

# Nuevos abordajes en cáncer dirigiendo el Factor Tisular a blancos vasculares tumorales

## *New approaches in cancer therapies targeting Tissue Factor to tumor vessels*

Federico Ludwig Herrera Alemán\* y Roberto Contreras Martín†

**RESUMEN.** La presente revisión se basa en el hecho de que el Factor Tisular, la proteína humana inductora de la coagulación, es el principal iniciador de la coagulación sanguínea. El objetivo de este trabajo fue revisar la literatura en angiogenesis, como nuevo abordaje en las terapias en cáncer y así también la factibilidad de tratar tumores sólidos dirigiendo el Factor Tisular humano contra blancos vasculares endoteliales del tumor, como nuevas terapias en cáncer. Mostrando en un modelo animal la efectividad del factor tisular, que en el abordaje generaron trombosis selectiva en tumores sólidos e inhibición del crecimiento tumoral, con la subsiguiente regresión, necrosis e infarto del tumor, usando para ello diferentes líneas celulares tumorales xenotransplantadas en ratones. Analizando la caracterización del factor tisular recombinante (rTF) fusionado con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y péptidos que reconocen y hacen blanco en los marcadores naturales de vasos tumorales y que son altamente expresados en las células endoteliales tumorales no así en tejidos normales. **Conclusión:** este trabajo trata de mostrar la inhibición efectiva del crecimiento de tumores humanos en vivo dirigiendo el tTF fusionado, contra

marcadores naturales de la angiogenesis tumoral con el objetivo de generar coagulación intraluminal sanguínea selectiva de los vasos tumorales.

**Palabras clave:** *Angiogenesis. Blancos vasculares. Factor tisular. Marcadores tumorales naturales.*

**ABSTRACT.** This review paper focuses on the fact that the human coagulation inducing protein tissue factor, is the major initiator of blood coagulation. The aim of this work was to review the literature on angiogenesis as a new approach in cancer therapies and the feasibility of treating human solid tumors by targeting human tissue factor on tumor vascular endothelium in a mouse model, as a new treatment for cancer. To show how the tissue factor fused protein activates coagulation in tumor vasculature in an animal model, the efficacy of the tissue factor coaguligand as a cancer therapy and to review how selective thrombosis of treated solid tumors should lead to regression and inhibition of tumor growth with the subsequent necrosis and infarction of the tumor tissue, using for that different cancer cell lines. Characterization of tTF-fused proteins, with antibodies, fragments of antibodies, peptides to target selective natural markers in angiogenesis which are high expressed in endothelial tumoral cells but not in normal tissues. **Conclusion;** This work shows the effective in vivo

\* Médico residente en hematología-oncología, Westfaelische Wilhelm Universitaet Muenster, Alemania.

† Neurocirujano, Hospital Mario Catarino Rivas, San Pedro Sula.

Dirigir correspondencia a: Federico Ludwig Herrera. Correo electrónico: ludwigha@hotmail.com

**inhibition of human tumor growth targeting tTF fused proteins to natural markers of angiogenesis in tumor endothelial cells by means of selective intraluminal blood coagulation in the tumor vasculature.**

**Keywords:** *Angiogenesis. Tissue factor. Tumoral natural markers. Vascular targets.*

## INTRODUCCIÓN

A partir de los años 90, el mundo médico científico dirigió las investigaciones contra el cáncer basados en nuevas y novedosas terapias enfocadas a interrumpir el proceso de la angiogenesis tumoral endotelial, impidiendo o interrumpiendo la formación de nuevos vasos así como también alterando o destruyendo los vasos ya formados, con la subsiguiente necrosis e infarto tumoral.

La neovascularización es necesaria para la expansión constante del tumor debido a que es el proceso que provee de suficientes nutrientes y oxígeno así como también para la eliminación de productos de desecho. Un fenotipo angiogénico es el requerimiento absoluto para la progresión tumoral.<sup>1</sup>

Las terapias anti-angiogénicas interfieren con el complejo proceso de crecimiento, migración y diferenciación de los vasos sanguíneos, evitando o inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. En contraste, cada vez hay más estudios dirigidos a hacer blanco en los vasos sanguíneos tumorales para liberar en forma selectiva sustancias con la finalidad de destruir los vasos sanguíneos tumorales con el infarto tumoral resultante.

Los blancos vasculares requieren de la identificación como moléculas presentes en densidad suficiente en la superficie endotelial vascular de los tumores sólidos pero ausente de las células endoteliales en tejidos normales. Dichas moléculas podrían ser utilizadas para hacer blanco con agentes citotóxicos en el tejido endotelial tumoral en vez de contra las células tumorales mismas.

Moléculas prometedoras incluyen el  $\beta$ FGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), el VEGF-2, endoglinas, endosialinas, una isoform

ma de la fibronectina (ED-B domain), las integrinas;  $\alpha\beta_3$ ,  $\alpha\alpha\beta_5$ ,  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ , la aminopeptidasa N, el proteoglicano NG-2, la matrix métalo proteinaza 2 y 9 (MP-2, MP-9) así como muchos otros.<sup>2-14</sup>

El factor tisular es el iniciador principal de la cascada de la coagulación en forma fisiológica, basados en este principio los investigadores han logrado hacer blanco con el factor tisular truncado (tTF) en marcadores naturales de las células endoteliales tumorales, generando así la activación selectiva de la coagulación sanguínea en los vasos tumorales con la subsiguiente necrosis tumoral como un manejo alternativo y novedoso, utilizando blancos vasculares en tumores.

## ANGIOGENESIS

Angiogenesis es el proceso de configuración y brote de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos ya existentes, el sistema hemostático mantiene el flujo líquido de la sangre, regulando la adherencia plaquetaria y los depósitos de fibrina. Ambos sistemas aparecen normalmente inactivos pero ambos permanecen listos para la reparación de una lesión. Al lesionarse un vaso una secuencia rápida de reacciones debe ocurrir para ocluir el defecto de la pared del vaso y prevenir la hemorragia. Las plaquetas activadas demarcan los límites del defecto y forman una barrera provisional que es rápidamente embebida con fibrina polimerizada. Inicialmente esta estructura del coágulo requiere células vasculoendoteliales inmóviles para estabilizar el coágulo y evitar hemorragias futuras. Posteriormente, las células endoteliales en los límites del coágulo se vuelven móviles, desmantelando e invadiendo la estructura entrelazada de fibrina para reconstruir una nueva pared sanguínea.<sup>15</sup>

## REGULADORES DE LA ANGIOGENESIS

Los reguladores positivos y negativos que controlan el delicado balance de la reactividad plaquetaria y los depósitos de fibrina han sido elucidados en las últimas 4 décadas, proteínas análogas que controlan el crecimiento e inhibición de las células endoteliales han sido descubiertas en la última década. La hemostasia y angiogenesis se han convertido en proteínas cada vez más interrelacionadas generadas por el sistema hemostático, coordinando la localización espacial y secuencia temporal del

coágulo, de la estabilización de las células endoteliales seguidas por células endoteliales en crecimiento y reparación del vaso sanguíneo lesionado.<sup>15</sup>

En el sitio de lesión del vaso, las plaquetas adheridas secretan reguladores de la angiogenesis positivos y negativos, la mayoría desde los gránulos alfa internos. Los reguladores positivos incluyen entre otros: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-A), el factor de crecimiento vascular endotelial C (VEGF-C), el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (BFGF), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), la angiopoyetina-1, el factor de crecimiento tipo insulínico 1 y 2 (IGF-1-2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y la esfingosina-1-fosfato.<sup>16-24</sup>

Numerosos investigadores han evaluado clínicamente la presencia de péptidos angiogénicos, en particular bFGF y VEGF en los fluidos corporales, en un esfuerzo por explorar la utilidad de estas mediciones como parámetros clínicos potenciales. Muchos de estos estudios son exploratorios y por ende no consistentes, sugiriendo que probablemente existe una correlación entre los niveles detectables de estos péptidos y la presentación clínica. Como sea, la confirmación en estudios clínicos prospectivos de tamaño adecuado es necesaria.

Por otro lado se ha encontrado una correlación relativamente buena entre los niveles de BFGF sérico pero no en orina, así como el estadio o grado del tumor en un pequeño número de pacientes con carcinoma de células renales.<sup>25</sup> Más recientemente, se ha encontrado una correlación significativa de la sobre producción de VEGF y su receptor celular KDR (VEGF-2) y del factor de crecimiento básico del fibroblasto (BFGF), por estimulación autocrina en la médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda.<sup>26-27</sup>

### ANGIOGENESIS EN CANCER

La angiogenesis representa un papel crítico en el desarrollo de cáncer. Tumores sólidos menores de 1 a 2 milímetros cúbicos no tienen la vascularidad suficiente para expandirse, ellos necesitan ser suplidos por vasos sanguíneos que les administren oxígeno y nutrientes y eliminen los desechos metabólicos. El desarrollo de nuevos vasos

sanguíneos es un proceso importante en la progresión tumoral, favorece la transición de una hiperplasia a neoplasia así como el cambio de un estado de multiplicación celular a un estado de proliferación no controlada característica de las células tumorales.

Hace 100 años, los investigadores observaron que la angiogenesis ocurre alrededor de los tumores.<sup>28-29</sup> En 1971 fue propuesto que los tumores que crecen mas allá de 1 a 2 mm en tamaño y las metástasis son dependientes de la angiogenesis, de allí que el bloquear la angiogenesis podría ser una estrategia de tratamiento para detener el crecimiento tumoral.<sup>30-31</sup>

Las células tumorales e infiltrantes como los macrófagos y los fibroblastos activan las células endoteliales, iniciando así la angiogenesis al expresar factores como el VEGF y el BFGF. Una vez que la neovascularización ocurre, el tumor experimenta un crecimiento rápido con incremento del potencial metastático.<sup>32-34</sup>

La Angiogenesis involucra una serie de pasos, que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la organización hasta formar túbulos.<sup>35</sup> Debido a este proceso de estadios, la terapia anti angiogénica puede ser desarrollada contra cualquiera de los estadios en el proceso, pudiendo ser utilizada para detener o inhibir patologías que involucren dicho proceso.<sup>36</sup>

Información reciente sugiere un papel importante de la angiogenesis en patología maligna hematológica. Así entonces, la terapia anti-angiogénica podría constituir una estrategia novedosa no sólo para el tratamiento de tumores sólidos o patologías malignas inflamatorias sino también patologías como la leucemia mieloide aguda.<sup>37</sup>

<sup>38,26,27</sup>

### METASTASIS

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es un proceso importante en la progresión del tumor. La neovascularización influye en la diseminación de las células cancerígenas a través de todo el cuerpo, dirigiendo eventualmente la formación metastásica.

Se ha sugerido en el pasado que el crecimiento de tumores sólidos primarios es estrictamente dependiente de la

habilidad de estos para inducir angiogenesis desde los vasos sanguíneos alrededor del tumor, de tal manera que la progresión del tumor incluyendo la invasión y metástasis, involucre diferentes fases, la fase pre vascular y vascular.<sup>39</sup> Se ha observado también que la resección del tumor primario puede ser seguido por una rápida manifestación de metástasis, sugiriendo que el tumor primario puede inhibir el crecimiento metastático, de allí que el cambio a un fenotipo angiogénico dependa de toda la red equilibrada de estimuladores de la angiogenesis como de inhibidores. El desarrollo de la metástasis es así grandemente influenciada por la angiogenesis.<sup>40</sup> Entonces, desde que el crecimiento de tumores primarios ha sido frecuentemente controlado con cirugía y/o radiación, los agentes anti-angiogénicos podrían ser los más benéficos en el tratamiento de la enfermedad metastásica diseminada. Aunque entendiendo algunos principios; la terapia anti-angiogénica puede necesitar ser ofrecida desde un enfoque crónico, pues este tipo de terapia no es citotóxica, sino mas bien previene el crecimiento posterior del tumor, segundo, el punto final de la terapia anti-angiogénica no será la destrucción tumoral sino más bien la estabilización del tumor;<sup>41</sup> reconociendo que la angiogenesis no es sino un eslabón en el proceso de metástasis.<sup>42</sup> Algunos investigadores hicieron ya blanco en los vasos sanguíneos tumorales en vivo y en forma selectiva, usando marcadores tumorales naturales de la angiogenesis con resultados de relevancia terapéutica.<sup>43-46</sup>

También se asume que la terapia anti-angiogénica de cualquier tipo, debe de ser ofrecida por el resto de la vida del paciente, o por lo menos durante muchos años, aunque algunos investigadores han mejorado los resultados después de 185 días de tratamiento cíclico de tumores grandes en ratones seguido por la detención permanente del crecimiento tumoral durante el cual los tumores permanecieron en tamaños microscópicos y en forma inactiva, con bloqueo de la angiogenesis aun después que la terapia fue discontinuada.<sup>47</sup> Sugiriendo así, que la terapia cíclica podría no ser necesaria para lograr el estado durmiente o inactivo del tumor.

Las Integrinas han sido identificadas como moléculas clave adicionales de la angiogenesis tumoral, estas integrinas juegan un papel pivote en la mediación célula-célula y célula-matriz, interacciones de componentes esenciales para la angiogenesis tumoral y la metástasis.<sup>48-52</sup> Ciertas

integrinas (Ej.  $\alpha v \beta_3$ ,  $\alpha v \beta_5$  y otras) son específicas y selectivamente expresadas en los vasos sanguíneos tumorales en densidades elevadas, pero fuera del tracto reproductivo femenino, estas integrinas bajo condiciones fisiológicas no son expresadas en las células endoteliales (Ecs).

Basado en las observaciones de que la expansión de una masa tumoral fue limitada en ausencia de angiogenesis, evidencia experimental considerable apoyando este concepto ha sido reunida como los mecanismos de inhibición de la angiogenesis:

- Separación mecánica de las células tumorales de la cama vascular mas cercana.<sup>53</sup>
- Bloqueo de los factores angiogénicos derivados del tumor.<sup>54</sup>
- Administración de inhibidores de la angiogenesis.<sup>55</sup>
- Producción endógena de inhibidores angiogénicos propios de las células tumorales.<sup>56-57</sup>
- Demostración del fenotipo pre-angiogénico en tumores espontáneos.<sup>58</sup>

## ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO ANTI-ANGIOGENICO

El principal blanco para la terapia anti-angiogénica es representada por células endoteliales proliferantes (Ecs), que a excepción del tracto reproductivo femenino están en un estado quiescente en los tejidos normales. Sólo una de 10.000 Ecs (0.01%) está en división celular en determinado momento.<sup>59-60</sup> Como respuesta a ciertos estímulos las células endoteliales (Ecs) dejan el estado quiescente y proliferan tan rápido como las células hematopoyéticas de la médula ósea o tan rápido como las células epiteliales de la mucosa del tracto gastrointestinal, lo anterior basados en el conocimiento actual de la angiogenesis, el cual es un complejo proceso de proliferación de las células endoteliales, degradación selectiva de la membrana basal, de la matriz extracelular y la migración subsiguiente de las células endoteliales.<sup>61</sup>

Las siguientes estrategias anti-angiogenesis están actualmente bajo investigación:

- Interferencia de receptores de unión o de la activación de algún factor particular angiogénico
- Inhibición de la liberación de algún factor angiogénico particular de las células tumorales
- Estimulantes de la producción o acción de

inhibidores angiogénicos, siendo similar o idéntico a inhibidores angiogénicos particulares

- Interfiriendo con los procesos de transducción de señal mediante la activación autocrina / intracrina de células endoteliales capilares
- Inhibiendo la degradación de la matriz por enzimas degradantes de las proteasas de la matriz.<sup>62-63</sup>

### **ABORDAJES DEL TRATAMIENTO GENETICO EN ANGIOGENESIS**

Basados en la inhibición angiogénica por terapia genética, Lin et al, utilizó un adenovirus como vector para transportar un receptor recombinante del Tie-2 y bloquear la activación del receptor Tie-2 en las células endoteliales. Más importante, la liberación del receptor recombinante Tie-2 pegado al adenovirus al momento de la resección quirúrgica de tumores primarios inhibió el crecimiento metastático subsiguiente, demostrando que la terapia genética dirigida contra el receptor Tie-2 en las células endoteliales inhibe la angiogenesis tumoral.<sup>64</sup> Goldman et al, reportó el uso de un método de transporte genético en vivo para transfectar células humanas tumorales estables con el cDNA codificando la forma acortada de FLT-1 soluble y nativo, un receptor del factor angiogénico VEGF, el FLT-1 soluble inhibió la función del VEGF.(Ref. 65). Por otro lado los investigadores tienen que considerar la terapia local vrs la terapia genética, anti-angiogénica, sistémica y la terapia directa vrs la terapia genética anti-angiogénica indirecta.<sup>66</sup> También, combinaciones de los inhibidores angiogénicos con quimioterapéuticos citotóxicos convencionales curó tumores en ratones cuando ambas terapias en forma aislada no pudieron alcanzar ese resultado.<sup>67</sup> En el futuro la terapia sistémica anti-angiogénica debería ser utilizada:

- Después de cirugía o después de radioterapia para prevenir recurrencias de metástasis distantes.
- En combinación con quimioterapia convencional
- En combinación con terapia con vacunas o inmunoterapia.
- En combinación con otros tipos de terapia genética, por ejemplo la liberación de genes tumorales supresores.

### **TERAPIA DIRIGIDA A BLANCOS VASCULARES TUMORALES**

Dos tipos de agentes vasculares blanco (VTAs) están actualmente siendo desarrollados para el tratamiento de

cáncer: 1) Las ligandas dirigidas a VTAs, que utilizan anticuerpos y péptidos para dirigir toxinas, pro coagulantes y estimulantes pro apoptóticos contra el endotelio tumoral y 2) Las moléculas pequeñas que localizan el endotelio tumoral no específicamente, pero que explotan diferencias fisiopatológicas entre el tumor y el tejido endotelial normal para inducir la oclusión selectiva de vasos tumorales<sup>68</sup> (ver Cuadro No. 1).

La terapia dirigida a vasos tumorales malignos ha demostrado ser un nuevo y potencial abordaje para el tratamiento de cáncer,<sup>45</sup> y algunas de las ventajas sobre la terapia convencional anti-tumoral celular son:

1. El antígeno blanco es directamente accesible, y la penetración de drogas a través del tejido tumoral, que ha sido definido como el mayor problema en el tratamiento de tumores sólidos, no es necesario.<sup>69-71</sup>
2. Existe un efecto potenciador debido a que eliminando una célula endotelial da como resultado la muerte de miles de células tumorales<sup>72</sup> y el proceso de coagulación es una cascada en la cual una molécula de los factores de la coagulación iniciantes resulta en la generación de millones de moléculas de fibrina por minuto.
3. Las células blanco no parecen adquirir mutaciones genéticas ni desarrollan resistencia a las drogas.<sup>73</sup>

La droga que sea dirigida contra los vasos tumorales puede ser utilizada en múltiples tumores sólidos, debido a que el antígeno blanco deberá estar presente en muchos tumores diferentes, como un marcador con actividad biológica, así también el flujo sanguíneo; que es medible en la clínica y donde será suficiente obtener algunos efectos temporales en la función vascular, también fácil de valorar pues hay estudios que indican que > 99% de las células tumorales en vivo, pueden ser destruidas durante un periodo de isquemia de 2 horas.<sup>74</sup>

Finalmente, a diferencia de los inhibidores de la angiogenesis, los VTAs deberán requerir sólo la administración intermitente para sinergizar con terapias convencionales en vez de la administración crónica por meses o años.

### **EL FACTOR TISULAR RECOMBINANTE COMO NUEVA TERAPIA**

Las Ventajas generales de la fusión de proteínas recombinantes son:

**Cuadro No. 1.** Agentes vasculares

Abordaje con VTA	Compuesto	Observaciones
Ligandas usando TF	Anticuerpo-TF Anti-VCAM1-TF L19 scFv-TF	TF induce coagulación VCAM-1 un marcador de adhesión celular L19 scFv hace blanco en el dominio ED-B de la fibronectina
Ligandas	VEGF-gelonin Anti-endoglina pegado a ricin A Anti-TES-23 pegado a neocarzinostatin L19 scFv-IL-12 L19 scFv-TNF- $\alpha$ Anti-PS Blanqueando el ATP $\mu$ -Raf gene DNA codificando Fik-1 pegado al Fas	Gelonin es una toxina Anticuerpo-toxina Anticuerpo-citotóxico  Anticuerpo-citoquina Anticuerpo-citoquina Anticuerpo desnudo Terapia con genes, bloqueando la señal Terapia con genes, induce apoptosis
Moléculas pequeñas	CA4P ZD6126 AVE8062A Oxi4503 DMXAA	Fosfato prodroga de CA4P Fosfato prodroga de N-acetylcolchinol Análogo del combretastatin Análogo del combretastatin Flavonoide

Philip Thorpe *et al*, The first International Conference on Vascular Targeting: Meeting Overview. Cancer Res.63, 1144-1147, 2003(75).

1. Fácil producción de proteínas homogéneas definidas
2. La ingeniería proteica puede ser desarrollada a nivel de DNA
3. Los péptidos pueden ser enteramente producidos a partir de proteínas humanas, que evitan los problemas de inmunogenicidad ya descritos.
4. Fácil experimentación en ratones.

La eficacia anti-tumoral del Factor Tisular recombinante (tTF) dirigido a los vasos tumorales ha sido ya demostrada; Huang *et al*, dirigió la molécula de TF contra un antígeno clase II en un modelo animal con neuroblastoma a través de un anticuerpo biespecífico. Primero transfectaron al ratón con el gen IFN- $\gamma$ , para generar la expresión del antígeno MHC clase II en el endotelio vascular tumoral de los ratones. Para dirigir al tTF al endotelio tumoral vascular, la fusión del tTF y el anticuerpo biespecífico F (ab')<sub>2</sub> fue inyectado en ratones con tumores alográficos. La unión del tTF al MHC antígeno clase II en las células endoteliales indujo la activación de la coagulación selectiva con infarto del tumor. El tratamiento indujo trombosis de los vasos tumorales con una regresión completa del tumor del 38% (Ref. 45).

Una año después Sophia Ran *et al*, del mismo grupo utilizó una liganda de coagulación consistiendo en un anticuerpo monoclonal contra VCAM-1 en ratones (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), unido covalentemente al tTF mediando el infarto selectivo de los vasos tumorales en un tumor sólido de Hodgkin, dirigiendo mediante anticuerpos el tTF a los vasos tumorales generando trombosis de los vasos tumorales y retardando el crecimiento tumoral. La regresión completa no fue observada pero si una reducción del crecimiento tumoral del 50%. El VCAM-1 fue encontrado sólo en una minoría de los vasos tumorales (los vasos de mayor tamaño dentro del tumor).<sup>44</sup>

Dario Neri *et al*, utilizó un abordaje similar fusionando un fragmento de anticuerpo (scFv) específico para el dominio del ED-B oncofetal de la fibronectina con tTF. La proteína fusionada medió el infarto completo y selectivo de 3 tipos diferentes de tumores sólidos en ratones. En este abordaje, el 30 % de los ratones exhibieron una regresión completa del tumor después del tratamiento con una única dosis, pero mostrando también signos de toxicidad y los animales no fueron curados.<sup>43</sup>

Liu C *et al*, acopló el tTF a un inhibidor del antígeno prostático específico, esta proteína indujo en vivo necrosis infartante local y selectiva del tumor de próstata en ratas (Mat Lu) cuando se administró intravenosamente (i.v.). La administración combinada de esta proteína fusionada con bajas dosis de doxorubicina produjo un efecto tumoricida profundo, resultando en la erradicación completa de algunos tumores.<sup>76</sup>

Otro grupo indujo la coagulación extravascular haciendo blanco en un marcador tumoral asociado al estroma altamente selectivo (FAP), ellos construyeron una proteína fusionada comparada a un módulo de cadena simple de la proteína activadora del fibroblasto (FAP)-con anticuerpo humano específico [single chain fragment variable (scFv) OS4] junto con el dominio extracelular del factor tisular humano. La proteína fusionada scFv-tTF fue dirigida contra el FAP induciendo una coagulación extravascular del estroma tumoral en un modelo antígeno específico.<sup>77</sup>

## DISCUSIÓN

Los reportes iniciales de la inducción selectiva de trombosis intratumoral usando tTF fusionado a anticuerpos o fragmento de anticuerpos dirigidos a marcadores naturales o artificiales de la angiogenesis tumoral, mostraron una eficacia impresionante en términos de inhibición del crecimiento tumoral. El primer reporte por Huang et al, con la inducción dirigida de la coagulación sanguínea intraluminal en vasos tumorales y usando una marcador artificial de la angiogenesis generó gran interés por ver si la misma estrategia podría ser utilizada en modelos tumorales transportando marcadores naturales de la angiogenesis. El segundo reporte con esta estrategia haciendo blanco del VCAM-1 fue menos impresionante, pues sólo observó un 50 % de reducción del crecimiento tumoral. El tercer reporte por Nilson et al, haciendo blanco de la secuencia del dominio ED-B de la fibronectina en vasos tumorales con crecimiento agresivo, observó una erradicación completa del tumor en un 30 % de los ratones tratados, finalmente los animales no fueron curados.<sup>43-45</sup> Candidatos prometedores para hacer blanco con el tTF en los vasos tumorales sin mostrar efectos adversos incluyen; proteínas fusionadas a péptidos pequeños y selectivos de marcadores naturales en vasos tumorales. Todavía hay mucho que investigar, hacen falta estudios

con marcadores naturales tumorales más efectivos, más selectivos y mejorar los resultados en el tratamiento de cáncer así como iniciar fases clínicas de investigación con aquellos abordajes prometedores.

**Agradecimiento.** Expresamos nuestro profundo agradecimiento a los Doctores: Carlos Monroy, Karen Chang y la Dra. Sandra Salgado, por su valioso aporte en la recolección de información y clasificación de la misma. Así también al Dr. Carlos Herrera Juárez, por su apoyo y participación constante en la formación de la estructura y sintaxis del contenido en su versión en español.

## REFERENCIAS

1. Folkman J, Watson K, Ingber D, and Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
2. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, and Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
3. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991; 174: 1275-1278.
4. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, and Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1623-1634.
5. Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra M R, Bigotti A, and Natali P G. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 1989;108: 1139-1148.
6. Arap W, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; 279: 377-380.
7. Bhagwat S V, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, and Shapiro L H. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97: 652-659, 2001.
8. Burg M A, Pasqualini R, Arap W, Ruoslahti E, and Stallcup W B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 1999; 59: 2869-2874.
9. Kessler T A, Pfeifer A, Silletti S, Mesters R M, Berdel W. E, Verma I, and Cheresch D. Matrix metalloproteinase/integrin interactions as target for anti-angiogenic treatment strategies. *Ann Hematol* 2002; 81: Suppl 2, 69-70.
10. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina O P, Heikkila P, Kantor C, Gahmberg C G, Salo T, Konttinen Y T, Sorsa T, Ruoslahti E, and Pasqualini R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 768-774.

11. Olson T A, Mohanraj D, Roy S, and Ramakrishnan S. Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int J Cancer* 1997; 73: 865-870.
12. Rettig W J, Garin-Chesa P, Healey J H, Su S L, Jaffe E A, and Old L J. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10832-10836.
13. Senger D R, Claffey K P, Benes J E, Perruzzi C A, Sergiou A P, and Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13612-13617.
14. Pfeifer A, Kessler T, Silletti S, Cheresch D A, and Verma I M. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12227-12232.
15. Browder T, and Folkman J, The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2000 Jan 21;275(3):1521-4.
16. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, and Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 663-668.
17. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov VI, Orpana A, et al Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Hemostats* 1998; 80: 171-175.
18. Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, Rifkin DB, & Wilson EL. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993; 81: 631-638.
19. Nakamura T, Teramoto H, & Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6489-6493.
20. Karey KP, Marquardt H, & Sirbasku DA. Human platelet-derived mitogens. I. Identification of insulinlike growth factors I and II by purification and N alpha amino acid sequence analysis. *Blood* 1989; 74: 1084-1092.
21. Ben-Ezra J, Sheibani K, Hwabg D L, & Lev-Ran A. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol* 1990; 137: 755-759.
22. Hwang DL, Lev-Ran A, Yen C F, & Sniecinski I. Release of different fractions of epidermal growth factor from human platelets in vitro: preferential release of 140 kDa fraction. *Regul Pept* 1992; 37: 95-100.
23. Bar RS, Boes M, Booth B A, Dake B L, Henley S, & Hart M N. The effects of platelet-derived growth factor in cultured microvessel endothelial cells. *Endocrinology* 1989; 124: 1841-1848.
24. Lee O-H, Kim Y-M, Lee YM, Moon E.-J, Lee D-J, Kim J-H, Kim K-W, & Kwon Y G. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:743-750.
25. Rippmann F J, Pfizenmaier K, Mattes R, Rettig WJ, and Dieter Moosmayer: Fusion of the tissue factor extracellular domain to a tumor stroma specific single-chain fragment variable antibody results in an antigen-specific coagulation-promoting molecule. *Biochem J* 2000; 349: 805-812.
26. Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, Büchner T, Kessler T, Herrera F, Kienast J, Müller-Tidow C, Serve H, Berdel WE, and Mesters RM: Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16: 1302-1310.
27. Bieker R, Padró T, Kramer J, Steins M, Kessler T, Retzlaff S, Herrera F, Kienast J, Berdel WE, Mesters RM. Overexpression of basic fibroblast growth factor and autocrine stimulation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* (in revision).
28. Kerbel RS, Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; Mar 21(3):505-15. Review.
29. Algire GH, and Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants. *J Natl Cancer Inst USA* 1945; 6: 73-85.
30. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* Nov 18;285(21):1182-6, 1971.
31. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent *Journal Natl Cancer Inst* 1990; Jan 3;82(1):4-6.
32. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001 Feb 15;19(4):1207-25.
33. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:931-934.
34. Toi M, Hoshima S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994 Oct; 85(10):1045-9.
35. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.
36. Lee S Rosen, Clinical Experience with Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor Blockers. *Cancer control* 2002; vol.9 suppl. 2:36-44
37. Padró T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Stein M, Kienast J, et al, Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000 Apr 15;95(8):2637-44.
38. Mesters RM. Angiogenesis in patients with hematologic malignancies. *Onkologie* 2001 sep 24; Suppl 5:75-80.
39. Gimbrone M, Leapman S, Cotran R, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 136:261-276, 1972.
40. Bikfalvi A, Significance of Angiogenesis in Tumor Progression and Metastasis, *European J of Cancer* 1995;31A 7/8:1101-1104.
41. Ellis LM, and Fidler IJ. Angiogenesis and Metastasis. *European Journal of Cancer* 1996 32A; 14: 2451-2460

42. Fidler IJ, and Ellis LM. The implications of angiogenesis to the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79:185-188
43. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, and Neri D. Targeted Delivery of Tissue Factor to the ED-B Domain of Fibronectin, a marker of Angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Research* 2001; 61:711-716.
44. Ran S, Gao Boning, Duffy S, Watkins L, Rote N, and Thorpe PE. Infarction of Solid Hodgkin's Tumors in Mice by Antibody-directed Targeting of Tissue Factor to Tumor Vasculature. *Cancer Research* 1998; 58:4646-4653.
45. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edginton TS, Thorpe PE: Tumor infarction in Mice by Antibody-Directed Targeting of Tissue Factor to tumor Vasculature. *Science* 1997;vol. 275: 547-550.
46. Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh A, et al, Prostate specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 2002; 62:5470-5475.
47. 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
48. Brooks PC, Clark RAF, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science* 1994a;264:569-571.
49. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by infusing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994b;79:1157-1164.
50. Yun Z, Menter DG, Nicolson GL. Involvement of integrin  $\alpha v \beta 3$  in cell adhesion, motility and liver metastasis of murine RAW117 large cell lymphoma.. *Cancer Res* 1996;56: 3103-3111.
51. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through  $\alpha 1 \beta 1$  and  $\alpha 2 \beta 1$  integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13612-13617.
52. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune F. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin  $\alpha v \beta 3$  in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- $\gamma$ . *Nature Medicine* 1998; 4: 408-414.
53. Gimbrone M, Leapman S, Cotran R, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp. Med.* 1972; 136:261-276.
54. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-4.
55. 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.
56. Bouck N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 1990; 2:179-185.
57. Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Jie R-W, & Folkman J. Expressions 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.
58. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
59. Engerman RL, Pfaffenbach D, Davis MD. Cell turnover of capillaries. *Lab Invest* 1967;17:738-743.
60. Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labeling studies. *Br J Cancer* 1984; 49:405-413.
61. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-10934.
62. Sato Y, Abe M, Takaki R. Platelet factor-4 blocks the binding of basic fibroblasts growth factor to the receptor and inhibits the spontaneous migration of vascular cells. *Biochem biophys Res Commun* 1990 ;172: 595-600.
63. Mesters RM. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2000 Jul 1;98(1):241-3.
64. Lin P, Buxton JA, Acheson A, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, et al, Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase tie2. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8829-8834.
65. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, et al, Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8795-8800.
66. Folkman Judah. Antiangiogenic gene therapy, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9064-9066.
67. Teicher BA, Holden S A, Gulshan A, Sotomayor A, Huang ZD, Chen Y N, et al, Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994 Jun 15;57(6):920-5.
68. Ching LM, Goldsmith D, Joseph WR, Komer H, Sedgwick JD, and Baguley BC. Induction of intratumoral tumor necrosis factor (TNF) synthesis and hemorrhagic necrosis by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF knockout mice. *Cancer Res* 1999; 59:3304-3307.
69. Baxter LT, and Jani RK, Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res* 1989; 37:77-104.
70. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, and Weinstein JN. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors. *Cancer Res* 1989; 49:5653-5656.
71. Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9:253-266.
72. Denekamp J. Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9:267-282.
73. 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.
74. Chaplin DJ, and Horsman M.R. The influence of tumor temperature on ischemia-induced cell death: potential implications for the evaluation of vascular mediated therapies. *Radiother. Oncol* 1994; 30: 59-65.

75. Philip E Thorpe, David J, Chaplin, and David C Blakey. The first International Conference on Vascular Targeting: Meeting Overview. *Cancer Res* 2003;63: 1144-1147.
76. Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh Amr, et al, Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 5470-5475.
77. Rippmann J, Pfizenmaier K, Mattes R, Rettig W, And Moosmayer D. Fusion of the tissue factor extracellular domain to a tumor stroma specific single-chain fragment variable antibody results in an antigen-specific coagulation-promoting molecule. *Biochem J* 2000; 349: 805-812.

---

---

PARA COLOCARSE EN LAS CIMAS DE LA CULTURA SOCIAL  
Y DE LA VERDADERA LIBERTAD, SE NECESITA SUBIR LENTA  
Y PENOSAMENTE, APOYÁNDOSE EN EL TERRENO QUE SE DEJA ATRÁS,  
Y FIJA LA VISTA EN LA ALTURA A DONDE SE PRETENDE LLEGAR.

*RAMÓN ROSA*