida media, la concentración sistémica de anti-angiogénicos puede exceder la de proangiogénicos e inhibir el crecimiento de metástasis en sitios distales.<sup>114,226,235,331</sup> La resección de un tumor primario podría, por tanto, conducir a la eliminación de los inhibidores, dando como resultado un crecimiento de metástasis.<sup>235</sup>

El "encendido" del *interruptor angiogénico* tiene varios efectos sobre los vasos dianas. Los pericitos se retraen y aumenta el volumen de su retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Hay un perfil de expresión diferente al que caracteriza al endotelio quiescente, con proteínas expresadas preferentemente, tal como la endogлина (CD105). El propio endotelio secreta diversos factores (FGF, PDGF, IGF), que pueden actuar de formas auto- y paracrina, amplificando la respuesta angiogénica. La lámina basal y el estroma que rodean los capilares son degradados proteolíticamente, posibilitando la migración endotelial para formar un nuevo tubo. El nuevo brote capilar va creciendo por incorporación de células endoteliales que migran del vaso parental y por proliferación endotelial en la base del "brote". El endotelio inicialmente migra como un cordón sólido, pero subsecuentemente desarrolla espacios inter- e intracelulares que forman luz vascular, los extremos de los nuevos capilares anastomosan para formar una nueva red capilar y se genera una nueva lámina basal.<sup>235</sup>

Para que prospere la angiogénesis tumoral, han de producirse modificaciones en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, moduladas por muchas de las moléculas que están implicadas en la

respuesta inmune y en la inflamación. Otros mecanismos, como la "intisulación" y la vasculogénesis a partir de precursores endoteliales circulantes reclutados también pueden estar implicados en la vascularización de los tumores.<sup>235,561</sup>

Una vez se ha establecido la vasculatura tumoral, continúa una remodelación de vasos. Es probable que este proceso de remodelado esté relacionado con una exagerada respuesta al estrés y, por tanto, que esté muy influenciado por el microambiente tumoral, incluyendo el lugar, el flujo sanguíneo, la concentración de glucosa y la hipoxia. Algunos estímulos actúan sinérgicamente con determinados oncogenes.

### **Características de los vasos tumorales e implicaciones clínicas.**

El enfoque *endotelio-céntrico* del cáncer pone el énfasis en que la base para las diferencias entre la fisiología del tejido tumoral y del tejido normal se encuentra en la vasculatura tumoral, compuesta de dos tipos de vasos: los vasos preexistentes en el tejido normal invadido por el tumor y los microvasos que surgen por angiogénesis estimulada por factores producidos por las células tumorales.<sup>96</sup>

Los vasos sanguíneos tumorales resultantes son arquitectónica y estructuralmente anormales.<sup>235</sup> Son vasos muy irregulares, tortuosos y dilatados, con diámetro irregular. Presentan numerosas ramificaciones y conexiones arterio-venosas, fondos ciegos, carecen muchas veces de musculatura lisa acompañante o de inervación y tienen alineamientos endoteliales y láminas basales incompletas. Además, las células endoteliales tienen formas anormales y crecen unas sobre otras, proyectándose hacia la luz del vaso.<sup>96,114,185,235,292,648</sup>

Como resultado de todo ello, el flujo sanguíneo es irregular y, funcionalmente, los vasos presentan una permeabilidad vascular aberrante.<sup>96,114,185,235,355,647</sup> Estas condiciones disminuyen la efectividad terapéutica, modulan la producción de factores pro- y anti-angiogénicos y seleccionan las células cancerosas más malignas y metastásicas.<sup>114</sup>

Los vasos linfáticos funcionales suelen estar ausentes en el interior de un tumor y agrandados en su periferia. Estos vasos linfáticos periféricos

agrandados pueden coleccionar fluido intersticial y células cancerosas que se liberan de la superficie del tumor, facilitando así la metástasis linfática.<sup>114</sup>

### **Las nuevas estrategias terapéuticas antineoplásicas basadas en el enfoque endotelio-céntrico.**

Como ya queda dicho, el estudio de la angiogénesis no es sólo de interés biológico sino que también puede contribuir a un diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas.<sup>235</sup> Sólo en los últimos años, el conocimiento de la fisiología endotelial y de los mecanismos de angiogénesis tumoral han proporcionado la base conceptual necesaria para el desarrollo de estrategias antiangiogénicas efectivas.<sup>210,235,770</sup> Este enfoque tiene muchas ventajas sobre las terapias convencionales, incluyendo la directa accesibilidad a través de la circulación. Además, como el endotelio es genéticamente estable, la aparición de fenómenos de resistencia a fármacos es menos probable.<sup>69,382</sup> Por lo demás, cabría esperar que los efectos secundarios fueran poco importantes, dado que la angiogénesis en adultos está restringida.

A partir de los primeros ensayos clínicos, han emergido ciertos principios generales, que Folkman propone como guía para el uso terapéutico de inhibidores de angiogénesis en una influyente revisión sobre el tema:<sup>226</sup>

1. La terapia antiangiogénica suele tener baja toxicidad. Se dirige principalmente sobre células endoteliales capilares proliferantes y no provoca supresión de la médula, síntomas gastrointestinales o pérdida de cabello.
2. Su eficacia óptima parece obtenerse con tratamiento diario o intermitente durante largos períodos de tiempo (meses a un año) sin interrupciones en la terapia.
3. La aparición de fenómenos de resistencia a fármacos no ha sido un problema significativo en estudios con animales a largo plazo o en ensayos en fases I y II.
4. Se están empleando métodos cuantitativos para monitorizar la eficacia de la terapia antiangiogénica en fase clínica.

5. Una combinación de terapia antiangiogénica y terapia citotóxica puede ser curativa en animales portadores de tumor para los cuales cada estrategia por separado es sólo inhibidora.

Como el bloqueo del crecimiento tumoral requiere una inhibición crónica del reclutamiento vascular, definido por Hanahan y Folkman como "angiostasis",<sup>306</sup> es necesario que el tratamiento sea a largo plazo. Por tanto, se necesita identificar y caracterizar moléculas angiostáticas con baja o nula toxicidad. Se entiende por *quimioprevención del cáncer* el uso de agentes que disminuyan la progresión de la carcinogénesis, produzcan su reversión o su inhibición, con la intención de disminuir el riesgo de desarrollar una enfermedad invasiva o clínicamente relevante.<sup>671</sup> Los agentes quimiopreventivos pueden interferir con el proceso angiogénico en distintas fases de la carcinogénesis. El encendido del *interruptor angiogénico* que ocurre en fases tempranas preneoplásicas podría ser bloqueado por agente *angiopreventivos* antes que cambios fenotípicos y moleculares produjeran una progresión desde la displasia al cáncer invasivo.<sup>717</sup>

Sin embargo, en contraste con los estudios que emplean *xenografts* (tumores de una especie -normalmente, humanos- implantados en otra especie -normalmente, ratones de laboratorio), en los que se han observado "curas", las respuestas en los ensayos de las terapias antiangiogénicas de primera generación no han mostrado muchos signos de regresión. Aunque esta falta de efectos puede ser en parte consecuencia de los "*clinical endpoints*" medidos,<sup>235,236</sup> otra explicación es que los tumores humanos emplean múltiples mecanismos para establecer un aporte sanguíneo, posibilitando la subversión de estos tratamientos. Además, no está clara la razón por la cual los tumores grandes son menos sensibles que los menores a fármacos anti-angiogénicos, aunque una posibilidad es que en los tumores grandes predominen vasos más maduros y en los menores predominen vasos nuevos, siendo los vasos maduros mucho menos susceptibles a una terapia diseñada para ser selectiva frente a una vasculatura proliferante e inmadura.<sup>114</sup> Por tanto, una comprensión detallada de los mecanismos implicados en la angiogénesis humana es esencial para diseñar terapias más efectivas.

## **Analogías funcionales entre angiogénesis tumoral, invasión tumoral y metástasis.**

Las analogías funcionales entre invasión tumoral y metástasis, por una parte, y angiogénesis, por otra, han sido puestas en evidencia.<sup>457,789</sup> En ambos casos, el proceso global es el resultado de un desequilibrio entre elementos de regulación positiva y negativa. Para que la progresión tumoral tenga lugar, el cáncer tiene que adquirir un *fenotipo invasivo* que dota a las células tumorales de unas capacidades proliferativas, migratorias y de invasión y remodelado de la matriz extracelular similares a las que presentan las células endoteliales angiogénicas.<sup>457,789</sup> Como ya queda dicho, la metástasis es dependiente de angiogénesis en dos etapas. Ahora bien, las relaciones funcionales y de dependencia entre angiogénesis y metástasis pueden inducir a ciertas confusiones. Así, ya en su famoso editorial de 1990, Folkman señalaba que la capacidad de los tumores para inducir angiogénesis no siempre se correlaciona con su malignidad y que hay considerable confusión en la literatura sobre este hecho. El adenoma adrenal, por ejemplo, es un tumor benigno que es altamente angiogénico.<sup>224</sup> Sin embargo, está firmemente establecido que para diversos tipos de tumores, como el carcinoma de mama, la densidad vascular puede servir como variable pronóstica independiente, de forma que densidades vasculares significativamente incrementadas son un fiable indicio de mayor grado de metástasis y menor expectativa de supervivencia.<sup>195,789</sup>

El término *metástasis* fue introducido en la literatura científica en 1829 por Joseph Claude Récamier, médico francés que describió por primera vez la infiltración local, la invasión de las venas por el tejido canceroso y la aparición de tumores secundarios en el cerebro de pacientes con cáncer de mama.<sup>597</sup> En 1889, Paget se preguntó: "¿Qué es lo que decide qué órganos sufrirán metástasis en caso de un cáncer diseminado?" Su estudio estaba motivado por las discrepancias entre las consideraciones de flujo sanguíneo y las frecuencias de metástasis encontradas en diferentes órganos. Después de examinar los informes de la autopsia de 735 mujeres que murieron de cáncer de mama y de muchos otros pacientes con diferentes neoplasias, concluyó que las metástasis sucedían sólo cuando ciertas células tumorales

favorecidas (la "semilla") tenían una especial afinidad para el medio de crecimiento proporcionado por ciertos órganos específicos ("el "suelo"). Por tanto, la formación de metástasis requeriría la interacción de las células neoplásicas adecuadas con el medio tisular compatible con su establecimiento y proliferación. Una definición actual de la hipótesis de la "semilla y el suelo" consta de tres principios. 1) Las neoplasias son biológicamente heterogéneas y contienen subpoblaciones de células con diferentes propiedades angiogénicas, invasivas y metastásicas. 2) Aunque algunos de los pasos del proceso contienen elementos estocásticos, la metástasis como un todo favorece la supervivencia y el crecimiento de unas pocas subpoblaciones de células que preexistían en el tumor primario. Por tanto, la metástasis puede tener un origen clonal y diferentes metástasis se pueden originar a partir de la proliferación de diferentes células. 3) La progresión de la metástasis depende de múltiples interacciones de las células metastásicas con mecanismos homeostáticos que las células tumorales pueden usurpar.<sup>212</sup>

### **El modelo de la invasión del trofoblasto.**

La invasión del endometrio por el trofoblasto durante la implantación del embrión ha sido utilizada en ocasiones como sistema modelo para estudiar los procesos de invasión.<sup>515</sup> La implantación del embrión se puede dividir en fases distintas y separadas, relacionadas con la progresión del desarrollo del embrión. Estas fases de implantación en el ser humano comienzan en la fertilización y el crecimiento del embrión en sus primeras fases. El endometrio materno debe servir como huésped para el conceptus en desarrollo durante toda la duración del embarazo. Empezando como una única célula, el óvulo fertilizado se divide rápidamente y, eventualmente, el trofoblasto invade, de una forma controlada y ordenada, interactuando primero con los componentes epiteliales y luego con los componentes estromático y endoteliales del endometrio. Es fácil encontrar similitudes entre este evento central en la reproducción y el crecimiento y diseminación de un tumor. Sin embargo, la invasión del endometrio por el trofoblasto durante la implantación del embrión es un proceso altamente regulado. En

contraste, la progresión tumoral y la metástasis están frecuentemente desregulados.

Los primeros eventos de la implantación ocurren dentro de una estrecha franja temporal y están dictados por el estado de desarrollo del endometrio. En los humanos, el embrión entra en la cavidad uterina 72-96 horas después de la fertilización.<sup>147</sup> En un ciclo menstrual normal, el crecimiento del endometrio empieza 2-3 semanas antes en respuesta a un aumento de los estrógenos en suero causado por los folículos en desarrollo. Con la ovulación, el endometrio sufre una transformación secretora en respuesta a la subida en los niveles de progesterona y hormonas peptídicas del nuevo corpus luteum.<sup>87</sup> Al comienzo de la fase secretora, el alineamiento endometrial parece representar una barrera para la implantación.<sup>143</sup> Los embriones en esta fase son capaces de implantarse en casi cualquier sitio del cuerpo, salvo en el útero y mantienen todas sus capacidades intrínsecas para fijarse, migrar e invadir.<sup>509</sup> Esta circunstancia se pone de manifiesto en las mujeres por el hecho de que ocurran embarazos ectópicos con crecimiento e invasión en las trompas de Falopio, ovarios, o cérvix. Por tanto, aunque los embriones poseen capacidad de invadir, el endometrio puede a la vez facilitar y limitar este proceso.

La receptividad endometrial se alcanza normalmente hacia los días 20-24 de un ciclo menstrual de 28 días<sup>61</sup> y se caracteriza por la adquisición de marcadores proteicos específicos, siendo los mejor caracterizados las integrinas endometriales. La aposición del embrión a las células epiteliales que recubren la cavidad uterina (fase IV de la implantación) es rápidamente seguida por la penetración y subsiguiente invasión del epitelio (fase V). Ocurren cambios dinámicos tanto en la matriz extracelular del trofoblasto como del endometrio durante la implantación.<sup>757</sup>

El embrión que se está implantando tiene otro aspecto en común con la progresión tumoral y la metástasis: requiere garantizar, como éstos, un aporte sanguíneo adecuado para crecer; es decir, la implantación del embrión también es dependiente de angiogénesis, aunque en este caso se trata de una angiogénesis fisiológica, finamente regulada y transitoria.

## ENFERMEDADES NO NEOPLÁSICAS Y ANGIOGÉNESIS

### Enfermedades oftálmicas dependientes de angiogénesis.

La angiogénesis ocular es responsable de la mayor parte de los casos de ceguera irreversible diagnosticados en el primer mundo.<sup>437</sup> Los procesos de angiogénesis ocular pueden implicar la neovascularización de la córnea, el iris, la retina y la coroides y provocan desórdenes funcionales en el ojo que contribuyen a la pérdida de visión asociada a patologías tan diversas y extendidas como el tracoma, la retinopatía diabética, la retinopatía de prematuridad, el glaucoma neovascular, o la degeneración de la mácula relacionada con la edad, entre otras.<sup>3</sup>

La neovascularización de la córnea causa pérdida de la visión a través de diversos mecanismos. Asociados a los nuevos vasos, aparece un epitelio anormal que recuerda a la conjuntiva. Dicho epitelio produce una superficie con malas capacidades refractivas, dando como resultado una degradación de la imagen visual. Además, la hiperpermeabilidad de los vasos favorece que se depositen lípidos en el estroma corneal subyacente, obstaculizando el eje visual. Finalmente, en estados avanzados de la neovascularización, los vasos pueden crecer hacia el centro de la córnea, distorsionando directamente la luz incidente. Los principales estímulos para la neovascularización de la córnea son su inflamación por agentes infecciosos o no, la hipoxia (asociada mayoritariamente al uso de lentes de contacto) y la destrucción de las células madres del limbo. La primera causa de ceguera en el mundo es el *tracoma*, una enfermedad infecciosa en la que se produce una densa conjuntivación, queratinización y neovascularización de la córnea.<sup>3</sup>

La neovascularización del iris, clásicamente denominada *rubeosis iridis*, es casi siempre secundaria a una isquemia de la retina, por lo que suele aparecer en asociación con fenómenos de oclusión de las venas retinianas, en casos de retinopatía diabética avanzada y en tumores oculares angiogénicos como el retinoblastoma.<sup>3,437,643</sup>

La neovascularización de la retina puede ser intra-retinal o extra-retinal. En el primer caso, los nuevos vasos se extienden desde la retina interna hacia el humor vítreo avascular. La localización anatómica de los

nuevos vasos es distinta en el segundo caso, pero en ambos casos los vasos generados son aberrantes, no presentan la típica estructura fractal de las redes capilares normales, muestran hiperpermeabilidad y suelen presentar asociados a ellos un tejido de naturaleza fibrosa. Estos fenómenos están asociados a una respuesta a la isquemia en la que se hallan implicados diversos factores de crecimiento, moléculas de adhesión a la matriz extracelular y "productos finales de glicosilación avanzada" (AGEs), considerados estos últimos factores particularmente relevantes en la aparición de desórdenes vasculares asociados a la diabetes.<sup>3,119,152,156,245</sup> Asociada a los fenómenos de neovascularización, hay una pérdida significativa de masa neuronal de la retina por apoptosis.<sup>451</sup>

Finalmente, la neovascularización de la coroides es la peor estudiada. Ocurre en menos del 10% de los casos de degeneración macular, pero es la causa de la mayoría de las pérdidas severas de visión asociadas a esta enfermedad, primera causa de ceguera en los ancianos.<sup>3,152</sup>

### **Enfermedades inflamatorias dependientes de angiogénesis.**

La inclusión de diversas enfermedades inflamatorias crónicas dentro del grupo de patologías dependientes de angiogénesis es esperable, dadas las claras conexiones entre la inflamación crónica y la angiogénesis desregulada.<sup>114,226</sup>

Diversas patologías inflamatorias musculo-esqueléticas implican la degeneración progresiva del tejido conectivo de las articulaciones, produciendo dolor, disminución de las capacidades de movimiento y, eventualmente, pérdida de movilidad.<sup>550</sup> El sitio primario de inflamación en estas patologías es el *sinovio*, que recubre los espacios cerrados de la uniones articulares. Normalmente, el sinovio está constituido por una matriz bien organizada formada por numerosas microfibrillas y agregados de proteoglicanos. Dentro de esta estructura se encuentran las células sinoviales y una densa red microvascular de capilares y vasos linfáticos. Entre el sinovio y el cartílago hay un líquido hipocelular (el *fluido sinovial*) que nutre y lubrica la articulación. En el hueso subcondral hay una segunda red vascular que normalmente no atraviesa el cartílago articular, que permanece avascular. La

*artritis reumatoide* es una enfermedad autoinmune asociada a inflamación sistémica crónica y que suele afectar a cuatro o más articulaciones. Durante la evolución de la artritis reumatoide, la región sinovial es infiltrada por células de origen linfohematopoyético, el fluido sinovial se enriquece en leucocitos polimorfonucleares y aumenta su volumen por edema, produciendo hinchazón y dolor en las articulaciones. Además, se produce una abundante hiperplasia de las células sinoviales, de forma que el sinovio aumenta su espesor pasando de ser una capa de 1-2 células a ser una capa de 6-8 células, generando un tejido de granulación fibrovascular muy infiltrado denominado *pannus*. La red vascular sinovial sufre una profunda reorganización, conduciendo a una disminución en la densidad vascular adyacente al espacio articular y un incremento en la densidad vascular, por angiogénesis, en las capas profundas del sinovio. El *pannus* prolifera e invade el cartílago articular y el hueso subyacente, conduciendo de esta manera a una destrucción irreversible de la articulación.<sup>137,208,745</sup> Más prevalente aún que la artritis reumatoide es la *osteoartritis*, caracterizada por cambios patológicos que suelen afectar a una o más de las articulaciones de las extremidades inferiores que soportan el peso corporal. En la *osteoartritis* también hay una reorganización de la red vascular del sinovio. Sin embargo, en vez de una invasión y destrucción de cartílago y hueso por el *pannus*, en la *osteoartritis* se produce una invasión vascular del cartílago en el osteofito y en las uniones osteocondrales, produciendo una pérdida de espacio articular y un aumento de la osificación endocondral.<sup>550,745</sup> Otras enfermedades asociadas a una inflamación sinovial son las espondilartropatías seronegativas y la artritis séptica.<sup>745</sup>

Los pulmones son órganos vitales altamente especializados para maximizar el intercambio gaseoso. Poseen una doble circulación. La circulación sistémica bronquial proporciona los requerimientos metabólicos y la circulación pulmonar lleva la sangre desoxigenada hasta la interfase de los alvéolos, donde se produce el intercambio gaseoso, y devuelve la sangre reoxigenada al corazón para que, desde aquí, se distribuya a todo el cuerpo. En un pulmón sano ambas circulaciones están altamente organizadas, finamente reguladas y se dan escasas anastomosis entre ambas. Cada compartimento del pulmón se puede afectar por inflamación crónica. La

inflamación de las paredes del árbol respiratorio produce una limitación del flujo de aire, que puede ser variable (es el caso del *asma*) o fija. La inflamación del parénquima pulmonar puede producir engrosamiento de los septos alveolares o relleno de los espacios alveolares con tejido de granulación y subsiguiente fibrosis. Los pacientes con patologías reumáticas tienen mayor susceptibilidad, y -por tanto- mayor probabilidad, de sufrir enfermedades pulmonares inflamatorias.<sup>697,745</sup>

### **Enfermedades de la piel y otras dependientes de angiogénesis.**

Aunque se produce angiogénesis transitoria durante diversos procesos fisiológicos en la piel, como la fase anagénica del ciclo capilar, una angiogénesis persistente y mantenida está asociada a diversas patologías cutáneas, como la *rosácea*, la *psoriasis* o el carcinoma de células basales.<sup>65,114,226,491</sup> Entre las enfermedades dermatológicas no neoplásicas, sólo se ha estudiado la implicación de la angiogénesis con cierto detalle en el caso de la *psoriasis*.<sup>59,65,144</sup> Los cambios microvasculares se manifiestan ya en estadios tempranos de la evolución de una placa psoriática e incluyen aumentos en la permeabilidad, dilatación y tortuosidad de los vasos, así como aumento de la proliferación endotelial en el limbo venoso de los capilares de las papilas dérmicas.<sup>65,83</sup>

Los órganos reproductores femeninos son algunos de los tejidos adultos que exhiben intervalos regulares de crecimiento rápido, con altas tasas de vascularización. La angiogénesis es, por tanto, esencial en la función fisiológica de estos tejidos. Sin embargo, disfunciones de este proceso angiogénico pueden conducir a diversas patologías del aparato reproductor femenino, siendo la *endometriosis* la que manifiesta mayor prevalencia.<sup>483,600</sup> La *endometriosis* consiste en la implantación ectópica del tejido endometrial sobre las superficies peritoneales. Se trata de una enfermedad crónica y recurrente que afecta al 10% de la población femenina en edad fértil y que representa una de las causas más comunes de dismenorrea, infertilidad y dolor pélvico crónico.

La angiogénesis también puede estar implicada en problemas biomédicos de muy elevada prevalencia, tales como la obesidad, la

aterosclerosis o la enfermedad de Alzheimer.<sup>114,226,356</sup> El tejido adiposo es altamente angiogénico y los preadipocitos tienden a migrar a sitios de neovascularización.<sup>226,659,661</sup> Estos hechos sugieren fuertemente que la angiogénesis puede contribuir a favorecer una acumulación excesiva de grasas en los individuos obesos.<sup>226,356</sup> En el caso de las placas ateroscleróticas, la hipoxia que puede producirse en su interior puede generar una respuesta angiogénica que conduzca a un crecimiento de la placa y a un aumento del riesgo de ruptura hemorrágica de la misma, con los consiguientes fenómenos de trombosis.<sup>226,356,371,512</sup> En cuanto a la enfermedad de Alzheimer, sus bases patológicas permanecen aún inciertas, a pesar del enorme esfuerzo investigador desarrollado durante las pasadas décadas.<sup>646</sup> Se ha propuesto como hipótesis que las células endoteliales vasculares del cerebro podrían tener un papel crucial en la destrucción progresiva de las neuronas corticales que se produce en la enfermedad de Alzheimer.<sup>731</sup> Los resultados de diversos estudios epidemiológicos sugieren que el empleo crónico de ciertos fármacos disminuye el riesgo de padecer la enfermedad en poblaciones de alto riesgo.<sup>349,362,731</sup> Muchos de tales fármacos son antiinflamatorios no esteroides, pero también hay bloqueadores de receptores de histamina tipo H<sub>2</sub>, inhibidores de canales de calcio y diversas estatinas. No todos estos fármacos resentan actividad anti-inflamatoria pero todos sí tienen actividad antiangiogénica.<sup>731</sup>

### **Angiogénesis terapéutica.**

Hasta aquí se han mencionado diversas patologías dependientes de angiogénesis. Para todas ellas, es esperable que una estrategia antiangiogénica sea una aproximación terapéutica válida, de forma similar a como se ha discutido en el caso del cáncer. Pero también existe toda una extensa lista de enfermedades asociadas a deficiencias en el suministro sanguíneo, para las cuales una estimulación controlada de la angiogénesis podría ser una interesante alternativa terapéutica. Se ha acuñado la expresión *angiogénesis terapéutica* para referirse a dicha alternativa con la que podrían tratarse diversas patologías asociadas a deficiente riego sanguíneo.

La angiogénesis terapéutica podría, muy evidentemente, servir en el tratamiento de cardiomiopatías isquémicas y otras enfermedades vasculares,<sup>114,351,356</sup> de la neuropatía periférica isquémica,<sup>7</sup> de diversas enfermedades neurodegenerativas,<sup>114,356</sup> de la enfermedad renal progresiva<sup>375</sup> e, incluso, en el tratamiento de la calvicie.<sup>356,491</sup> Por otra parte, como ya se ha mencionado, una angiogénesis regulada y transitoria forma parte de los mecanismos fisiológicos de respuesta para el sellado de las heridas y para la reparación de fracturas óseas. Por tanto, una estimulación terapéutica de la angiogénesis podría representar un procedimiento utilizable para acelerar el sellado de heridas en la piel causadas por accidente o intervenciones quirúrgicas, así como para acelerar los procesos de reparación de fracturas de huesos y de sellado de úlceras de estómago y duodeno.<sup>226,271,356</sup>

AULA ABIERTA UJMA