

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Origen e inhibición de la neovascularización
inducida por melanoma en lecho irradiado**

Autor: Vérguez Muñoz, Adolfo Alfredo

**Director: Claudio Otón Sánchez
Fidel Rodríguez Hernández
Lucio Díaz Flores Feo
y Luis Fernando Otón Sánchez**

Departamento de Medicina Física y Farmacología

A Ana y a mis padres

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Claudio Otón Sánchez, Catedrático de Radiología y Medicina Física, mi jefe, durante estos cuatro años ha sido refencia fundamental en todos los aspectos, sin su apoyo y disponibilidad, tanto personal como material, este trabajo no hubiera visto la luz.

Al Profesor Lucio Díaz-Flores Catedrático de Anatomía Patológica, sus ojos y su buen hacer han sido indispensables no sólo en la interpretación de los hechos anatomopatológicos de esta tesis, sino un ejemplo para la vida.

Al Profesor Fidel Rodríguez Hernández por su entusiasmo por la investigación y su confianza en mi persona, se ha volcado de forma incondicional en la realización de este trabajo, pero es difícil ser objetivo al hablar de un amigo.

Al Profesor Fernando Otón Sánchez Médico Adjunto del Servicio de Oncología Radioterápica, por su gran capacidad docente, sus anotaciones y colaboración han sido decisivas para la calidad del presente estudio.

Al Dr. Gilberto Peñate Médico Adjunto del Servicio de Oncología Radioterápica y mi predecesor en la línea de investigación, por su quehacer previo su aliento y consejo diario, tanto en la clínica como en la investigación.

Al Profesor Francisco Valladares del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La Laguna por su estrecha colaboración, gracias a la cual ha sido posible presentar los hallazgos microscópicos de este trabajo.

Al Profesor Ricardo Gutiérrez del Departamento de Anatomía Patológica, su optimismo y orden así como su inestimable colaboración en la realización de las microfotografías han sido esenciales en la culminación de esta tesis.

Al Profesor José Hernández Armas, Catedrático de Física Médica y a sus directos colaboradores, la Dra. Berta Robayna y Antonio Catalán del Servicio de Protección Radiológica y miembros del Departamento de Farmacología y Física Medica, quienes me han transmitido conocimientos de Física y han colaborado, junto con Maribel, en la realización y cálculo de la dosimetría.

A todos los miembros de mi Servicio de Oncología Radioterápica del HUC que de una u otra forma han prestado en todo momento su ayuda y colaboración para la realización de este estudio.

A todos los técnicos del Servicio de Anatomía Patológica del HUC y en especial a Ángeles y a Pilar.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Antecedentes históricos	8
1.2. La angiogénesis	10
<u>1.2.1 Regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica</u>	10
<u>1.2.2 Secuencia temporal de acontecimientos</u>	10
1.2.2.1 Activación de la célula endotelial y de los pericitos.....	10
1.2.2.2 Degradación de la lámina basal.....	11
1.2.2.3 Migración de la célula endotelial.....	12
1.2.2.4 Proliferación de la célula endotelial.....	14
1.2.2.5 Formación de la luz de los nuevos vasos.....	16
1.2.2.6 Los pericitos en la angiogénesis.....	17
1.2.2.7 Cambios en la matriz extracelular y formación de la nueva lámina basal.....	18
1.2.2.8 Formación de las asas vasculares.....	19
<u>1.2.3 Control de la angiogénesis</u>	20
1.2.3.1 Factores estimuladores angiogénicos.....	20
1.2.3.1.1 Factores de crecimiento fibroblástico (FGF).....	21
1.2.3.1.2 Factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	22
1.2.3.1.3 Factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas (PD- ECGF).....	23
1.2.3.1.4 Factor de necrosis tumoral.....	24
1.2.3.1.5 Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.....	24
1.2.3.1.6 Prostaglandinas.....	25
1.2.3.1.7 Angiogenina.....	25
1.2.3.1.8 Heparina.....	26
1.2.3.1.9 Hipoxia.....	26
1.2.3.2 Factores endógenos inhibidores de la angiogénesis.....	26
1.2.3.2.1 Factor inhibidor derivado del cartílago.....	27
1.2.3.2.2 Trombospondina.....	27
1.2.3.2.3 Angiostatina.....	28
1.2.3.2.4 Endostatina.....	28
<u>1.2.4 Angiogénesis en los procesos neoplásicos</u>	29
<u>1.2.5 Factores antiangiogénicos</u>	31
1.2.5.1 Drogas inhibidoras de la célula endotelial.....	31
1.2.5.2 Drogas represoras de los activadores de la angiogénesis.....	32
1.2.5.3 Drogas inhibidoras de la degradación de la matriz extracelular.....	33

1.3 Modelos experimentales para analizar la respuesta angiogénica	35
1.3.1 Modelos “in vivo”.....	35
1.3.2 Modelos “in vitro”.....	36
1.4 Acción de las radiaciones ionizantes sobre la microvascularización	38
1.4.1 Alteraciones morfológicas.....	38
1.4.2 Alteraciones funcionales.....	39
1.4.3 Parámetros radiobiológicos.....	40
1.4.4 Cronología.....	41
1.5 Efecto lecho tumoral (TBE)	42
1.5.1 Comportamiento de un tumor en un lecho irradiado.....	43
1.5.2 Parámetros que modifican el TBE.....	44
1.6 Nuestra experiencia	46
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAL Y MÉTODO	49
3.1 Animal de estudio	49
3.2 Criterios de inclusión	51
3.3 Modelo tumoral	52
3.3.1 Conservación de la línea tumoral.....	52
3.3.1.1 Criopreservación.....	53
3.3.1.2 “In vivo”.....	54
3.3.1.3 “In vitro”.....	55
3.4 Anestesia	57
3.5 Técnica quirúrgica	57
3.6 Necropsia	58
3.7 Técnica de irradiación	60
3.7.1 Aparato de irradiación.....	60
3.7.2 Isodosis y tiempo de exposición.....	61
3.7.3 Procedimiento de irradiación.....	61
3.7.4 Dosimetría.....	63
3.7.4.1 Del Aparato de irradiación.....	63
3.7.4.2 “In vivo”.....	64
3.8 Grupos de estudio	69
3.9 Estudio microscópico	72
3.9.1 Hematoxilina- Eosina.....	72
3.9.2 Tricrómico de Mason-Goldner.....	74
4. RESULTADOS	77
4.1 Recopilación de parámetros	78
4.2 Análisis estadístico	85

4.3 Hallazgos morfológicos.....	105
4.3.1 Hallazgos macroscópicos.....	105
4.3.2 Hallazgos microscópicos.....	109
<u>5. DISCUSIÓN</u>	134
5.1. Angiogénesis.....	137
5.2. Metástasis.....	139
<u>6. CONCLUSIONES</u>	141
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	143

1. INTRODUCCIÓN

La angiogénesis o formación de nuevos vasos a partir de la circulación preexistente es un importante evento en ciertos procesos tales como la respuesta inflamatoria y reparativa. En los procesos de estirpe maligna, el mantenimiento sostenido del aporte de nutrientes a través de una angiogénesis sostenida es, junto a la capacidad de crecimiento descontrolado, de generar metástasis y de invasión uno de los pilares fundamentales en el desarrollo de los tumores. Por este motivo nos hemos planteado como objetivo primordial estudiar la neoformación vascular, inducida por una neoplasia bajo la influencia de las radiaciones ionizantes y su posible inhibición.

1.1 Antecedentes históricos

En el año 1971 Folkman formuló la teoría de que el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica se encontraban íntimamente ligados a los procesos de angiogénesis y señaló las posibilidades terapéuticas que este hecho podría tener en la lucha contra los tumores. En ese mismo trabajo se afirmaba que un tumor no podía crecer más allá de 1- 2 mm de diámetro en ausencia de aporte vascular. Desde entonces han sido prolíficos los trabajos realizados con el fin de estudiar la angiogénesis y así disminuir o impedir el crecimiento y diseminación de las células malignas.

Pepper y Montesano (1996) en sus estudios han demostrado que en el crecimiento tumoral existen dos fases desde el punto de vista histopatológico. En la primera también denominada fase avascular no hay formación de vasos; en este caso las células tumorales sobreviven por imbibición y así pueden permanecer

años hasta la aparición de uno o varios de los siguientes factores: variaciones en las condiciones microambientales, inhibición de genes supresores tumorales o la activación de oncogenes haciendo que estas células malignas adquieran la capacidad de estimular a las células endoteliales, fenómeno que se ha denominado fenotipo vascular (Sekido 1998). En otras palabras, para este autor, cuando se produce alguno de los procesos señalados, las células tumorales adquieren la capacidad de actuar sobre las células endoteliales, que en condiciones normales tienen una muy baja tasa de replicación, es a partir de este momento cuando comienza la formación de neovasos inducida por el tejido neoplásico, se inicia la fase vascular y se abre la puerta al aumento del volumen tumoral y a la diseminación metastásica, como señalan Hanahan y Folkman (1995 y 1996). La tasa de recambio de las células endoteliales estimuladas por el tumor se multiplica por 50 e incluso 200 veces debido a factores activadores (Derbyshire 1997). En la mayoría de los trabajos se considera que los neovasos proceden de la vascularización preexistente particularmente de las células endoteliales de las paredes de los mismos (Thompson 1987).

La complejidad de la fase vascular está relacionada con la gran cantidad de sustancias conocidas implicadas en la misma y el descubrimiento de otras nuevas; todo ello genera una amplia suma de trabajos y estudios. De igual modo son también varios los tipos celulares que se han implicado como los leucocitos, los fibroblastos y los macrófagos que juegan un papel fundamental y actúan como una unidad funcional según señalan Díaz-Flores y cols. (1994) y Domenico Ribatti y cols (2001).

1.2. La angiogénesis

De una manera simplista podemos definir el concepto de angiogénesis como la formación de nuevos vasos a partir de la microcirculación preexistente.

Vamos a desarrollar a continuación aspectos fundamentales de la angiogénesis, como son:

1.2.1 Regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica

Las yemas vasculares proceden de las paredes de los capilares y sobre todo de las vénulas postcapilares. Algunos autores como Philips 1991 y el propio Folkman afirman incluso que tan sólo la porción venosa de la circulación capilar (sin células musculares lisas) tiene capacidad angiogénica (Mc Cracken y col. 1979, Tano y col. 1981, Aunsprung y Folkman J 1977, Philips 1991).

1.2.2. Secuencia temporal de acontecimientos

Fases de la formación de nuevos vasos:

En este punto tenemos que señalar que dividiremos la angiogénesis en distintas fases para permitirnos una mejor comprensión del proceso:

1.2.2.1. Activación de la célula endotelial y de los pericitos

El primer cambio morfológico que se produce en la célula endotelial aletargada es la hipertrofia de la misma que provoca un engrosamiento de la pared, aumento del tamaño nuclear, prominentes nucleolos, aumento del número de organelas y formación de proyecciones desde la superficie. Además se ha señalado el aumento de síntesis de DNA en la célula endotelial (Schoefl G.I.

1963, Aunsprung y Folkman J 1977, Mc Cracken 1979; Burger y Klinworth 1981 y 1983). Esta puesta en marcha de la célula endotelial se encuentra mediada por los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factores de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), todos ellos son capaces de estimular la angiogénesis “in vivo” e “in vitro” a través de receptores de membrana de la célula endotelial (VEGFR y PD-ECGFR) y transmiten dichas señales proliferativas al interior de la célula; como posteriormente señalaremos, estos receptores transmembrana, se han convertido en dianas terapéuticas antitumorales (Veikkola y Alitalo 1999).

En cuanto a los pericitos señalaremos que experimentan cambios tanto morfológicos como de sus relaciones topográficas. Entre los morfológicos destacaremos el acortamiento de las prolongaciones así como el aumento en el número de ribosomas. Entre los segundos señalamos una disminución de la superficie de contacto entre los pericitos y las células endoteliales, así como una penetración de las proyecciones de los pericitos en el espacio extracelular (Mc Cracken. y col. 1979; Díaz-Flores 1991).

1.2.2.2. Degradación de la lámina basal

La degradación de la lámina basal es un paso fundamental para la posterior migración de la célula endotelial desde los vasos preexistentes (Aunsprung D. H. y Folkman J. 1977; Schoefl G.I 1963). La desestructuración comienza en el área próxima al estímulo angiogénico, precisamente en la zona donde la célula endotelial comienza a crecer hacia fuera; estos cambios se van extendiendo al resto de la pared del vaso preexistente. Como resultado de lo señalado se establece

que las prolongaciones de la célula endotelial no tengan membrana basal sino un sustrato de proteoglicanos alterados. Esta lisis de la membrana se debe a la síntesis de enzimas proteolíticos segregados por la propia célula endotelial (Rifkin 1982).

Las proteasas tipo metaloproteasas y los activadores del plasminógeno que son secretadas por las yemas endoteliales juegan aquí su papel fundamental (Pepper. y Montesano 1990). Entre las proteasas de matriz extracelular la más destacada es el activador del plasminógeno tipo urokinasa (Mazar y col. 1999) y diferentes miembros de la familia de las metaloproteasas como señalan Uría y López-Otín (2000). La acción de estas sustancias permite la degradación de la lámina basal adyacente a las células endoteliales estimuladas y así se inicia su migración. Se produce además una interacción física y funcional entre las integrinas proangiogénicas y las proteasas de la matriz que conjuntamente contribuyen a aumentar la capacidad “invasiva “ de las células endoteliales como sucede con la metaloproteasa MMP-2 y la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Stetler–Stevenson 1999).

Este proceso es imprescindible en la formación de neovasos tumorales, se ha convertido en una de las dianas terapéuticas en la lucha contra el cáncer en los últimos años (Pepper 2001).

1.2.2.3 Migración de la célula endotelial

En el siglo XIX , His (1868) consideró que los vasos sanguíneos crecían por migración de la célula endotelial. Este hecho es actualmente considerado como uno de los pasos más importantes en el desarrollo de la angiogénesis (Aunsprunk

D. H. y Folkman J. 1977). Inmediatamente después de degradarse la membrana basal la célula endotelial protruye en la pared vascular y comienza a migrar a través del intersticio, hacia el estímulo angiogénico. La mayoría de los investigadores coinciden en que este hecho precede a la replicación y que por tanto la migración y la mitosis son dos acontecimientos independientes. Cuando una célula ha migrado completamente otra le sigue y así se forman yemas y cordones en el estroma perivascular (Sholley 1977;Folkman 1981).

Se han descrito dos tipos de migración de células endoteliales:

1.- Bipolar o telescopaje: en esta modalidad dos o más células endoteliales migran de forma paralela desde la pared vascular hacia el interior del espacio perivascular (Sholley M.M 1984 , Wakui S.T 1988).

2.- Lineal: en este caso una sola célula endotelial, o sus pseudópodos, migra hacia el interior del conectivo desde los vasos preexistentes (Aunsprung D. H. y Folkman J 1977, 1982, 1984).

En ambos casos se van alineando una célula endotelial detrás de otra de manera que se alargan las yemas vasculares.

En la regulación de estos procesos de migración son fundamentales las moléculas de adhesión celular. Entre éstas podemos destacar dos familias de moléculas:

- Los receptores de adhesión intercelular, que median uniones entre células, entre ellas podemos destacar las Cadherinas y las inmunoglobulinas también denominadas CAM y que son capaces de adherirse a integrinas ($\alpha 4\beta 1$...)
- Los receptores de adhesión Célula-Matriz Extracelular, entre éstas encontramos fundamentalmente las integrinas y entre ellas $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha \nu \beta 5$ que son

heterodímeros constituidos por dos subunidades; las hay que son específicas, por ejemplo para la laminina, e inespecíficas, éstas últimas tienen capacidad de unión a varios componentes de la matriz extracelular como distintos tipos de colágeno, fibronectina...

Hemos de señalar que estas moléculas además de mediar un papel en la migración celular, intervienen también en la estimulación de procesos de división y desarrollo de la propia célula endotelial, ya que la pérdida de estas uniones o el establecimiento de nuevas relaciones con otros compuestos de la matriz extracelular suponen señales de proliferación ó apoptosis, que son transmitidas, por las integrinas al interior de la célula endotelial a través de su interrelación con el citoesqueleto (Giancotti y Ruoslahti 1999).

Señalaremos que en el desarrollo de los tumores la sobreexpresión de algunas de estas moléculas de adhesión, debido a la mutación de ciertos genes, facilita la invasividad de las células tumorales, mejorando su unión a endotelios y diferentes compuestos de la matriz extracelular, lo que se traduce en una gran capacidad metastásica (Batlle y cols. 2000).

Durante estos procesos de degradación de la membrana y migración celular pueden producirse microsangrados; dicho fenómeno tiene especial relevancia en el ejercicio clínico diario concretamente en Radiodiagnóstico donde estas microhemorragias se calcifican y dan lugar a las llamadas microcalcificaciones.

1.2.2.4. Proliferación de la célula endotelial

La tasa de recambio de la célula endotelial madura es lenta de un 1% cada 2 o más meses e incluso mucho menor 0,01% en tejidos como la córnea (Algire y col.

1945; Sparagen y col. 1962; Folkman y Cotran 1976). Por lo tanto la angiogénesis en los organismos adultos sanos es un proceso relativamente lento. Sin embargo ante ciertos estímulos la célula endotelial es capaz de pasar a una situación de proliferación, esto sucede en la reparación de grandes soluciones de continuidad por pérdida de sustancia tisular y en los vasos, así como en la recanalización de los fenómenos trombóticos. Aunque la proliferación de la célula endotelial no es absolutamente imprescindible para la angiogénesis como demostró en 1984 Sholley.

El momento en el que sucede la mitosis es una cuestión controvertida; la mayoría de los autores opinan que la proliferación ocurre una vez que la célula ha migrado sin embargo algunos investigadores opinan que la mitosis es un proceso coincidente con la migración (Sholley 1984). De cualquier forma se ha establecido que el momento de aparición de la síntesis de DNA tras la aplicación de un estímulo angiogénico sucede entre las 6 y 8 horas después de la actuación del mismo (Cavallo y col. 1973).

La capacidad de un estímulo angiogénico para inducir la replicación de la célula endotelial se encuentra ligada a la rotura de los puentes intercelulares; la situación replicativa de dicha célula depende en parte de la organización del citoesqueleto como por ejemplo la desestabilización microtubular, lo que va unido a cambios en la forma celular (Basivotto y cols. 1990 y Liaw y Schwartz 1993). De igual forma y como ya hemos señalado, la modificación de las uniones intercelulares y con la membrana basal, suponen una serie de señales que son transmitidas al interior de la célula a través de las integrinas y van a iniciar el proceso replicativo (Batlle y cols. 2000).

A pesar de que la célula endotelial parece ser el elemento fundamental de la angiogénesis, recientemente, han surgido artículos en los que se establecen otras hipótesis. Entre ellas citaremos:

- La hipótesis de mimetismo vasculogénico o “vasculogenic mimicry”: en la que se afirma que hay células de ciertos tumores con gran capacidad plástica que son capaces de formar canales en forma de pseudovasos, esto es posible gracias a un retroceso genético que convierte a estas células en cuasi totipotenciales. Maniotis y cols a finales de 1999 demostraron este supuesto con células de melanomas humanos muy agresivos cultivados de forma tridimensional en Matrigel[®], así como con marcadores inmunohistoquímicos para muestras de tumores humanos extirpados. Este mecanismo permite aporte de nutrientes al tumor de forma independiente a la angiogénesis. Hoy en día se está estudiando su regulación genética y las similitudes con la angiogénesis embrionaria con el objeto de convertir el proceso en una diana terapéutica (Hendrix y cols. 2001)
- Otra hipótesis que se maneja es la que sugiere participación de células progenitoras procedentes de la médula ósea, que circulan por el árbol vascular hasta la zona donde se requiere angiogénesis.

1.2.2.5. Formación de la luz de los nuevos vasos

Se han considerado dos mecanismos diferentes en la formación de la luz de los nuevos vasos:

- Vacuolización del citoplasma de células endoteliales contiguas y confluencia posterior de las mismas (Sabin 1920; Folkman y Haudenschild 1980; Furusato y cols. 1984 y 1985).

- Canalización intercelular de células endoteliales adyacentes por curvatura de las propias células endoteliales (Wakui 1988)

De forma general se acepta que la luz de las yemas vasculares se origina entre dos células endoteliales adyacentes que han brotado de la pared de los vasos preexistentes y mantienen su polaridad.

No está claro el momento en el que contactan los neovasos con la luz de los vasos preexistentes, si bien parece que la red capilar formada a partir de la región venosa capilar acaba conectando con regiones arteriales de los vasos preexistentes y así se arterializa parte de la nueva red formada (Wakui 1988).

1.2.2.6. Los pericitos en la angiogénesis

Las opiniones, en este sentido, son dispares, entre los diferentes autores, respecto a la participación de los pericitos antes y durante la gemación vascular. Estudios sobre los pericitos de la microvascularización preexistente han demostrado la existencia de una importante y rápida proliferación de los mismos en las fases precoces de la angiogénesis, así mismo se produce una disminución en el número de contactos entre las células endoteliales y los pericitos. También se evidencia una rotura de la lámina basal de los pericitos en algunas zonas.

En opinión de algunos autores hay hechos que indican que los pericitos se activan en los procesos angiogénicos postnatales, lo que puede sugerir que quizá contribuyen a la formación de nuevas células (Díaz-Flores y col. 1988, 1989, 1990 a y b, 1991 a y b 1992).

1.2.2.7 Cambios en la matriz extracelular y formación de una nueva lámina basal

Anteriormente señalamos que durante la angiogénesis se produce la degradación de la lámina basal. De esta forma se proteoliza la matriz extracelular. En condiciones de reposo la lámina basal está formada por laminina, fibronectina, entactina, heparan sulfato, proteoglicanos y colágeno tipo IV y V. Cuando la célula endotelial comienza a secretar enzimas proteolíticas tales como el activador del plasminógeno y la colagenasa se produce la citada rotura. De igual manera todos los componentes señalados de la matriz extracelular sufren también una desnaturalización importante a la par que la célula endotelial se tuneliza. (Kanwar y Farquhar 1979; Foidart y cols 1980; Nicosia y Madri 1987; Folkman y Haudenschild 1980).

EL activador del plasminógeno es un factor que cuando se activa pasa a plasmina y a su vez es capaz de activar las metaloproteasas que degradan la lámina basal y las proteínas de la matriz. Este proceso se encuentra regulado por cinco genes distintos, tres de ellos son genes activadores que expresan proteínas activadoras (tisular, tirosin-quinasa y tirosin-quinasa adherido a membrana), otros dos genes son inhibidores que expresan proteínas inhibidoras específicas (tipo I y tipo II). La alteración, sobreexpresión o inhibición de alguno de estos genes va a favorecer o impedir la degradación de la matriz lo que va influir en la migración de la célula endotelial (Irigoyen y col. 1999).

En las fases iniciales del desarrollo de los capilares la fibronectina es el componente predominante de la matriz provisional. Existen también otros constituyentes como depósitos amorfos de laminina y colágeno tipo IV.

Progresivamente va disminuyendo la fibronectina y se deposita laminina y colágeno tipo IV formando una capa continua en el espacio subendotelial. En las fases de maduración se incrementa la cantidad de colágeno tipo I y tipo III en el espacio perivascular (Nicosia y Madri 1987). Todo este proceso es muy similar, sobre todo en sus fases iniciales, al de invasión tumoral.

1.2.2.8 Formación de las asas vasculares

A poca distancia de donde comenzaron a formarse las yemas vasculares, cuyos brotes están constituidos por células endoteliales que han migrado, comienzan a formarse otras contactando con las anteriores y generando asas capilares y plexos. Una cuestión aún no resuelta es cómo las yemas vasculares se encuentran unas con otras y se unen formando asas y vasos. Se ha propuesto que los pericitos pueden actuar como estructuras guía para las yemas de las células endoteliales. Culmina así la formación de los neovasos (Nehls y cols 1992).

Por otro lado hay que señalar que multitud de neovasos involucionan, se han considerado dos tipos distintos de regresión:

1º.- Agregación plaquetaria con estasis sanguíneo y oclusión vascular, lo que concluye con la desestructuración de las paredes de los vasos (Ausprunk y cols. 1978).

2º.- Lesión de la propia célula endotelial, que primero protruye en la luz del capilar y forma uniones con otras células endoteliales, después se condensa su citoplasma para finalmente fragmentar toda la célula (Azmi y O'Shea 1984).

1.2.3 Control de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso controlado por una serie de sustancias de cuyo equilibrio dinámico depende su puesta en marcha o la inhibición del mismo.

Existen tanto sustancias activadoras ó factores angiogénicos y sustancias inhibidoras o antagonistas angiogénicos.

En términos generales estas moléculas se sintetizan y almacenan fundamentalmente en las células tumorales en el caso de las neoplasias, pero también en los mastocitos y en otras células implicadas en los procesos inflamatorios como son los linfocitos, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos (Ribatti y cols. 2001).

Además los cambios en la matriz extracelular y las uniones intercelulares son también moduladores de la angiogénesis. Expondremos a continuación cómo se regula el proceso angiogénico, detallando qué sustancias y qué mecanismos actúan para la puesta en marcha de dichos fenómenos, posteriormente abordaremos aspectos concretos de la angiogénesis tumoral y las estrategias que se están desarrollando con el objetivo de inhibirla.

1.2.3.1 Factores estimuladores angiogénicos

Los factores de crecimiento angiogénico son pequeñas moléculas proteicas que dependen de una gran familia de genes y que son capaces de estimular diferentes aspectos del proceso de la formación vascular.

Podemos señalar que los factores angiogénicos pueden dividirse en dos grandes grupos, a saber:

Factores directos: son aquellos que son capaces de inducir la proliferación y la migración endotelial tanto “in vivo” como “in vitro”.

Factores indirectos: cuando su acción estimuladora “in vitro” falla y por lo tanto se asume que “in vivo” forman parte de alguna cascada estimuladora de otras sustancias.

Entre las sustancias inductoras de la angiogénesis tumoral cabe destacar:

1.2.3.1.1 Factores de crecimiento fibroblástico (FGF)

Son una familia de factores angiogénicos directos como demostraron Thomas y col. 1985 y Montesano y col. 1986. El FGF es uno de los más potentes factores angiogénicos Gospodarowicz 1985 y es capaz de estimular los siguiente pasos de la angiogénesis:

- La migración de las células endoteliales y del músculo liso produciendo cambios en su estructura y polaridad, como señalan Terranova y col. 1985, Montesano y col. 1986, Gospodarowicz y col. 1987.

- La proliferación y división celular de las células endoteliales, las células musculares lisas y otros tipos celulares según Schweigerer y col. 1987 Winkles y col. 1987 y Sato y Rifkin 1988.

- La producción, por parte de la célula endotelial del activador del plasminógeno tipo uroquinasa, hecho ya demostrado por Gross J.L y col. (1983), Moscatelli y col. (1986) Gospodarowicz D y col. (1987), Rifkin D.B (1989)

- La síntesis y depósito de proteínas de la matriz extracelular (Tseung y cols 1982 y Gospodarowicz 1983 y 1987)

➤ La diferenciación de la célula endotelial, e influye en la expresión de su fenotipo. (Vlodavsky y Gospodarowicz 1979 y Greeberg y col. 1980).

➤ El FGF está presente durante la vascularización embrionaria; en el adulto se detecta en situaciones como una isquemia miocárdica. “In vivo” la administración de FGF establece una intensa angiogénesis. Asimismo se ha observado crecimiento de los vasa-vasorum cuando se aplica a la adventicia de la carótida de la rata.. (Risau 1988, Tomaneck y cols 1989, Baird 1989, Cuevas y cols 1991).

1.2.3.1.2 Factores de crecimiento vascular endotelial VEGF

Son en realidad una familia de factores angiogénicos, se les ha denominado también factores de permeabilidad vascular o vasculotropina. Se han descrito cuatro formas distintas. Todas ellas son pequeñas proteínas de no más de 210 aminoácidos (Ferrara y Henzel 1989; Ferrara y cols. 1991 y 1992; Leung y cols. 1989).

Se ha demostrado la expresión de VEGF mRNA en tejidos bien vascularizados así como durante la proliferación capilar como señalan Philips y cols 1990 y Ravindranath y cols 1992 .También se ha descrito que es capaz de estimular la angiogénesis “in vivo” y de inducir la mitosis de forma específica en la célula endotelial (Leung y cols1989; Ploüet y cols 1989; Ferrara y Henzel 1989)

Los lugares de unión o receptores de los VEGF han sido descritos para casi todos los tejidos. Son heterodímeros proteicos con dominios tirosin-kinasa que desarrollan su función mediante reacciones de fosforilación que permiten la

transmisión de señales de activación y división al interior de la célula (Vaisman y cols. en 1990). Existen dos tipos distintos de receptores el KDR-Flk1 y el KDR-Flt 1 (Drake y col. 1998). Además, se piensa que la expresión de este factor puede tener una regulación hormonal dependiente de los esteroides ya que al parecer todas las células que lo expresan responden a estímulos esteroideos (Shweiki y cols 1993).

Hoy en día el mecanismo molecular por el que se activa es perfectamente conocido. El VEGF puede ser secretado por la célula tumoral en una llamada a la formación de nuevos vasos pero también la propia célula endotelial que, una vez estimulada, es capaz de sintetizarla y liberarla al medio extracelular dando lugar así a una regulación autocrina y paracrina.

La supresión de la expresión del VEGF o bien el bloqueo de sus receptores provoca la involución vascular (Ferrara y cols. 1992). De igual forma ya se han desarrollado fármacos dirigidos contra el VEGF y sus receptores tirosin-kinasa. Así podemos hablar de los anticuerpos anti-VEGF y de sustancias como el SU5416 que más adelante trataremos en profundidad.

1.2.3.1.3 Factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas

PD-ECGF

Es una proteína que estimula el crecimiento de la célula endotelial y la quimiotaxis tanto “in vivo” como "in vitro". También incrementa la síntesis de ADN del FGF por parte de la célula endotelial. (Miyazoo y cols 1987 y Ishikawa y cols 1989).

1.2.3.1.4 Factor de necrosis tumoral

El TNF es una familia de citokinas sintetizadas fundamentalmente por los macrófagos y es capaz de inducir la producción de b-FGF en la célula endotelial y de aumentar su secreción (Okamura y cols 1991; Simons 2001). Su papel es bastante controvertido ya que es capaz de inducir la angiogénesis “in vivo” (Frater-Schröder y cols 1987; Leibowich y cols 1987) pero sin embargo es un potente inhibidor del crecimiento de la célula endotelial así como de las yemas vasculares “in vitro” (Frater-Schröder y cols 1987; Schweigerer y cols 1987). Se sabe que este efecto paradójico es dosis-dependiente, lo que determina una curva bimodal de actuación. Así se ha observado que dosis bajas de TNF (0,01-1 ng) inducen angiogénesis "in vivo" por el contrario dosis superiores (1-5 µg) la inhiben (Fajardo y cols. 1992). Además está implicado en los procesos inflamatorios de forma que la secreción de prostaglandinas por parte de los macrófagos parece estar mediada por el TNF (Ben-Ezra y cols 1990). Cada día se descubren nuevas sustancias de este grupo que son capaces de estimular la angiogénesis como los recién descritos TWEAK y TRANCE, cuyos efectos activadores de la célula endotelial están mediados por receptores fosfolipasa. (Wiley y col. 2002; Kim y col. 2002).

1.2.3.1.5 Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Fue uno de los primeros polipéptidos reconocido como un factor de crecimiento identificados. Sus receptores son también tirosin-kinasa y una vez activados estimulan la proliferación y diferenciación de la célula endotelial. La propia célula endotelial puede sintetizarlo como señalaron DiCorleto y Bowen-

Pope en 1983. Se ha demostrado también que existen receptores en la propia célula endotelial lo que sugiere una forma de regulación autocrina y paracrina de la propia célula durante la angiogénesis. Hoy en día sus receptores y los genes que codifican a estos últimos se han convertido en dianas del tratamiento antitumoral. Uno de estos nuevos fármacos antiangiogénicos es el Imatinib Mesylato[®] cuya función es bloquear la actividad de la oncoproteína Bcr-Abl y también el receptor tirosin-kinasa del PDGF; su utilización ya ha sido aprobada para la leucemia mieloide crónica, con conocida respuesta al factor (George 2001).

1.2.3.1.5 Prostaglandinas

De toda la familia de lípidos prostanoides, el grupo de las prostaglandinas E son las que tienen actividad angiogénica, fundamentalmente PGE1 y PGE2. Juegan un importante papel en la cascada del proceso neovascular (Ben-Ezra 1978, Form y Auerbach 1983; Ziche 1989). Son capaces de inducir la gemación vascular desde las venas cuando se asocian a triacetina (Díaz-Flores 1994). No está claro el mecanismo de acción aunque estudios experimentales con implantes de esponja en ratas sugieren que las prostaglandinas pueden aumentar la expresión de VEGF. Además se sabe que sus niveles están elevados en los tumores, al igual que en las heridas en los procesos inflamatorios y en los macrófagos activados (Form y Auerbach 1983).

1.2.3.1.7 Angiogenina

Esta sustancia ha sido aislada a partir de células de adenocarcinoma de colon humanas. “In vivo” induce intensa angiogénesis en la membrana corioalantoidea

del pollo y en la córnea de la rata (Fett y cols. 1985). Participa en el proceso angiogénico activando la célula endotelial e induciéndola a secretar prostaciclina mediante la activación de la fosfolipasa (Bicknell y Vallee 1988).

1.2.3.1.8 Heparina

La heparina facilita la neovascularización a través de los siguientes mecanismos: libera de la matriz extracelular factor de crecimiento de fibroblastos FGF y lo protege de una eventual inactivación; además facilita la interacción de la célula endotelial con el FGF por la inducción de cambios en la estructura de este último. Finalmente estimula la activación y secreción del activador del plasminógeno. (Ribatti y cols 1987; Ehrlich y cols 1988; Bashkin y cols 1989; Gospodarowicz y Cheg 1986; Herbert y cols 1988; Gitay- Goren y cols 1992).

1.2.3.1.9 Hipoxia

Aunque, evidentemente, no es una sustancia, sí supone una condición microambiental de crucial interés en la angiogénesis, en especial en el caso de los tumores. Actúa como uno de los inductores más potentes de la secreción de VEGF. Este hecho parece estar regulado por unos factores, que junto a ciertas mutaciones en el gen supresor p53 juegan un papel fundamental en la sobreexpresión de VEGF (Scott y cols. 1998; Royds y cols. 1998).

1.2.3.2 Factores endógenos inhibidores de la angiogénesis

El término “inhibidor angiogénico” no fue introducido hasta el año 1975 por Brem y Folkman. Sin embargo ya se habían identificado varios factores

endógenos capaces de impedir la formación de vasos. Estos trabajos tuvieron gran interés ya que marcaron el comienzo del planteamiento de nuevas estrategias en la lucha contra enfermedades de pronunciado carácter angiogénico. En nuestro caso tienen especial interés en el crecimiento de los tumores. Aunque desde entonces se ha avanzado mucho y sería casi imposible tratar de ocuparnos de todas las nuevas sustancias, que se encuentran en estudio; vamos a centrarnos en aquellas más importantes por su actualidad y que ya han sido utilizadas en humanos.

1.2.3.2.1 Factor inhibidor derivado del cartílago.

A pesar de que los primeros años de la década de los setenta ya se sabía que extractos de cartílago eran capaces de inhibir la angiogénesis (Eisenstein y cols. 1973, 1975; Brem y Folkman 1975; Langer y cols. 1976), es en 1986 cuando Carmichael identificó, depuró y definió el factor inhibidor derivado del cartílago. Posteriormente en los 90 fue descubierto cuál era su mecanismo de acción; de hecho actúa como un inhibidor anulando la actividad de las metaloproteasas, y de esta forma es capaz de impedir la angiogénesis, modulando la proliferación y la migración de la célula endotelial. Su actividad está demostrada tanto “in vivo” como “in vitro” (Moses y cols 1990).

1.2.3.2.2 Trombospondina

Es una glucoproteína de elevado peso molecular capaz de modular diferentes secuencias de la angiogénesis. Es un inhibidor p-53 dependiente. Se ha demostrado que los macrófagos no sólo producen sustancias activadoras sino también inhibidoras como la trombospondina I (Silverstein 1986; Di Pietro y

Polverini 1993). A pesar de ser una molécula inhibidora son escasos los trabajos en los que se está estudiando su potencial actividad antitumoral y todos en fase experimental (Bogdanov y cols. 1999).

1.2.3.2.3 Angiostatina

Descubierta en 1994 por O'Reilly y cols. en el laboratorio de J. Folkman Es uno de los inhibidores endógenos más potentes que se conocen. Actualmente se ha visto que proviene de la fragmentación del plasminógeno; para lo cual se han propuesto mecanismos proteolíticos. Esto hace suponer que existen varias isoformas de angiostatina. Actúa de forma específica reprimiendo la proliferación y migración de la célula endotelial, tanto "in vivo" como "in vitro". Su utilización en la lucha contra el cáncer ya se ha iniciado en forma de angiostatina recombinante y se encuentra en estudio en Fase I (Soff G.A. 2000).

1.2.3.2.4 Endostatina

Descrita por Boehm y cols. en 1997 es un fragmento terminal del colágeno XVIII y pesa 20 kD. Su composición es a partir de proteoglicanos presente en las paredes de los vasos y en las membranas basales. Se genera a partir del colágeno XVIII mediante enzimas proteolíticos, incluyendo la catepsina L y las metaloproteasas de la matriz. La endostatina inhibe la migración de la célula endotelial "in vitro" y parece tener alta efectividad en los estudios "in vivo". Su mecanismo molecular de inhibición aún no está claro (Zatterstrom and cols. 2000).

1.2.4 Angiogénesis en los procesos neoplásicos

Como ya hemos señalado anteriormente los tumores sólidos “in vivo” cuando alcanzan 1-2 milímetros de diámetro necesitan de nuevos vasos sanguíneos para seguir creciendo, dicha neovascularización tiene un estímulo inicial fruto de la liberación de factores angiogénicos por las células tumorales y por las células inflamatorias.

El resultado es un complejo proceso con múltiples pasos que finalmente conduce a la formación de yemas vasculares y de redes capilares originadas probablemente de las vénulas postcapilares. El estímulo angiogénico se cree que ocasiona diversos cambios en las células endoteliales, incluyendo disolución de la membrana basal, migración, proliferación y cambios morfológicos de la célula endotelial. Dicho proceso está regulado por citokinas, moléculas de la matriz extracelular, integrinas, moléculas de adhesión, enzimas proteolíticas, carbohidratos, carbohidratos unidos a proteínas, hormonas esteroides, lípidos, iones metálicos así como una amplia variedad de sustancias de bajo peso molecular.

La entrada de los vasos sanguíneos y otros componentes del estroma del lecho hacia el interior del volumen tumoral, recuerda al tejido de granulación presente en el proceso reparativo, la diferencia estriba en que éste se produce de forma controlada cosa que no sucede en el desarrollo de neoplasias en el que junto a la inflamación hay una expansión permanente acompañada de un proceso vascular que evoluciona según la demanda tumoral. (Dvorak y cols. 1979; Folkman 1985).

La estructura organizativa de la microcirculación en el estroma tumoral no es tan jerárquica como en los tejidos normales; los tumores muestran cambios fenotípicos como vasos dilatados e irregulares así como una elevada proliferación de células endoteliales y una gran permeabilidad (Roftad 1984; Tanock y cols 1979; Warren y cols 1979). En definitiva, los vasos sanguíneos asociados al tumor presentan una membrana basal más débil y tienen menos pericitos e inervación; aspectos, estos, que pueden contribuir a una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos, favorecida a su vez por diversas citokinas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG) que es secretado por distintos tipos de células tumorales.

Estas múltiples alteraciones en la función de los vasos sanguíneos y su arquitectura pueden ocasionar cambios en el aporte de flujo y originar trastornos en el intercambio de metabolitos que generan una alta presión intersticial en el interior de los tumores sólidos lo que compromete la penetración de nutrientes a las capas más profundas y concluye con una necrosis local debido a que la perfusión tumoral, en esta zona, se hace insuficiente, a pesar del continuo proceso de neovascularización (Jain 1990 y 1994).

Expondremos a continuación las estrategias que se están desarrollando con el objetivo de inhibir la neovascularización tumoral.

1.2.5 Factores antiangiogénicos

Nos vamos a ocupar ahora de sustancias de síntesis que se están empezando a aplicar, como terapias, frente a enfermedades angiogénico-dependientes, en nuestro caso nos centraremos en aquellas con un marcado carácter antitumoral

1.2.5.1 Drogas inhibidoras de la célula endotelial

Entre ellas a parte de la ya comentada endostatina podemos encontrar:

- **TNP-470:** es un derivado antibiótico también denominado AGM-1470 ó O-(cloroacetilcarbamol)-fumagilol, cuyo precursor, la fumagilina (Ingber y col. 1990), fue descartado unos años antes por su alto grado de toxicidad. En un primer estudio se observó que su actividad radicaba en la inhibición de producción del activador del plasminógeno tipo urokinasa (Maiercols 1997). Un segundo estudio con colonias de células precursoras hematopoyéticas humanas demostró que el TNP-470, además, inhibe directamente el crecimiento de dichos progenitores (Hasuike 1997). Esto sugirió su potencial utilización en neoplasias hematológicas, y hoy en día se encuentra en estudios en fase II en pacientes con neoplasias sólidas avanzadas (cervix, Kaposi, próstata...), linfomas y leucemias agudas. También se ha demostrado que tiene efectos inmunosupresores a través de la inhibición de la metionina aminotransferasa (Wernert y cols. 1999; Lund y cols 2000; Turk y cols 1998)

- **Talidomida:** conocido antiemético utilizado hace 40 años en mujeres embarazadas y que se abandonó por su alta teratogenicidad, hoy en día se ha recuperado en la terapia contra el cáncer, dado que las alteraciones en el embrión eran debidas a su capacidad antiangiogénica. Este mecanismo de acción se basa en la modulación de las integrinas que no son otra cosa que proteínas de adhesión de

baja especificidad de las células. Un reciente estudio en fase II ha demostrado que tiene actividad antitumoral en pacientes con mieloma múltiple refractario al tratamiento. (Hambry J.M. 1999; Rosen L. 2000).

- **Combretastatin:** es un agente ligando de la tubulina que tiene una probada citotoxicidad in vitro para células endoteliales en el momento de la proliferación; de hecho es el único agente que produce apoptosis y no exclusivamente inhibición en las células endoteliales. Estudios en fase I indican que puede ser útil en la inhibición de la vascularización de tumores humanos y de sus metástasis (Rosen L. 2000; Griggs 2001)

1.2.5.2 Drogas represoras de los activadores de la angiogénesis

- **SU5416:** es una pequeña molécula que bloquea la kinasa insertada en el receptor del VEGF a través del cual actúa dicho factor de crecimiento. Se encuentra en fase I y II para sarcomas de Kaposi y tumores de colon avanzados y metastásicos; se encuentra en fase III para pacientes con tumores de colon avanzado no tratados previamente y en tumores de pulmón no microcíticos (Rosen y cols 2000; Hambry J.M. 1999).

- **SU6668:** Es un compuesto, de bajo peso molecular, que bloquea el receptor del VEGF, del FGF y del PDGF, por el momento se encuentra en estudios en fase I en tumores avanzados. (Rosen L. 2000).

- **Interferon alfa:** a pesar de que se encuentra disponible para uso clínico desde hace más de 15 años y que ha demostrado un 30% de respuestas en Sarcomas de Kaposi asociados a SIDA, se ha visto que es útil también frente a hemangiomas, leucemias mieloides crónicas, mielomas, melanomas,

linfomas y tumores de células renales. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la producción de el bFGF y del VEGF. (Rosen L. 2000).

- **Anticuerpos anti-VEGF:** en estudios en fase II para tumores de células renales, tumores de próstata avanzados carcinomas de pulmón no microcíticos y otros tumores sólidos. (Rosen L. 2000)

1.2.5.3 Drogas inhibidoras de la degradación de la matriz extracelular

- **Marimastat (BB2516):** es un compuesto peptídico sintético que bloquea la convertasa del TNF e inhibe las Metaloproteasas. De hecho es el primero que presenta biodisponibilidad oral y ya se utiliza en estudios en fase III para tumores de páncreas, gástricos y gliomas. En el momento actual se están desarrollando estudios en fase III combinado con la Radioterapia y la quimioterapia. (Rosen L. 2000; Steward WP y cols. 2000 Hambry J.M. 1999)
- **Prinomastat AG-3340:** es una molécula de síntesis no peptídica. Actúa como un potente inhibidor de las metaloproteasas MMP-2, -9, -13 y -14 de la matriz. Ha demostrado su eficacia en estudios preclínicos y actualmente se prueba en ensayos en fase III en combinación con paclitaxel y carboplatino en tumores no microcíticos de pulmón, así como en tumores de próstata refractarios a tratamiento hormonal. (Scatena R. 2000; Hambry J.M. 1999).
- **Neovastat:** es un inhibidor de las metaloproteasas de la matriz MMP-2, -9 y -12, aunque también actúa a otros niveles como en la inhibición del VEGF a través de su receptor dependiente de la tirosina. Se está utilizando en ensayos en fase III para tumores de pulmón no microcíticos en estadios IIIA y

IIIB. Se aplica también en pacientes con tumores de células reales en la misma fase de estudio. (Falardeau 2001; Rosen L 2000).

- **Bay 12-9566:** es también un inhibidor sintético que actúa selectivamente sobre las MMP-2, -3 y -9. Se están realizando estudios en fase I y II para tumores de ovario y de páncreas (Heath E.L. and O'Reilly 2001; Rosen L 2000).

Señalar por último otros compuestos sintéticos y que inhiben diferentes tipos de MMP podemos citar: COL-3, MM-1270, BMS-275291; todos ellos constituyen, lo que aparentemente es, un futuro prometedor en la lucha contra las enfermedades neoplásicas, aunque a decir verdad ninguna se ha comportado como una sustancia con capacidad específica y totalmente efectiva, si bien su utilidad parece ir unida a las terapias convencionales como la Radio y la Quimioterapia.

1.3 Modelos experimentales para analizar la respuesta angiogénica

Desde los estudios clásicos sobre morfogénesis y permeabilidad de los nuevos vasos sanguíneos (Clark y Clark 1935; Schoefl 1963; Warren 1963) se han realizado un elevado número de estudios “in vivo” e “in vitro” encaminados a comprender el fenómeno angiogénico. Señalaremos que la utilización de polímeros inertes, con capacidad de liberación sostenida de factores angiogénicos o antiangiogénicos (Langer 1976; Murray 1983 y Rhine 1980) ha sido de gran interés para algunas de las técnicas experimentales.

1.3.1 Modelos “in vivo”

Incluyen modelos donde la respuesta angiogénica puede ser analizada en áreas específicas y en condiciones controladas. Así podemos señalar el uso de córneas de conejo (Folkman 1985b), rata (Gimbrone y cols 1974 Fournier y cols 1981), ratón (Auerbach 1991) o del hámster que constituyen un lugar apropiado para demostrar el proceso de neovascularización, ya que normalmente son completamente avasculares y los neovasos se pueden distinguir de los vasos del limbo, permitiéndonos un substrato transparente en el que podemos monitorizar la respuesta angiogénica (Culton y cols. 1990; Greenberg y cols. 1978; Haynes, 1989; Polverini y cols. 1977; Proia y cols. 1988). Los estímulos inductores de la neovascularización utilizados en estos modelos experimentales han sido lesiones, tumores o polímeros una vez implantados en la zona central de la córnea. Otro modelo destacable ha sido la membrana corioalantoidea (Alfthan y cols. 1956; Auerbach y cols 1981 y Folkman 1982) o el saco vitelino del embrión de pollo (Takiwana 1990) que poseen un sistema inmune inmaduro permitiendo el

crecimiento de injertos. Otros sitios inmunológicamente privilegiados utilizados han sido: la "bolsa" en la mejilla, la cámara anterior del ojo del hámster (Davis 1988), el saco dorsal aéreo, el método "blister" (Selye 1953), el mesenterio (Norrby 1986 y 1990).

Se han utilizado también implantes subcutáneos de cilindros de poliuretano (Bishop 1989 y 1990) y las esponjas de alcohol polivinílico, conteniendo polímeros que son liberados lentamente a través de los microporos (Fajardo 1992); así como el implante subcutáneo de matrices que actúan como iniciadores de la angiogénesis y permiten la introducción de sustancias problema (Dvorak 1987) y de células o fármacos en alginato (Plunkett 1990; Robertson 1991).

1.3.2 Modelos "in vitro"

El fenómeno angiogénico ha sido estudiado morfológicamente por diferentes sistemas "in vitro" (Dvorak y cols 1988; Folkman 1988; Heimark y cols 1988; Madri 1982). Después de la introducción de métodos para cultivo de células endoteliales (Gimbrone y cols 1973; Jaffe y cols 1972) se comprobó que éstas, aisladas tanto de pequeños como grandes vasos han sido capaces de formar "in vitro" "redes capilares-like" cuando se mantienen bajo condiciones de cultivo apropiadas. (Folkman 1979; Kubota y cols. 1988; Maciag y cols 1982; Montesano 1985).

Los sistemas "in vitro" con formación de estructuras "capilares like" han sido realizados en cultivos de células endoteliales de varios tipos de vasos sanguíneos, tales como vena humana umbilical (Maciag y cols. 1982), aorta bovina (Fajardo

1982), capilares bovinos (Folkman 1980; Montesano y cols. 1989 y capilares de ratas (Madri 1982).

Los resultados de los estudios han permitido establecer diferentes parámetros entre los que podemos señalar el grado de recubrimiento de una superficie desnuda en una capa confluyente de células endoteliales; en estas condiciones, la migración de células endoteliales da un valor cuantificable de la respuesta angiogénica (Pepper y Montesano 1990). Un segundo aspecto estudiado ha sido la quimiotaxis y quimioquinesis de las células endoteliales usando diferentes procedimientos (Obeso y Auerbach 1984 Taraboletti y cols 1990) tales como el ensayo fagocinético en el que las células se mueven sobre una monocapa de oro y fagocitan las partículas coloidales, dejando “ huellas migratorias” (Zetter 1988). También se ha comprobado el grado de proliferación endotelial en cultivos con factores test, que es determinada por la síntesis o el contenido de DNA (Simionescu 1991).

Los estudios “in vitro” nos han permitido analizar los cambios en la función de las células endoteliales durante la angiogénesis, así como las modulaciones en la producción de citokinas (Shepro 1988), actividad fibrinolítica, síntesis de la lámina basal, la formación de vasos con relación al estroma (Maciag y cols. 1982) o el papel de los pericitos en la angiogénesis usando co-cultivos tanto de pericitos como de células endoteliales (D’Amore 1987).

Estas posibilidades para el estudio "in vitro " de la angiogénesis se han visto reforzadas por la posibilidad de ensayos tridimensionales y la utilización de cultivos sobre Matrigel (Goto y cols 1993; Madri y cols. 1988; Williams 1993)

1.4 Acción de las radiaciones ionizantes sobre la microvascularización

Una de las dianas más importantes sobre la que actúan las radiaciones ionizantes en los tejidos es la microcirculación y más concretamente sobre la célula endotelial.

La sensibilidad de la célula endotelial a las radiaciones tanto “in vivo” como “in vitro” ha sido analizada por numerosos autores, y se ha demostrado que la lesión celular depende de la dosis. (Fajardo y cols 1973; Gillete y cols. 1975; Hopewell 1986; DeGowin y cols. 1976; Johnson y cols. 1982; Kwock 1987; Martin 1984; Reinhold 1973).

1.4.1 Alteraciones morfológicas

Las alteraciones morfológicas de la célula endotelial fruto tanto de las dosis letales como de las subletales han sido descritas en detalle tanto en cultivos como en muestras de tejidos de mamíferos irradiados (Johnson y cols. 1982).

El capilar es la estructura que manifiesta morfológicamente de forma más precoz el daño radioinducido. La lesión se establece desde el momento de la radiación y durante las horas y días posteriores el endotelio muestra cambios evidentes tales como retracción, pleomorfismo y vacuolización (Adamson 1983; Fajardo 1973). Las células vacuoladas tienden a desprenderse, produciendo áreas de denudación de la basal y oclusión de la luz capilar por restos celulares y microtrombos. Ocurre entonces agregación plaquetaria y se producen trombos fibrino-plaquetarios que además obstruyen el capilar. Algunos capilares se pierden

y son sustituidos por cordones fibrosos, otros se obliteran de forma transitoria y eventualmente se recanalizan (Phillips 1966).

Asociado a la pérdida celular endotelial pueden encontrarse cambios regenerativos, como el engrosamiento y elongación de núcleos celulares, figuras de mitosis y presencia de pares o grupos de núcleos en puntos determinados de un vaso, desprovisto por lo demás de elementos endoteliales. En ocasiones estos cúmulos parecen ocluir totalmente la luz del vaso. Además, puede existir cierta neovascularización durante las primeras horas aun en ausencia de proliferación endotelial efectiva, gracias a la formación de pseudópodos y prolongaciones endoteliales. (Phillips 1966; Fajardo 1973; Sholley 1984).

1.4.2 Alteraciones funcionales

Observaciones ultraestructurales con el uso de radiotrazadores y de tinciones vitales han puesto de manifiesto que hay un incremento en la permeabilidad vascular tras la irradiación (Easa 1973; Evans 1986; Grunt 1986 Law y cols 1978; Maisin 1974; Tsao 1983).

Algunas de las funciones de las células endoteliales han sido estudiadas en función de la interacción con las radiaciones ionizantes como la disminución en la síntesis de prostaciclina y la pérdida de la actividad fibrinolítica (Allen y cols. 1981; DiPietro y Poverini 1993; Henderson y cols. 1983; Sinzinger y cols. 1985; Tsao y cols. 1983).

1.4.3 Parámetros radiobiológicos

Algunos de los estudios iniciales, usando células endoteliales de la vena umbilical, mostraron una inhibición del crecimiento entorno al 37% con dosis de 160 cGy y completa inhibición con dosis de 750 cGy. La inhibición del crecimiento fue dosis-dependiente y la disminución en la eficacia de unión fue descrita con células endoteliales de aortas bovinas tras ser expuestas a dosis únicas entre 200 cGy y 250 cGy, tal y como señalan Johnson y cols. (1982). Explantes de células de las íntimas de aortas de conejos o monos mostraron una reducción del 50% en el crecimiento tras dosis de 200 cGy y del 99% con dosis de 750 cGy (Fischer-Dzoga 1984). Estas células fueron más sensibles que las células de la capa media (probablemente miocitos) y que las de la adventicia (presumiblemente fibroblastos) de los mismos vasos (Fischer-Dzoga 1984).

Existen numerosos ensayos clonogénicos dirigidos a cuantificar la radiosensibilidad de las células endoteliales procedentes de diversos órganos de mamíferos (Marin 1984; Penhaligon 1985). De éstos se obtienen globalmente las siguientes cifras:

D_0 (Célula endotelial aorta bovina)= 1,01 Gy

D_0 (Célula endotelial porcina)= 1,57 Gy

n (célula endotelial aorta porcina)= 1,21 Gy

n (célula endotelial aorta conejo)= 1,7Gy

$Dq = 3Gy$.

En todos los casos la radiosensibilidad medida por D_0 fue mayor para las células endoteliales que para los miocitos y células de la adventicia de los mismos vasos, cultivadas en condiciones semejantes Fajardo 1989

El efecto sobre las distintas células fue dosis dependiente (Rhee 1986).

1.4.4 Cronología

La pérdida del árbol vascular en conjunto se inicia, para los pequeños y medianos vasos, unos días después de la irradiación, de manera lenta y progresiva, con variación de un órgano a otro: En el pulmón aparece tan rápido como un día después de una dosis simple de 20 Gy en el hemitórax de la rata y puede detectarse en ratones a las pocas horas.

A los tres meses ha desaparecido el 50% de los microvasos y no se alcanza el 100% hasta el séptimo mes. Para los vasos de mayor calibre (más de 16 μm) la latencia es bastante mayor; hasta el tercer mes apenas han disminuido, comenzando a partir de este momento y hasta los nueve meses (Hopewell y cols 1989)

En sistemas vasculares simples, como los cultivos celulares, la pérdida de células endoteliales tras la irradiación es bastante precoz. El marco radiobiológico vendría dado por la destrucción temprana de una pequeña fracción de células endoteliales de ciclo celular corto y con Alfa/Beta alto, a diferencia del resto de componente endotelial (Hopewell y cols 1989). La pérdida de células musculares y otros elementos del vaso presentan una latencia mayor.

1.5 Efecto Lecho Tumoral (TBE)

El término efecto lecho se utiliza para describir el retraso en el crecimiento que sufre un tumor implantado en una zona irradiada, así como los cambios observables en dichas circunstancias. Aunque estas condiciones se han intentado reproducir con otros agentes físicos como la hipertermia o químicos como la quimioterapia los resultados no han sido los mismos por lo que hoy en día “Efecto Lecho Tumoral” ó TBE es equivalente a “Efecto Lecho Irradiado”.

El estudio del TBE se ha llevado a cabo de forma experimental sobre animales de laboratorio a los que se les inocula tumor, y en trabajos clínicos analizando mediante la observación la evolución de recidivas en campo irradiado.

Fue descrito por primera vez por Stenstrom y col en 1955 y 1956 aunque en estos mismos artículos, señalan trabajos realizados con anterioridad como los de Frank y Kinball en 1914. En esta misma línea señalar los de Merwing y col. Posteriormente se han realizado investigaciones en las que se describen los mecanismos que dan lugar al fenómeno: Summers y cols 1964, Clifton 1975 Hewitt y Blake 1968 Urano y Suit 1971, y otros.

Entre estos mecanismos estudiados destacan como mecanismo principal la dificultad del estroma del lecho irradiado para suministrar neovasos al tumor; Van der Brenk y cols en 1977 demostraron una disminución de las yemas vasculares después de la irradiación del lecho que se traducía en una reducción de hasta el 50% del flujo sanguíneo al tumor.

El TBE se considera dentro de la radiobiología como un efecto tardío aunque su Alfa/ Beta es de 6,2 Gy, que es el límite entre tejidos de respuesta aguda y tejidos de respuesta lenta.

1.5.1 Comportamiento de un tumor en un lecho irradiado

Un tumor implantado en un lecho irradiado crece a un ritmo más lento que sobre un lecho no irradiado, este retraso se acompaña de una disminución del aporte vascular (Jirtle y cols 1978; Leith y cols 1988).

Por otro lado la TD50 o número de células de tumor necesarias para que los implantes sean viables y desarrollen tumor en el 50% de los animales fue siempre menor en el lecho irradiado; es decir son necesarias menos células si irradiamos el lecho, aunque eso sí, con el ya señalado retraso en el crecimiento. (Ando y Kokie 1985; Milas y cols. 1987; Van der Brenk y cols. 1977).

Otro aspecto importante que señalan varios autores es el aumento del número de metástasis en el efecto lecho, sin embargo éste es un hecho discutible ya que el número de metástasis se define para un mismo volumen tumoral y queda claro con lo ya expuesto que en el TBE el intervalo temporal para alcanzar dicho volumen es mayor y esta es una variable no bien cuantificada (Milas y cols. 1987 y 1988; Van der Brenk y cols 1977).

Por último se ha descrito un peor respuesta al tratamiento oncológico tanto radiológico como quimioterápico, todo ello en relación con un tumor que está por definición menos vascularizado, más hipóxico y necrótico con lo que disminuyen las probabilidades de que responda a los diferentes tipos de terapias. (Ito 1985; Milas 1988).

1.5.2 Parámetros que modifican el TBE

Los siguientes factores modifican ciertos aspectos del Efecto Lecho:

Dosis

El TBE es dosis dependiente y su representación gráfica en curvas de dosis-respuesta es un trazado sigmoideo (Milas L 1988; Camplehon y cols 1985). El efecto se manifiesta de forma sutil con dosis de entre 5 a 10 Gy y aumenta progresivamente hasta los 20-30 que es el momento donde se alcanza la meseta de la curva que se mantiene por lo menos hasta los 60 Gy (Milas 1986)

Tiempo

De los estudios experimentales puede extraerse que las alteraciones biológicas responsables del TBE son sólo temporales. Si el intervalo irradiación-inoculación excede los 200 días, los parámetros receptividad y producción de metástasis son indistintos al grupo control; en tanto que el retraso en el crecimiento se mantiene modestamente. La alteración suele ser mayor para todos los parámetros cuanto menor es el intervalo citado.

Fraccionamiento

Trott y Kummermehr demostraron que para el adenocarcinoma 284 el fraccionamiento afectaba al TBE (i.e mayor recuperación con el fraccionamiento de dosis) Otras experiencias han ido dirigidas a evaluar la importancia del fraccionamiento en condiciones de mayor o menor hipoxia existe un mayor efecto del fraccionamiento en tumores oxigenados y en la ausencia de reoxigenación, la conclusión fue que las células aeróbicas se recuperaban más que las hipóxicas.

Extirpe tumoral

Si sólo el daño vascular inducido por la irradiación jugara un papel en este fenómeno, el TBE sería independiente del tumor, pero parece que esto no es así de manera que el efecto lecho no se manifiesta igual en función de la extirpe tumoral; aunque no está clara la razón una posible justificación es la diferente capacidad de inducir angiogénesis de los distintos tumores.(Milas 1988)

1.6 Nuestra experiencia

Desde la perspectiva radibiológica la angiogénesis tumoral es una diana para el estudio del crecimiento tumoral bajo el influjo de las radiaciones ionizantes así como un objetivo para inhibir dichos procesos malignos.

Un modelo conocido y utilizado habitualmente en Radiobiología es el denominado efecto lecho o TBE (Tumour Bed Effect) y es este efecto el que nos ha servido para realizar diversos trabajos orientados al estudio de la angiogénesis.

La línea de investigación que venimos desarrollando conjuntamente, con el Departamento de Anatomía Patológica ha cristalizado en la realización de diversos trabajos de tesis en los que se ha valorado, fundamentalmente, la inducción angiogénica, así como la proliferación y diferenciación del tejido mesenquimal implicado en los procesos de reparación y de crecimiento tumoral. Para ello en un principio se realizaron implantes de materiales inertes como polímeros de poliuretano, se estudió de esta manera cómo se afectaban los procesos de reparación bajo la influencia de las radiaciones, concluyéndose que éstas inhiben el proceso reparativo pero no el inflamatorio (Rodríguez F 1991). Seguidamente y para establecer una comparación de dicha respuesta bajo el efecto de distintas dosis de radiación, se llevaron a cabo implantes de tejidos autólogos inductores de dichos procesos, tales como pericondrio auricular, fragmentos de vejiga urinaria y córneas lesionadas con nitrato de plata (Arteaga 1985; Mora ML 1988). Ya desde el comienzo nos llamó la atención como en lechos expuestos a dosis altas de radiación, tanto la angiogénesis como la proliferación y la diferenciación inducidas por el implante, con dosis iguales o inferiores a 50 Gy no disminuyeron como cabría esperar.

Posteriormente se planteó el estudio de las metástasis tumorales utilizando el ya conocido efecto lecho, para ello, se procedió a la inyección de una suspensión de células de melanoma B16/F10 en la vena dorsal de la cola del ratón C 57/B16 al que se le había irradiado el pulmón derecho; esta cepa de tumor posee una gran aptitud por formar metástasis pulmonares (Otón LF 1997).

En el último trabajo decidimos estudiar el crecimiento tumoral y la angiogénesis del melanoma B16/F10 implantado sobre lecho irradiado con dosis exageradamente altas, para ello se injertaron fragmentos de 1mm³ de melanoma, o su equivalente en células cultivadas “in vitro”, en la pata del ratón. (Peñate 1998). Pudimos comprobar cómo en los grupos en los que el lecho (pata posterior derecha) se expuso a una dosis tan alta como 80 Gy en dosis única, sin irradiar el implante tumoral, no se inhibe el proceso angiogénico ni el crecimiento tumoral. En ese último trabajo se descartó el lecho como origen de la neovascularización, por la altísima dosis administrada (80 Gy en sesión única) se excluyó también el propio implante como fuente de células endoteliales ya que se procedió a la inoculación de una suspensión celular proveniente de cultivos. Se planteó la hipótesis de que el margen sano del campo de irradiación es el probable origen de los neovasos. Con el fin de responder a esta incógnita nos planteamos este trabajo sobre el mismo modelo de estudio y utilizando el TBE pero procediendo al implante del melanoma en una zona más alejada del margen sano del campo de irradiación, en una zona pobremente vascularizada.

2. OBJETIVOS

1.- Determinar si los neovasos que aparecen en el melanoma implantado sobre lecho irradiado provienen del margen no expuesto.

2.- Conseguir un lecho sin capacidad de respuesta angiogénica utilizando altas dosis de radiaciones ionizantes.

3.- Comprobar si un implante de melanoma del ratón es capaz de crecer en un lecho sin angiogénesis.

4.- Averiguar el comportamiento del melanoma en condiciones de ausencia de angiogénesis.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Animal de estudio

Hemos utilizado la cepa de ratón C57BL/6, obtenida del Frederick Cancer Research, sana y libre de parásitos. Elegimos esta cepa de ratones por la gran capacidad angiogénica del melanoma que se les puede transplantar de manera sencilla. Desarrollada por Little en 1921, fue introducida por el Jackson Laboratory en 1948 (generación F-22) y posteriormente en la empresa IFFA CREDO en 1981 de donde fueron obtenidos para este experimento. Tras presentar un melanoma espontáneo en la base de la oreja (aislada por el Jackson Laboratory a principios de los años setenta, Fidler, aisló y cultivó células procedentes de las metástasis pulmonares del citado tumor.

Los animales presentan pelaje y ojos negros, extremidades finas y talla bastante pequeña. Poseen gran motricidad y preservan ritmo circadiano. Algunos animales tienen alopecias parciales.

Son un buen modelo experimental para estudios de toxicología y farmacología, así como para trabajos de experimentación infecciosa e inmunología. Su utilización en Oncología está muy extendida, tanto por la posibilidad de inducción tumoral que presentan (tumores subcutáneos por 3-metilcolantreno (Kouri, 1973); tumores cutáneos tras exposición a DMBA (Thomas, 1987); linfomas por administración de colantreno oral (Aakamatsu, 1974) como para la investigación con cepas transplantables (Adenocarcinoma mamario BW10232, Leucemia mieloide C 1498, carcinoma de células prepucciales ESR

586), y el melanoma B16. De igual modo es frecuentemente elegido para la realización de estudios con radiaciones ionizantes.

Los animales fueron manipulados siguiendo las normas del Comité de Cuidados para Animales de Experimentación de La Universidad de La Laguna.

Utilizamos un total de 64 animales de los que 9 fallecieron antes de completar el seguimiento. Distribuimos los ratones en grupos como posteriormente señalaremos entre las series de estudio y las de los controles. Realizamos control ponderal de los animales con báscula de precisión Mettler PM 2000 (GERMAN WEBER, S.A.), antes de la inducción anestésica. Del total de los 44 animales del estudio el rango de peso se estableció entre los 22,3 y los 29 gramos, siendo la media de 24,6gr con una desviación estándar de $\pm 1,7$ gr.

La administración de agua y de comida fue a demanda. La temperatura ambiente osciló entre los 24 \pm 2 ° C. En cada jaula colocamos seis animales para control evolutivo. Utilizamos como lecho, viruta de madera especialmente tratada para su uso en laboratorios de experimentación animal.

Las jaulas fueron del tipo 500 de Macrolón con rejas apilables de acero inoxidable (22 x 22 x 14,5 cm), superficie basal 500 cm². Cada jaula la etiquetamos recogiendo los siguientes datos: Departamento que lleva cabo el estudio, cepa de animales, fecha de inicio del experimento, serie de estudio, número asignado, fecha prevista del sacrificio y doctorando responsable. Los animales fueron sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

3.2 Criterios de inclusión

Los animales que elegimos para el estudio fueron todos machos, para evitar posibles interferencias hormonales (Fidler 1973; Bowersox y cols 1985; Dyce y cols 1992) La línea de células tumorales se mantuvo en hembras sanas no preñadas sin limitación de edad.

La edad de los animales osciló entre las 8 y 10 semanas en el momento de entrar en el estudio. A esta edad el ratón ha completado su desarrollo y está cerca de su peso máximo, que se alcanza en la undécima semana.

Criterios de exclusión

Peso inferior a 22 gr.

Mal estado general.

Cualquier problema físico detectable a la inspección o palpación durante el seguimiento o en el momento de la inclusión.

Zona del Implante

La zona escogida para el implante en nuestro caso, por su sencillo acceso quirúrgico, la reproducibilidad que ofrece y la posibilidad de no irradiar el resto del animal fue la pata posterior derecha. A diferencia de los trabajos previos de nuestro grupo donde el implante se realizaba exclusivamente a mitad del muslo en este estudio alejamos el implante del margen de irradiación en diversos grupos de estudio y lo colocamos justo por encima del tobillo. De esta forma quisimos dificultar en lo posible la potencial llegada de vasos desde el margen de campo. Además para realizar el implante, utilizamos los planos de clivaje para evitar que

se lesionaran los tejidos adyacentes y así desencadenar una respuesta reparativa sobreañadida que facilitará la neoangiogénesis.

3.3. Modelo tumoral

Utilizamos la cepa de melanoma B16-F10. La línea parental fue aislada a partir de aparición espontánea de un melanoma en la base de la oreja de un ratón de la cepa C57/BL6 y aislada por el Jackson Laboratory. Tras presentar un melanoma espontáneo en la base de la oreja (aislada por el Jackson Laboratory) a principios de los años setenta, Fidler, aisló y cultivó células procedentes de las metástasis pulmonares del citado tumor y las inyectó en otro animal que desarrolló a su vez nuevas metástasis pulmonares de manera que al repetir esta operación durante 10 ciclos obtuvo la cepa celular B16-F10 que presenta una conocida apetencia por el parénquima pulmonar y gran capacidad angiogénica.

Esta línea parental de melanoma es fácil de mantener mediante su inyección subcutánea en un animal singénico de la misma cepa. También es sencilla de conservar en cultivo, y ya de forma primaria presenta gran capacidad angiogénica y metastásica.

De la línea original se fueron separando variantes, cada una de las cuales destaca por un comportamiento característico: B16-BL6 (altamente metastásico); B16-F1 (pobrementemente metastático); B16_a (amelánico, metástasis espontáneas); B16-PA4M (metástasis ganglionares); B16-F10 (especificidad y rendimiento en metástasis pulmonares); B16-O10 (especificidad para las metástasis ováricas).

3.3.1 Conservación de la línea celular

Para su disponibilidad las células de melanoma se mantienen en Laboratorio de la Unidad de Radiobiología del Departamento de Radiología y Medicina Física de tres formas distintas pero simultáneas y que a continuación detallamos:

3.3.1.1 Criopreservación

Tras su adquisición en el año 1994 a través del Frederick Cancer Research (tres millones de células de melanoma B16-F10 en un vial de 2cm³) se procedió a la congelación en Nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, de 6 viales de 250.000 células cada uno. Dichas célula fueron tratadas previamente con EDTA y reservadas en un recipiente con este fin. De esta forma siempre existen viales disponibles con células en un Denvar (Foto 1).



Foto 1.- Denvar y depósito de Nitrógeno líquido

3.3.1.2 “In vivo”

Una segunda muestra celular se destinó al implante en el flanco derecho de ratones hembras destinadas a este efecto. La elección de esta zona de implante se realizó en función de la elasticidad que presenta lo que permite un gran crecimiento tumoral en forma de nódulo solitario, homogéneo y de fácil acceso.

Entre los 7 y 14 días se procede a la extracción tumoral. La elección de este intervalo de tiempo se debe a que a mayor tiempo existe mayor tamaño tumoral pero también encontramos zonas necróticas más extensas que ponen en peligro la calidad y viabilidad del implante.

La extracción tumoral consiste en la aplicación de una dosis letal de anestésico por vía intraperitoneal. Tras restringir los movimientos del animal, para facilitar el manejo operatorio, procedemos a la localización de la zona de acceso mediante la visualización. Rasuramos la zona elegida y realizamos una incisión longitudinal en el flanco derecho del ratón. A continuación extraemos el nódulo en condiciones de esterilidad y lo fragmentamos sobre una placa de Petri para desechar las partes necróticas. Los fragmentos restantes se lavan con suero fisiológico estéril. Las porciones resultantes, de un tamaño aproximado de 1mm^3 las lavamos en otra placa de Petri con una solución antibiótica de Anfotericina B: $200\ \mu\text{g/ml}$; Penicilina: $10000\ \text{U/ml}$; Estreptomina: $10000\ \mu\text{g/ml}$.

Estas fracciones las implantamos directamente en nuevos ratones que son de nuevo utilizados como reservorio, o bien en la zona de estudio para aquellos ratones machos que habíamos incluido en los grupos del trabajo.

Estos fragmentos también los podemos utilizar para promover su cultivo “in Vitro” tras la realización de una disgregación mecánica y química.

3.3.1.3 “In Vitro”

Las células de melanoma se mantienen en cultivo monocapa en frascos de tipo Falcon, suministrados por Bibby Cultures, con 25 cm² de superficie.

El medio de cultivo consiste en una mezcla de Minimal Essential Medium (MEM) con solución salina balanceada de Hank (HBSS), libre de Calcio y magnesio, suplementada con un 10% de suero bovino fetal. Los frascos con la suspensión celular y 5ml del medio de cultivo, permanecen en incubadora modelo Yamato IT62 de la casa HTEC, a 37 ° C, en un ambiente humidificado compuesto de 95% de aire atmosférico y 5% de anhídrido carbónico.

El cambio de medio se realiza cada tres días y subcultivos cada seis o cuando las células llegan a la confluencia. Para subcultivar se desprenden las células de la pared basal del frasco por medio de tripsina EDTA fría y, previa dilución, se siembran en nuevos frascos con medio de cultivo. Los subcultivos nunca se realizan en más de 5 ocasiones a partir de un medio primitivo, ya que están descritas degeneraciones fenotípicas; por ello los cultivos han de ser renovados con células provenientes de tumor “in vivo”. Para ello se parte de los pequeños fragmentos de tumor obtenidos de los animales reservorio, son sometidos a un nuevo lavado con una mezcla de MEM a la que se le añade una solución antibiótica de Penicilina, Anfotericina B y Estreptomina. A continuación se procede a convertir los acúmulos en entidades celulares simples por disgregación química, con tripsina al 0,1%. El resultante se somete a centrifugación a 1200 r.p.m. durante tres minutos, se desecha el sobrenadante, identificándose las células tumorales como un pequeño acúmulo negro en el fondo del tubo. Se diluye en

medio de medio de cultivo por agitación vigorosa, se pasa a los frascos y por fin a la incubadora.



Foto 2.- Incubadora y botella de CO₂ en la Unidad de Radiobiología

Las células obtenidas de los medios de cultivo tienen tres destinos: su utilización para realizar estudios en nuevos cultivos, el implante subcutáneo de las mismas en número superior a 10.000 células para mantenimiento de la línea “in Vivo” y la criopreservación en Nitrógeno líquido después de realizar disgregación química y añadirle EDTA como criopreservante.

3.4 Anestesia

Tanto para la irradiación e implante como para la necropsia se procedió a la anestesia de los animales mediante la administración de Ketamina y Clorbutol por vía intraperitoneal:

Realizamos anestesia superficial para la irradiación e implante mediante inyección intraperitoneal de:

Ketamina + clorbutol: 0,07 mg/gr de peso (Imalgene[®] Lab. Rhone Merieux) y tiazina: 0,01 mg/gr peso (Rompún[®] Lab. Bayer).

3.5 Técnica quirúrgica

Tras anestesiar al animal como hemos indicado anteriormente, procedimos a la correcta inmovilización del mismo así como al rasurado de la zona de estudio. Después de esterilizar la pata con Povidona Yodada (Betadine[®]) se realizaba una incisión lineal de unos 5 mm en la porción más próxima al tobillo y disección roma del fascículo muscular donde se dejaba un bolsillo en el que se depositaba 1 mm³ de tumor sólido (Foto 3). Cuando el implante se realizaba en el muslo el proceso era idéntico y únicamente cambiamos la localización anatómica (Foto 4). Finalmente se procedía a la sutura por planos y nueva desinfección de la herida. Tras etiquetar al animal se depositaba en su jaula para seguimiento hasta el día del sacrificio.



Foto 3.- Implante en tobillo



Foto 4.- Implante en muslo

3.6 Necropsia

Para la necropsia utilizamos una dosis supraletal de anestesia mediante la administración intraperitoneal de

Ketamina + clorbutol: 0,14 mg/gr de peso (Imalgene ® Lab. Rhone Merieux) y tiazina: 0,02 mg/gr peso (Rompún® Lab. Bayer).

Transcurridos los catorce días de estudio tras la irradiación y/o el implante procedimos al sacrificio de los animales incluidos en el estudio.

Después de verificar la muerte del animal tras la administración de una dosis letal de anestésicos procedíamos a fijar el animal en la mesa quirúrgica, en posición prona. Realizábamos una incisión vertical paralela al fémur de la pata dejando expuesto el paquete muscular. Recogimos los datos macroscópicos del tumor tales como forma, así como el aspecto tanto del melanoma como de las

zonas circundantes. Prestamos especial atención a la existencia y características de los vasos visibles en la zona y su disposición.

Procedíamos posteriormente a la disección de la masa tumoral y a su medición en los tres ejes (largo, ancho y alto) (Foto 5) y pesábamos el tumor con balanza electrónica (GERMAN) quedando todo anotado en la hoja de recogida de datos (anexo).

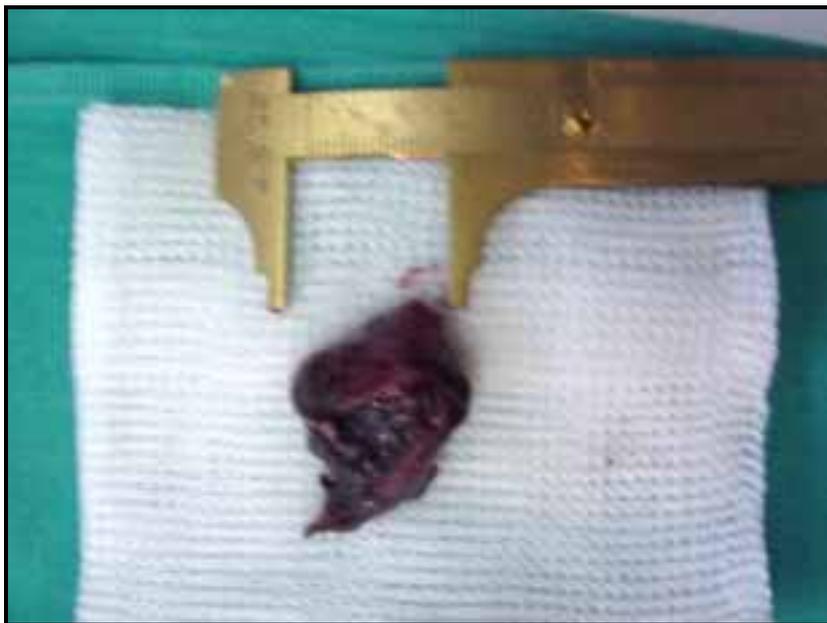


Foto 10.- Midiendo el tumor

La fórmula utilizada para averiguar el volumen, a partir de las tres dimensiones medidas en el tumor, fue la de los semiejes que aquí presentamos (Murray R 1982):

$$V = \frac{4}{3} \pi X * Y * Z$$

Tomábamos muestras del tumor para microscopía electrónica incluyéndolas en glutaraldehído; el resto de la masa se incluía en formaldehído para su estudio bajo microscopio óptico. Todos estos aspectos los apuntamos en la hoja de recogida de datos y a cada una de las muestras se le asignaba un número de entrada que también dejábamos anotado para la posterior recuperación de las preparaciones. Si en cualquier punto de este proceso encontrábamos algún dato considerado de interés se realizaban fotografías.

Además realizamos una necropsia completa del animal con extracción y revisión visual de todos los órganos de las cavidades abdominal y torácica, separando aquellos con sospecha de metástasis y/o hallazgos excepcionales. Dichas piezas se incluyeron en formaldehído en frascos separados para su posterior estudio microscópico.

3.7 Técnica de irradiación

3.7.1 Aparato de irradiación

El aparato utilizado para el trabajo ha sido una unidad de Telecobaltoterapia, marca Theratron modelo Phoenix con una distancia fuente piel de 80 cm. Se eligió una dosis única de 60 u 80 Gy basándonos en experiencias previas de nuestro grupo de trabajo, que demostraron que con dicho esquema se inhibía totalmente la migración y la proliferación de los elementos del tejido conectivo afecto, lo que nos permitía estudiar la respuesta tumoral y angiogénica tras el implante en un ambiente hostil (Rodríguez F.1991; Otón L.F. 1997; Peñate J.G. 1998).

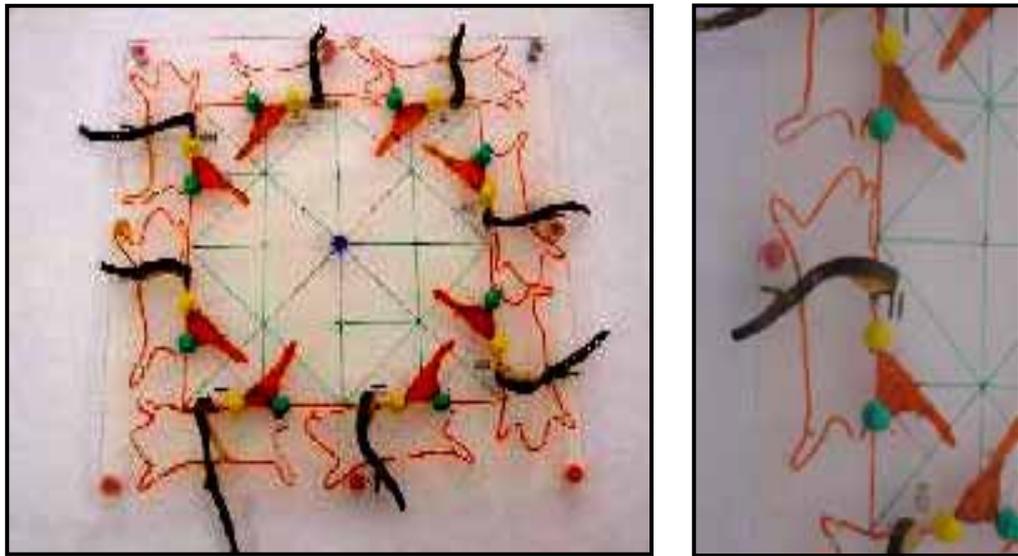
3.7.2 Isodosis y tiempo de exposición

Se eligió la isodosis del 100% a partir de la curva de rendimiento en profundidad de un haz directo de fotones gamma de Cobalto-60 de 10x10 cm y teniendo en cuenta como referencia la profundidad a la que considerábamos el lecho receptor (zona circundante al nervio ciático), que oscilaba entre 0.9 y 1.1 cm.

Escogimos la misma isodosis tanto para los implantes en la mitad del muslo como para los implantes en la zona más próxima al tercio inferior del muslo. Al inicio del experimento (Diciembre de 1999) la fuente de Cobalto presentaba una tasa de dosis de 1,313 Gy/minuto al final en Junio de 2001 una tasa de 0,964 Gy/min.

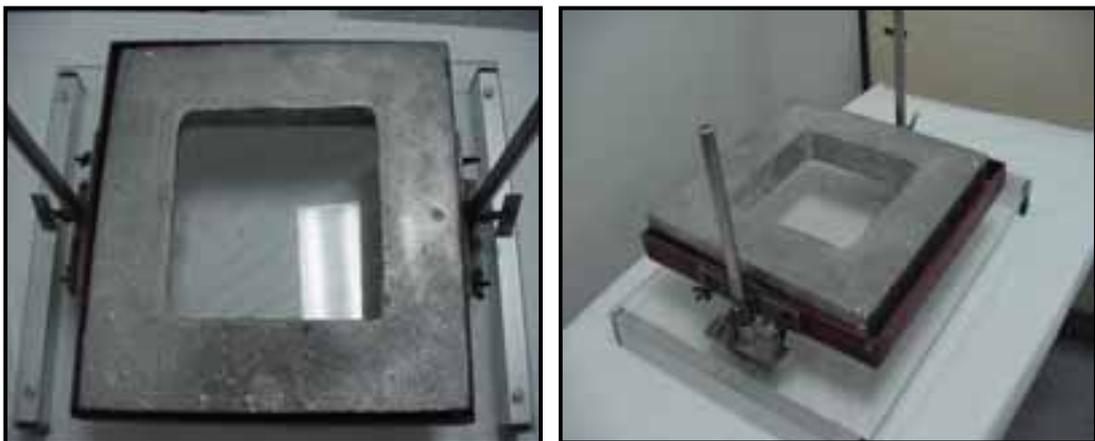
3.7.3 Procedimiento de irradiación

El área elegida para el estudio fue la pata posterior derecha del ratón en decúbito prono; en cada tanda se irradiaban ocho ratones colocados sobre una placa cuadrada de metacrilato de 30x30 cm diseñada al efecto (Rodríguez F. 1997) y que permitía la inmovilización de los animales durante el proceso (Fotos 5.1 y 5.2). Los animales quedaban colocados dos en cada lado de la placa, sobre la cual se disponía un blindaje de plomo con un hueco central de 20x 20 cm (igual al campo de irradiación a una distancia foco piel de 80cm).



Fotos 5.1 y 5.2: Bandeja de metacrilato para irradiación y detalle de la misma.

Esto permitía la exposición exclusiva de la pata posterior derecha así como la protección del resto del animal. Dicho blindaje tiene un espesor de 5 cm y 5 capas hemirreductoras (Foto 6.1 y 6.2).



Fotos 6.1 y 6.2.- Blindaje plomado; bajo el mismo se sitúa la placa de metacrilato con los ratones en posición prona.

La dosimetría se realizó con dosímetros TLD, cuya lectura fue llevada a cabo por la Unidad de Protección Radiológica del HUC.

3.7.4 Dosimetría

3.7.4.1 Del aparato de irradiación

El control de la Unidad de Cobalto-60 está protocolizado por el Servicio de Protección Radiológica del Hospital Universitario de Canarias, según las recomendaciones del Consejo de Seguridad Nuclear. Se realizan operaciones diarias para verificar el buen funcionamiento de la misma; de igual forma semanalmente se procede a la comprobación de la homogeneidad y simetría del campo de radiación con una película radiográfica comparando haz de luz-haz de radiación en un campo de 20x20 cm.

Trimestralmente se realiza la calibración en cuba de agua de la Unidad, las medidas se realizan con la cámara cilíndrica de ionización de la casa PTW modelo 233641 de 0.3 cc. El electrómetro digital PTW con la fuente de alimentación en + 300 V, y el potenciómetro 4.9, switch DII (igual a - 300 V). Todas las medidas son realizadas en agua y los controles efectuados incluyen entre otros el cálculo de la tasa de dosis y el cálculo de la simetría y homogeneidad del haz de radiación.

Dado que el estudio se realizó entre Diciembre de 1999 y Junio de 2001, mensualmente se revisaba la tasa de dosis y control del tiempo para la administración de los 60 y 80 Gy.

3.7.4.2 “In vivo”

Se colocaron dosímetros TLD para la comprobación de la dosis administrada al lecho receptor y zonas protegidas con el blindaje: Se realizó la simulación de una operación de implante procediendo a la anestesia y posterior colocación del dosímetro en el lecho (en la misma zona que el tumor); después se irradió el lecho (pata posterior derecha) protegiendo el resto del animal con el blindaje plomado.

Además de en el lecho, se situaron dosímetros en la zona de penumbra, debajo del blindaje, sobre la piel, en tercio medio del muslo, bajo la piel, a la altura de la rodilla y en la porción más distal de la pata expuesta (ver figura). Los dosímetros usados eran de termoluminescencia (TLD-100) de la marca HARSHOW, como material termoluminiscente el Fluoruro de Litio. Sus dimensiones eran de 2.5x2.5x1 mm.

La lectura fue realizada por la Unidad de Física Médica del Departamento de Medicina Física y Farmacología de La Universidad de La Laguna.

Las lecturas obtenidas para un disparo de una dosis de 1 Gy fueron las siguientes:

Realizada mediante dosímetros TLD.

Los datos de la exposición fueron:

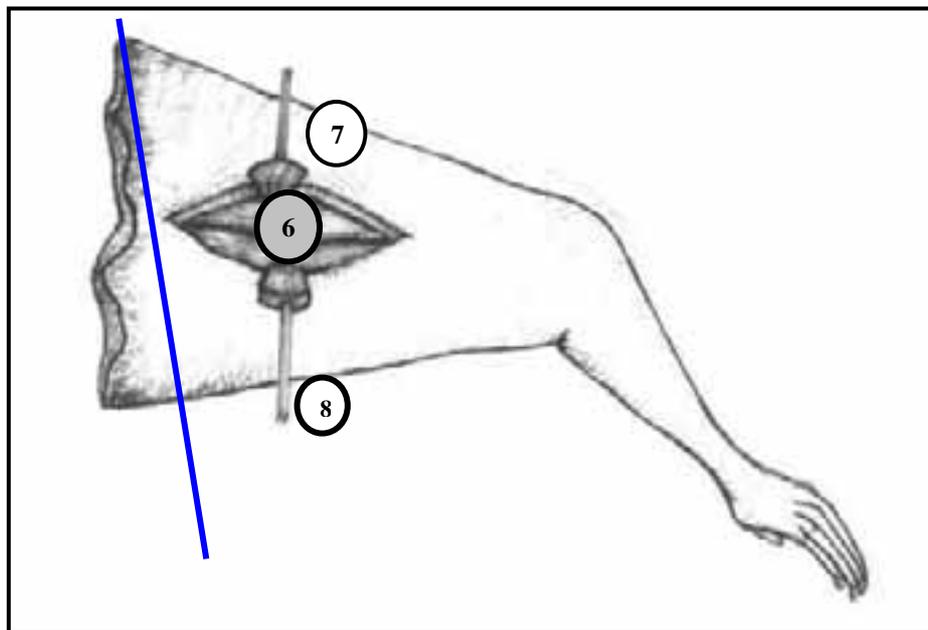
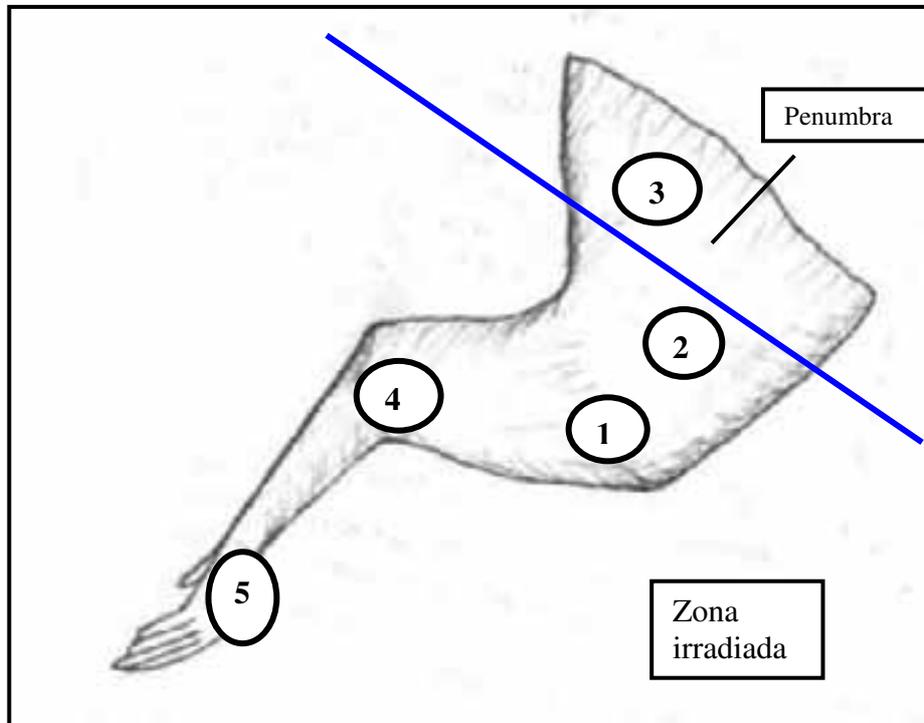
- Bomba de telacobaltoterapia Theratron Phoenix
- Tasa de dosis en Mayo de 2000: 0.929
- Tamaño de campo: 20x20 cm
- Distancia foco-piel: 80 cm
- Dosis: 1Gy al 120%
- Tiempo estimado de exposición: 1 min. y 15 centésimas.

Fecha de exposición 08-06-2000

Fecha de lectura 12-06-2000

Fecha de entrega de datos 14-06-2000

COLOCACIÓN DE LOS DOSÍMETROS



Resultados obtenidos:

	Luz de referencia	Corriente oscura
Medida 1	120,65	0,27
Medida 2	121,75	0,25
Medida 3	120,86	0,26
Medida 4	121,26	0,26
Medida 5	121,56	0,25
Media	121,216	0,258

Factor de calibración
A = 0,146601

Dosímetro	<i>nC</i>	<i>Dosis mGy</i>
1	7367,1	1080,02
2	1057,83	155,08
3	201,49	29,54
4	7084,36	1038,57
5	6858,72	1005,50
6	7966,12	1167,84
7	7448,36	1091,94
8	7782,95	1140,99
9	0,93	0,14
10	0,78	0,11

Los dosímetros 4 y 5 no se recubrieron de piel el 1, 2 y el 3 sí.

El 9 y el 10 se utilizaron como controles. El 9 supone la dosis recibida por un ratón en el que se simula la irradiación dentro de la bomba de Cobalto. El 10 sin embargo no se expuso y es por lo tanto el control (sólo se extrajo del blindaje en el momento de la colocación del resto de los TLD para ver su número).

3.8 Grupos de estudio

Los grupos diseñados se dividieron en dos series; la serie control denominada serie I y la serie de estudio denominada serie II. La primera estuvo formada por dos grupos y la serie II por cuatro grupos. En todos los casos el tiempo de seguimiento fue de 14 días desde el momento del implante. Los grupos de las series fueron identificados con letras precedidos del n° de serie correspondiente.

Tabla resumen

	Grupo	NºAnimales	Irradiación	Intervalo	Localización del implante	Seguimiento
Serie Control	IA	7	NO	<6 horas	Muslo	14 días
	IB	10	NO	<6 horas	Tobillo	14 días
Serie Estudio	IIA	10	80 Gy	<6 horas	Muslo	14 días
	IIB	13	60 Gy	<6 horas	Tobillo	14 días
	IIC	10	80 Gy	<6 horas	Tobillo	14 días
	IID	5	60 Gy	7 días	Tobillo	21 días

Descripción de los grupos:

Serie Control (I):

Grupo IA: 9 animales incluidos de los que 2 fallecieron durante la irradiación sin completar el estudio. Realizamos el injerto tumoral en la zona media del muslo sin irradiar la pata posterior. Este grupo nos sirvió para establecer comparaciones de nuestros hallazgos con los obtenidos en trabajos previos de nuestra línea de estudio.

Grupo IB: se incluyeron 10 animales, todos finalizaron el estudio; se procedió al implante en el tobillo sin irradiar la pata. Se dejaron transcurrir 14 días desde el implante hasta el sacrificio. Fue el grupo control de los animales en los que se implantó el melanoma en distinta localización que en los trabajos anteriores.

Serie de estudio (II):

Grupo IIA: 10 animales incluidos sin incidencias; irradiamos la pata posterior derecha con 80 Gy en sesión única e inmediatamente realizamos el injerto de 1 mm³ de melanoma en el muslo para observar las características de crecimiento en esta localización.

Grupo IIB: 17 animales en total aunque 4 fallecieron, durante el proceso anestésico, antes de completar el estudio, por lo que quedaron reducidos a 13; seguimos el mismo procedimiento que en el grupo anterior pero con una dosis de 60 Gy. La razón para bajar la dosis de irradiación fue la enorme retracción que obteníamos con 80 Gy y que de alguna forma podía distorsionar el modelo de estudio por aproximar en exceso el injerto al margen sano superior, hecho que queríamos evitar a toda costa.

Grupo IIC: 10 animales formaron este grupo y ninguno falleció ni salió del estudio antes de finalizarlo; irradiamos la pata con 80 Gy en dosis única e inmediatamente realizamos el injerto tumoral en la zona del tobillo. Dejamos pasar 14 días e hicimos la necropsia. El objeto de alejar el implante fue dificultar la potencial llegada de vasos desde el margen sano del campo de irradiación convirtiendo así el lecho en un auténtico desierto angiogénico al anular la respuesta neovascular.

Grupo IID: 8 animales en total: 5 animales completaron el estudio y fallecieron 3 durante el proceso anestésico; procedimos a la irradiación de la pata posterior derecha del ratón con 60 Gy en dosis única; dejamos transcurrir 7 días y procedimos al implante de 1 mm³ de tumor sólido. Pasados 14 días desde el implante sacrificamos los animales y se realizó la necropsia. Diseñamos este grupo como referencia para determinar si el establecimiento de la lesión por irradiación y de una respuesta inflamatoria, al cabo de una semana, podía tener alguna repercusión en el crecimiento tumoral respecto a los grupos en los que se implantó inmediatamente depuse de la agresión ionizante.

3.9 Estudio microscópico

Las muestras obtenidas fueron analizadas por el Departamento de Anatomía Patológica de La Universidad de La Laguna mediante microscopía óptica convencional o bien con microscopía electrónica, para ello utilizamos diversas técnicas que a continuación señalamos. También se realizaron fotografías digitales y convencionales de los hallazgos más significativos.

Técnicas de microscopía óptica

Las piezas obtenidas fueron seccionadas según la orientación más adecuada, los cortes se realizaron con un grosor de 6 micras mediante micrótomo tipo Reichert-Jung 1130 Biocut.

Se emplearon las siguientes tinciones: Hematoxilina eosina y tricrómica de Mason-Goldner.

3.9.1 Hematoxilina-Eosina

Hematoxilina de Harris

Solución A:

Hematoxilina en polvo.....5 gr.

Alcohol absoluto.....50 c.c.

Solución B:

Alumbre potásico cristalizado.....100gr.

Agua destilada.....800 c.c.

(El Alumbre potásico se disuelve en caliente).

Veinticuatro horas después de preparar las soluciones añadimos 2,5 gr de óxido rojo de mercurio. Durante 20 minutos se mantiene dicha mezcla en ebullición e inmediatamente después se introduce en un matraz destapado que se sumerge en agua fría.

B)Eosina

Eosina.....2 gr.

Agua destilada.....160 c.c.

Alcohol de 95%.....640 c.c.

Ácido acético.....10 gotas

Técnica:

1.-Realizamos dos pases de Xilol de 10 minutos de duración cada uno con el objeto de desparafinar.

2.-Mediante tres pases en alcohol absoluto de 96 y 90 grados durante 5 minutos se consigue la hidratación.

3.-Lavado con agua corriente durante 2 minutos.

4.-Teñimos con Hematoxilina de Harris durante 3 minutos.

Volvemos a lavar con agua durante 5 minutos.

Teñimos con Eosina durante 3 minutos.

7.-Sin lavar realizamos pases rápidos por alcohol de 90, 96 grados y absoluto.

8.-Aclaremos con carboxilol.

9.-Hacemos 2 pases por xilol.

10.-Realizamos montaje en un Kit.

3.9.2 Tricrómico de Mason-Goldner

Preparamos las siguientes soluciones:

A) Solución de Bowin

Ácido Pícrico saturado en solución acuosa.....750 c.c.

Formol al 37%.....250 c.c.

Ácido acético glacial.....50 c.c.

Para asegurar una correcta solución de Bowin debe ser preparada a 60 ° C.

B) Solución de Hematoxilina de Weigert

Solución A:

Cristales de Hematoxilina.....1 gr

Alcohol de 95 grados.....100 c.c.

Solución B:

Cloruro férrico al 29%.....4 c.c.

Agua destilada.....95 c.c.

Ac Clorhídrico concentrado.....1 c.c.

La solución de trabajo se obtiene de mezclar la solución A y la B partes iguales.

C) Solución de Biebrich-Acid Fuschin:

Biebrich Scarlet acuosa al 1%.....90 c.c.

Acid Fuschin acuosa al 1%.....10 c.c.

Ácido acético glacial.....1 c.c.

D) Solución Ácido Fosfomolibdico-Ácido fosfotungstico:

Ácido Fosfolíbldico.....5 gr.

Ácido Fosfotungstico.....	5 gr
Agua destilada.....	200 c.c.
E)Solución de Azul de Anilina	
Azul de Anilina.....	2,5 gr
Ácido acético glacial.....	2 c.c.
Agua destilada.....	100 c.c.
F)Solución de Ácido acético glacial	
Ácido acético glacial.....	1 c.c.
Agua destilada.....	100 c.c.

Técnica

- 1.-Desparafinar con dos pases de Xilol de 10 minutos cada uno.
- 2.-Hidratar en pases sucesivos con Alcohol Absoluto, alcohol de 96 y de 90 (5 minutos cada uno).
- 3.-Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
- 4.-Solución de Bowin toda la noche temperatura ambiente.
- 5.-Lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.
- 6.-Lavar en agua destilada.
- 7.-Teñir con Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos.
- 9.-Aclarar en agua destilada.
- 10.-Teñir con Biebrich Scarlet-Acid Fuschin durante 2 minutos.
- 11.-Ácido Fosfomolíbico Ácido Fosfotúngstico durante 12 minutos.
- 12.-Teñir con Anilina durante 5 minutos.
- 13.-Lavar con agua destilada.

- 14.-Solución de ácido acético glacial.
- 15.-Deshidratar en alcohol de 90, 96 grados y absoluto.
- 16.-Aclarar en carboxilol.
- 17.-Xilol en dos pases rápidos.
- 18.-Montar en un Kit.

La observación y toma de fotografías se efectuó en microscopio óptico Opthiphot con lentes de distintos aumentos así como con microscopio óptico Leyca y Cámara digital de la misma marca.

Por último señalaremos que en algunas ocasiones y con el fin de apoyar y confirmar algunos de los resultados obtenidos, se llevaron a cabo tinciones con técnicas de inmunohistoquímica de laminina, Colágena IV y Factor VIII, siguiendo, en cada caso las especificaciones y protocolo del fabricante que, en nuestro caso fue DAKO® Chem Mate™.

4. RESULTADOS

Antes de comenzar a presentar los datos obtenidos y el correspondiente análisis estadístico exponemos un esquema del guión que vamos a seguir para una más sencilla y rápida comprensión de este apartado.

En primer lugar presentamos una tabla resumen de los grupos de estudio con las particularidades metodológicas más relevantes. A continuación desarrollamos las tablas individualizadas de cada grupo donde se recogen las dimensiones, peso y volumen tumoral para cada animal así como la media para peso y volumen y las correspondientes desviaciones estándar.

Además adjuntamos dos gráficos de barras en los que se representan las medias de peso y volumen respectivamente para cada uno de los grupos. Por último procederemos a detallar las tablas del análisis estadístico. Debemos señalar que dado el número de grupos e individuos para cada uno, así como el número de variables de este trabajo hemos elegido la *t* de Student para la comparación de muestras independientes. De esta forma vamos enfrentando cada uno de los grupos con el resto, buscando las posibles diferencias intergrupales.

4.1. Recopilación de parámetros

Tabla I: resumen de los grupos de estudio

	Grupo	NºAnimales	Irradiación	Intervalo	Localización del implante	Seguimiento
Serie Control	IA	7	NO	<6 horas	Muslo	14 días
	IB	10	NO	<6 horas	Tobillo	14 días
Serie Estudio	IIA	10	80 Gy	<6 horas	Muslo	14 días
	IIB	13	60 Gy	<6 horas	Tobillo	14 días
	IIC	10	80 Gy	<6 horas	Tobillo	14 días
	IID	5	60 Gy	7 días	Tobillo	21 días

Serie Control:

Grupo control IA (NO irradiación-implante en muslo):

Los volúmenes oscilaron entre los 829 mm³ y los 7652 mm³ con una media de 2904 mm³ y una desviación estándar de 2520; el peso de los tumores extraídos estuvo entre los 0,95 g. y los 4,86 g. Con la media y desviación estándar que presentamos en la tabla IA:

Tabla IA: Parámetros recogidos del grupo IA

GRUPO IA	PESO (g.)	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	VOL. (mm ³)		
RATÓN 1	1,05	16	11	9	829,38		
RATON 2	2,57	25	23	15	4516,04		
RATON 3	4,86	29	28	18	7652,91		
RATON 4	2,74	22	19	15	3282,96		
RATON 5	0,95	15	11	10	863,94		
RATON 6	1,1	16	11	10	921,53		
RATON 7	2,96	20	18	12	2261,94		
						MEDIA VOL 2904	MEDIA PESO 2.31
						DESV. ST VOL 2520	DESV. ST. PESO 1.41

Grupo control IB (NO Irradiación-implante de tumor en tobillo):

La media de volumen fue de 381 mm³ con una desviación estándar de 446 mm³ y unos volúmenes comprendidos entre los 25 y los 1123 mm³. Los pesos fluctuaron entre los 0,06 g. y los 1,49 g con una media de 0,70 g. y una desviación estándar de 0,68 g. En la tabla IB mostramos las dimensiones y volúmenes alcanzados por este grupo.

Tabla IB: Datos del grupo IB

GRUPO IB	PESO (g.)	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	VOL. (mm ³)		
RATÓN 1	0,15	7	5	5	91,63		
RATON 2	0,06	4	4	3	25,13		
RATON 3	0,16	6	5	4	62,83		
RATON 4	0,14	7	5	5	91,63		
RATON 5	0,37	8	7	4	117,29		
RATON 6	1,7	12	10	6	376,99		
RATON 7	0,2	6	4	3	37,70		
RATON 8	1,35	13	11	11	823,62		
RATON 9	1,43	13	13	12	1061,86		
RATON 10	1,49	15	13	11	1123,12		
						MEDIA VOL 381,18	MEDIA PESO 0,70
						DESV. ST. VOL. 446	DESV.ST. PESO 0,68

Serie de estudio

Grupo IIA (80 Gy-implante inmediato de tumor en muslo):

El volumen tumoral alcanzado osciló entre 99 y 314 milímetros cúbicos, con una media de 176 y una desviación estándar de 72 mm³; los pesos estuvieron comprendidos entre los 0,05 y los 0,70 g. con la media y desviación estándar recogida en la tabla adjunta:

Tabla IIA

GRUPO IIA	PESO (g.)	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	VOLUMEN (mm ³)		
RATON 1	0,66	10	9,6	4	201,06		
RATON 2	0,05	7	7	3	76,97		
RATON 3	0,34	10	7	4	146,61		
RATON 4	0,4	8	7	5	146,61		
RATON 5	0,27	9	7	3,5	115,45		
RATON 6	0,61	10	8	5	209,44		
RATON 7	0,26	8	6	5	125,66		
RATON 8	0,7	10	10	6	314,16		
RATON 9	0,25	8	7	4	117,29		
RATON 10	0,62	10	9	5	235,62		
						MEDIA VOL. 168,89	MEDIA PESO 0.41
						DESV.ST. VOL. 70,76	DESV.ST. PESO 0.21

Grupo IIB (60 Gy- implante inmediato de tumor en tobillo):

Los volúmenes arrojaron como valor mínimo 14 mm³ y como máximo 424 mm³ con una media de 72 y una desviación estándar de 109 mm³. En la tabla IIB hemos representado los valores recogidos.

Tabla IIB

GRUPO IIC	PESO (g.)	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	VOL. (mm ³)		
RATON 1	0,04	5	3	4	31,42		
RATON 2	0,41	10	9	9	424,11		
RATON 3	0,08	5	5	4	52,36		
RATON 4	0,12	8	6	6	150,80		
RATON 5	0,1	6	5	2	31,42		
RATON 6	0,06	3	3	3	14,14	MEDIA VOL 84.34	MEDIA PESO 0.128
RATON 7	0,08	6	4	3	37,70	DES. ST 111.87	DES. S T. PESO 0.114
RATON 8	0,04	3	2	2	6,28		
RATON 9	0,07	5	3	2	15,71		
RATON 10	0,09	7	6	6	131,95		
RATON 11	0,04	7	3	3	32,99		
RATON 12	0,28	8	5	5	104,72		
RATON 13	0,26	6	5	4	62,83		

Grupo IIC (80 Gy – implante inmediato de tumor en tobillo):

El crecimiento que pudimos observar arrojó unos volúmenes que oscilaron entre los 31 mm³ y los 489 mm³, con una media de 274 mm³ y una desviación estándar de 177 mm³, en cuanto a los pesos, quedan reflejados en la tabla IIB:

Tabla IIC

GRUPO IIB	PESO (g.)	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	VOL. (mm ³)		
RATON 1	0,82	12	8	7	351,86	MEDIA VOL 274,37 DESV. ST VOL 177,32	MEDIA PESO 0.53 DESV.ST. PESO 0.24
RATON 2	0,8	12	10	7	439,82		
RATON 3	0,67	12	11	7	483,80		
RATON 4	0,58	12	10	7	439,82		
RATON 5	0,56	11	10	5	287,98		
RATON 6	0,77	10	10	7	366,52		
RATON 7	0,59	12	7	6	263,89		
RATON 8	0,21	5	5	3	39,27		
RATON 9	0,22	5	5	3	39,27		
RATON 10	0,21	5	4	3	31,42		

Grupo IID (60 Gy- 7 días-implante de tumor en tobillo-14 días):

En este caso los volúmenes se encuentran comprendidos entre los 37,7 mm³ y los 254,47 mm³ y unos pesos que fluctuaron de los 0,07 a los 0,34 éste fue el último grupo de nuestro trabajo, el resto de valores se pueden analizar en tabla IID.

Tabla IID

GRUPO IID	PESO	LARGO	ANCHO	ALTO	VOL		
RATON 1	0,17	10	5	5	130,90	MEDIA VOL 138.02 DESV ESTÁNDAR VOL 94.94	MEDIA PESO 0.184 DESV.ST. PESO 0.11
RATON 2	0,07	6	4	3	37,70		
RATON 3	0,25	9	9	5	212,06		
RATON 4	0,34	9	9	6	254,47		
RATON 5	0,09	7	5	3	54,98		

4.2 Análisis estadístico

Hemos utilizado el programa SPSS para el análisis estadístico de los datos.

Como soporte para las bases de datos nos hemos apoyado en el programa Excel de Office 2000 que trabaja en entorno Windows.

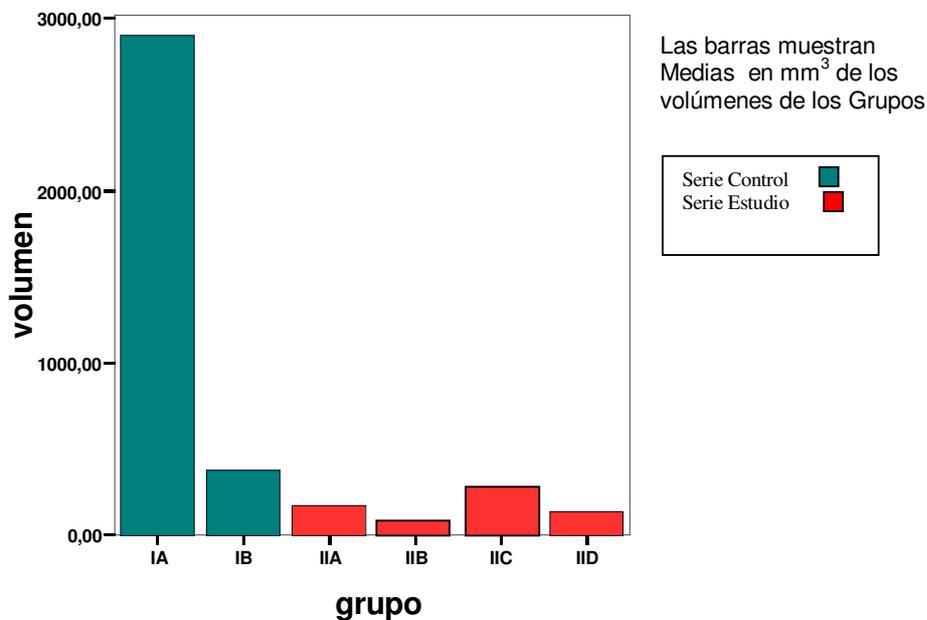
En el apartado anterior hemos presentado y comentado las tablas individualizadas para cada grupo con los volúmenes y pesos alcanzados por cada individuo del grupo así como las medias y desviaciones estándar de los mismos. La tabla I.E muestra un resumen de esos datos, nos referimos a las medias, desviaciones típicas y número de individuos de cada grupo

Tabla I.E: Resumen del procesamiento de los casos

GRUPO		VOLUMEN mm ³	PESO g
IA	Media	2904,10	2,31
	N	7	7
	Desv. típ.	2520,01	1,41
IB	Media	381,19	,69
	N	10	10
	Desv. típ.	446,32	,69
IIA	Media	168,88	,41
	N	10	10
	Desv. típ.	70,76	,21
IIB	Media	84,34	,11
	N	13	13
	Desv. típ.	111,86	,12
IIC	Media	274,36	,54
	N	10	10
	Desv. típ.	177,31	,24
IID	Media	138,02	,18
	N	5	5
	Desv. típ.	94,93	,11
Total	Media	551,99	,64
	N	55	55
	Desv. típ.	1257,32	,88

En el gráfico IE presentamos las medias de volumen de los grupos de ambas de series (Control y Estudio) Como puede apreciarse en la figura IE los volúmenes obtenidos en el Grupo IA son muy superiores a los alcanzados por el resto de grupos. También en el Grupo IB los volúmenes son visiblemente mayores. Recordemos que los grupos IA y IB se corresponden con la Serie Control y por lo tanto los lechos no han recibido irradiación siendo su única diferencia la topografía del implante.

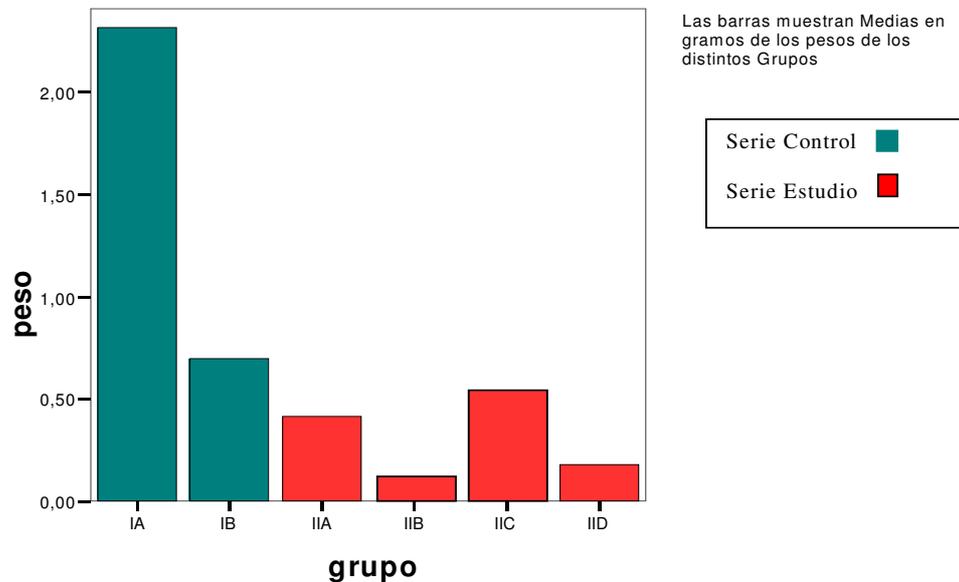
Gráfico IE: representación de las medias de volumen (mm³)



En el gráfico IIE se observa que los pesos alcanzados son también mayores en el Grupo IA que en el resto de los grupos y existe también una tendencia del grupo IB a tener mayores volúmenes que la Serie de estudio. La media de volumen en el grupo IA fue de 2904,1 g. y de 84,34 en el IIB, que es que menos

peso adquirió. Existe por tanto una agrupación muy similar a la observada para el volumen en el gráfico anterior.

Gráfico IIE: comparación de las medias de peso (g.)



En cuanto a las metástasis señalaremos que, únicamente aparecieron en el grupo IA adenopatías tumorales ilíacas homolaterales y no encontramos ganglios afectados en ninguno de los otros grupos. En ningún caso se dieron metástasis hematógenas, evidentemente por falta de tiempo.

Presentamos a continuación las tablas de las comparaciones de medias de peso y volumen, analizadas mediante la t de Student. En dichas tablas confrontamos cada uno de los grupos frente a los demás. Queremos indicar que debido al pequeño tamaño de las muestras y ante la posibilidad de que la distribución de las mismas no se ajustara a la normal, aplicamos pruebas no paramétricas de comparación del tipo U de Mann-Whitney para muestras

independientes, de las que no presentamos las tablas completas sino únicamente los datos, puesto que los resultados obtenidos en cuanto a significación han sido los mismos.

Las tablas 2.E y 3.E del análisis estadístico nos ponen de manifiesto que efectivamente, si comparamos los grupos A y B de la Serie Control existen diferencias significativas tanto con la variable volumen como con la variable peso, estos aspectos serán debatidos en el apartado dedicado a la discusión.

Tabla 2.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IA	7	2904,10	2520,01	952,47
	IB	10	381,19	446,32	141,14
PESO	IA	7	2,31	1,41	,53
	IB	10	,69	,69	,22

Tabla 3.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias		gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t					Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	11,86	,004	3,13	15	,007	2522,90	803,69	809,86	4235,94
	No varianzas iguales			2,62	6,26	,038	2522,90	962,87	190,72	4855,07
PESO	varianzas iguales	3,43	,084	3,14	15	,007	1,62	,51	,52	2,72
	No varianzas iguales			2,79	8,04	,023	1,62	,57	,28	2,95

Los resultados para las pruebas no paramétricas fueron: U de Mann-Whitney de 6 para el volumen y 12 para el peso con datos de significación asintótica y unilateral (exacta) menores en todos los casos a 0,05; es decir no hay modificaciones de la significación.

En las siguientes tablas mostramos los resultados comparativos entre los grupos IA y IIA. Para ambos grupos la localización del implante fue la misma (muslo) pero difieren en la irradiación ya que el IIA recibió 80 Gy mientras que el IA no recibió radiación.

Tabla 4.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IA	7	2904,10	2520,01	952,47
	IIA	10	168,88	70,76	22,37
PESO	IA	7	2,31	1,41	,53
	IIA	10	,41	,21	6,933E-02

Tabla 5.E: Prueba de muestras independientes.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	17,737	,001	3,48	15	,003	2735,21	785,89	1060,11	4410,30
	No varianzas iguales			2,87	6,00	,028	2735,21	952,73	404,57	5065,85
PESO	varianzas iguales	14,124	,002	4,22	15	,001	1,90	,45	,94	2,86
	No varianzas iguales			3,51	6,20	,012	1,90	,54	,58	3,21

Contrastando el grupo control IA con el grupo de la serie de estudio IIB que recibió 60 Gy y se implantó en el tobillo (tablas 6E y 7E) obtenemos una fuerte significación estadística tanto para el peso como para el volumen a favor del grupo IA (control)

Tabla 6.E: Estadísticos de grupo:

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. De la media
VOLUMEN	IA	7	2904,10	2520,01	952,47
	IIB	13	84,34	111,86	31,02
PESO	IA	7	2,31	1,41	,53
	IIB	13	,11	,12	3,365E-02

Tabla 7.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	22,98	,000	4,12	18	,001	2819,75	683,42	1383,93	4255,58
	No varianzas iguales			2,95	6,01	,025	2819,75	952,98	489,09	5150,42
PESO	varianzas iguales	22,89	,000	5,68	18	,000	2,19	,38	1,38	3,01
	No varianzas iguales			4,09	6,04	,006	2,19	,53	,88	3,51

La comparación entre el grupo control IA y el grupo IIC de la serie de estudio pone de manifiesto nuevamente diferencias significativas entre las medias de los volúmenes y pesos obtenidos.(Tablas 8.E y 9.E). Recordemos que el grupo IIC recibió 80 Gy y el implante se realizó en tobillo.

Tabla 8.E: Estadísticos de grupo:

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. De la media
VOLUMEN	IA	7	2904,10	2520,01	952,47
	IIC	10	274,36	177,31	56,07
PESO	IA	7	2,31	1,41	,53
	IIC	10	,54	,24	7,702E-02

Tabla 9.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	16,029	,001	3,33	15	,005	2629,73	788,34	949,42	4310,04
	No varianzas iguales			2,75	6,04	,033	2629,73	954,12	298,97	4960,49
PESO	varianzas iguales	13,565	,002	3,92	15	,001	1,7746	,45	,81	2,73
	No varianzas iguales			3,27	6,24	,016	1,7746	,54	,46	3,08

Cuando cotejamos el grupo IA con el IID obtenemos también significación estadística que queda reflejada en las Tablas 10.E y 11.E.

Tabla 10.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. De la media
VOLUMEN	IA	7	2904,10	2520,01	952,47
	IID	5	138,02	94,93	42,45
PESO	IA	7	2,31	1,41	,53
	IID	5	,18	,11	5,036E-02

Tabla 11.E Prueba de muestras independientes:

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	8,20	,017	2,41	10	,036	2766,07	1143,51	218,17	5313,97
	No varianzas iguales			2,90	6,02	,027	2766,07	953,42	435,37	5096,77
PESO	varianzas iguales	8,32	,016	3,31	10	,008	2,13	,64	,69	3,57
	No varianzas iguales			3,96	6,10	,007	2,13	,53	,82	3,44

Las comparaciones con el segundo grupo control (IB) arrojaron los siguientes resultados (Tablas 12.IE y 13.E). Como se puede apreciar no existen diferencias estadísticas entre ambos.

Tabla 12.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IB	10	381,19	446,32	141,14
	IIA	10	168,88	70,76	22,37
PESO	IB	10	,69	,69	,22
	IIA	10	,41	,21	6,933E-02

Tabla 13.E Prueba de muestras independientes:

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	21,70	,000	1,48	18	,15	212,31	142,90	-87,91	512,53
	No varianzas iguales			1,48	9,45	,17	212,31	142,90	-108,61	533,23
PESO	varianzas iguales	47,02	,000	1,21	18	,24	,28	,23	-,20	,76
	No varianzas iguales			1,21	10,76	,25	,28	,23	-,22	,78

La comparación entre el Grupo IB de la serie control y el grupo IIB, que recibió 60 Gy con implante distal, sí arrojó diferencia estadística en la comparación de medias de peso y volumen (Tablas 14.E y 15.E). Igualmente las pruebas no paramétricas aportan los mismos resultados.

Tabla 14.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IB	10	381,19	446,32	141,14
	IIB	13	84,34	111,86	31,02
PESO	IB	10	,69	,69	,22
	IIB	13	,11	,12	3,365E-02

Tabla 15.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	22,14	,000	2,32	21	,030	296,85	127,94	30,78	562,93
	No varianzas iguales			2,05	9,874	,067	296,85	144,51	-25,69	619,40
PESO	varianzas iguales	95,65	,000	2,95	21	,008	,57	,19	,1701	,98
	No varianzas iguales			2,59	9,422	,028	,57	,22	7,640E-02	1,07

Cuando comparamos IB con IIC no encontramos datos de significación en ninguna de las dos variables (Tablas 16.E y 17.E). Dichos resultados coinciden nuevamente con los resultados obtenidos en la aplicación de las pruebas no paramétricas.

Tabla 16.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IB	10	381,19	446,32	141,14
	IIC	10	274,36	177,31	56,07
PESO	IB	10	,69	,69	,2201
	IIC	10	,54	,24	7,702E-02

Tabla 17.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias		gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t					Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	9,87	,006	,70	18	,49	106,83	151,87	-212,23	425,90
	No varianzas iguales			,70	11,77	,49	106,83	151,87	-224,77	438,44
PESO	varianzas iguales	38,90	,000	,65	18	,52	,15	,23	-,33	,64
	No varianzas iguales			,65	11,17	,52	,15	,23	-,36	,66

En la comparación del grupo IB con el grupo de la serie de estudio IID no encontramos diferencias significativas (Tablas 18.E y 19.E).

Tabla 18.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IB	10	381,19	446,32	141,14
	IID	5	138,02	94,93	42,45
PESO	IB	10	,69	,69	,22
	IID	5	,18	,11	5,036E-02

Tabla 19.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl				Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	9,34	,009	1,18	13	,25	243,17	205,44	-200,65	687,00
	No varianzas iguales			1,65	10,50	,12	243,17	147,38	-83,08	569,43
PESO	varianzas iguales	41,67	,000	1,60	13	,13	,51	,31	-,17	1,20
	No varianzas iguales			2,26	9,90	,04	,51	,22	8,171E-03	1,01

Los resultados de la U de Mann-Whitney son superponibles en cuanto a no-significación.

Las comparaciones entre los diferentes de los grupos de la serie de estudio aportaron los siguientes resultados:

Las tablas 20.E y 21.E muestran los valores comparativos entre el grupo IIA y IIB, entre los que la diferencia fue lugar de implante ya que fue el tobillo del animal en el IIB y el muslo en el IIA y la dosis de radiación:

Tabla 20.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IIA	10	168,88	70,76	22,37
	IIB	13	84,34	111,86	31,02
PESO	IIA	10	,41	,21	6,933E-02
	IIB	13	,11	,12	3,365E-02

Tabla 21.E : Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	,32	,57	2,08	21	,049	84,54	40,55	,20	168,88
	No varianzas iguales			2,21	20,37	,039	84,54	38,25	4,84	164,24
PESO	varianzas iguales	6,62	,01	4,14	21	,000	,29	7,165E-02	,14	,44
	No varianzas iguales			3,85	13,19	,002	,29	7,707E-02	,13	,46

Existen diferencias estadísticas en cuanto a peso y volumen como se aprecia en los valores aportados entre los grupos IIA y IIB; las diferencias metodológicas entre ambos fueron el lugar del implante y la dosis 80 y 60Gy respectivamente.

Comparamos los grupos IIA y IIC en los que la diferencia metodológica radica en el lugar de implante puesto que los dos recibieron 80 Gy previos al implante.(Tablas 22.E y 23.E). Como se desprende de las tablas no existen diferencias entre los pesos y volúmenes obtenidos entre estos dos grupos.

Tabla 22.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IIA	10	168,88	70,76	22,37
	IIC	10	274,36	177,31	56,07
PESO	IIA	10	,41	,21	6,933E-02
	IIC	10	,54	,24	7,702E-02

Tabla 23.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	8,04	,01	-1,74	18	,09	-105,47	60,37	-232,31	21,35
	No varianzas iguales			-1,74	11,79	,10	-105,47	60,37	-237,27	26,31
PESO	varianzas iguales	,04	,83	-1,23	18	,23	-,12	,10	-,34	8,971E-02
	No varianzas iguales			-1,23	17,80	,23	-,12	,10	-,34	8,988E-02

A continuación comparamos el grupo IIA y el IID y los valores se presentan en las tablas 24.E y 25.E

Tabla 24.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. De la media
VOLUMEN	IIA	10	168,88	70,76	22,37
	IID	5	138,02	94,93	42,45
PESO	IIA	10	,41	,21	6,933E-02
	IID	5	,18	,11	5,036E-02

Tabla 25.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	,81	,38	,71	13	,48	30,86	43,26	-62,60	124,33
	No varianzas iguales			,64	6,31	,54	30,86	47,99	-85,16	146,89
PESO	varianzas iguales	3,98	,06	2,19	13	,047	,23	,10	3,833E-03	,46
	No varianzas iguales			2,70	12,91	,018	,23	8,569E-02	4,675E-02	,41

Detectamos diferencias en cuanto a peso, nuevamente a favor del grupo IIA, las discrepancias metodológicas sustanciales fueron: la localización del implante (muslo vs. tobillo), la dosis (80 vs. 60 Gy) y el intervalo transcurrido desde la acción ionizante de radiaciones, hasta el momento del injerto.

Al comparar los grupos IIB y IIC (tablas 26.E y 27.E) obtuvimos las siguientes tablas de resultados:

Tabla 26.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IIC	10	274,36	177,31	56,07
	IIB	13	84,34	111,86	31,02
PESO	IIC	10	,54	,24	7,702E-02
	IIB	13	,11	,12	3,365E-02

Tabla 27.E Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	3,97	,060	3,14	21	,005	190,02	60,40	64,39	315,65
	No varianzas iguales			2,96	14,34	,010	190,02	64,08	52,88	327,19
PESO	varianzas iguales	6,06	,023	5,49	21	,000	,42	7,737E-02	,26	,58
	No varianzas iguales			5,05	12,42	,000	,42	8,405E-02	,24	,60

Se establecen fuertes diferencias significativas entre ambos grupos, señalar al respecto que hay una particularidad diferencial, nos referimos a la dosis administrada.

La comparación del grupo IIC con el IID se recoge e las tablas 28.E y 29.E:

Tabla 28.E Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IIC	10	274,36	177,31	56,07
	IID	5	138,02	94,93	42,45
PESO	IIC	10	,54	,24	7,702E-02
	IID	5	,18	,11	5,036E-02

Tabla 29.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl				Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	2,526	,136	1,58	13	,136	136,34	85,80	-49,02	321,70
	No varianzas iguales			1,93	12,80	,075	136,34	70,33	-15,83	288,52
PESO	varianzas iguales	3,14	,099	3,10	13	,008	,36	,11	,10	,61
	Novarianzas iguales			3,91	12,99	,002	,36	9,202E-02	,16	,55

Detectamos diferencias para el peso a favor del grupo IIC

La última comparación es la del grupo IID frente al IIB, como indican las tablas de resultados no se detectan diferencias estadísticas entre ambos.(Tablas 30.E y 31.E)

Tabla 30.E: Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
VOLUMEN	IIB	13	84,34	111,86	31,02
	IID	5	138,02	94,93	42,45
PESO	IIB	13	,11	,12	3,365E-02
	IID	5	,18	,11	5,036E-02

Tabla 31.E: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias			Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)			Inferior	Superior
VOLUMEN	varianzas iguales	,007	,93	-,94	16	,35	-53,68	56,77	-174,03	66,67
	No varianzas iguales			-1,02	8,59	,33	-53,68	52,58	-173,49	66,13
PESO	varianzas iguales	,004	,94	-1,03	16	,31	-6,4769E-02	6,274E-02	-,19	6,823E-02
	No varianzas iguales			-1,06	7,84	,31	-6,4769E-02	6,057E-02	-,20	7,537E-02

Para terminar resaltamos las fuertes diferencias entre las medias para peso y volumen del grupo IA frente a todos los demás grupos. Nos parece también relevante la diferencia encontrada entre el grupo IIA y IIB, así como las que hallamos en cuanto a peso entre el grupo IIA y IID. Son también destacables las discrepancias entre IIB y IIC y entre IIC y IID en este último caso sólo para el peso y no para el volumen. Dichos aspectos y diferencias serán objeto de interpretación en el apartado de discusión.

4.3 Hallazgos morfológicos

4.3.1 Hallazgos macroscópicos

En cuanto a las características macroscópico-morfológicas de los tumores extraídos en los distintos grupos, vamos a señalar aquellas de mayor interés, ya que existen grupos en los que dichas peculiaridades eran exactamente iguales.

Grupo IA: a parte de ser el grupo en el que se alcanzaron los mayores volúmenes tumorales, queremos resaltar el gran volumen alcanzado, las extensas áreas de necrosis, apreciables a simple vista, la fuerte pigmentación melánica y la notable cantidad de vasos que rodeaban a los tumores (Foto. 7)



Foto 7.- Obsérvese el volumen tumoral alcanzado a los 14 días, la profusa hemorragia y la enorme cantidad de vasos sanguíneos. Implante en lecho no irradiado (zona muslo no irradiado).

Grupo IB: las características que observamos fueron muy similares a las del grupo IA en cuanto a forma, coloración y consistencia se refiere (Foto 8). Recodaremos únicamente, como dato distintivo, que el peso y el volumen fueron significativamente menores.

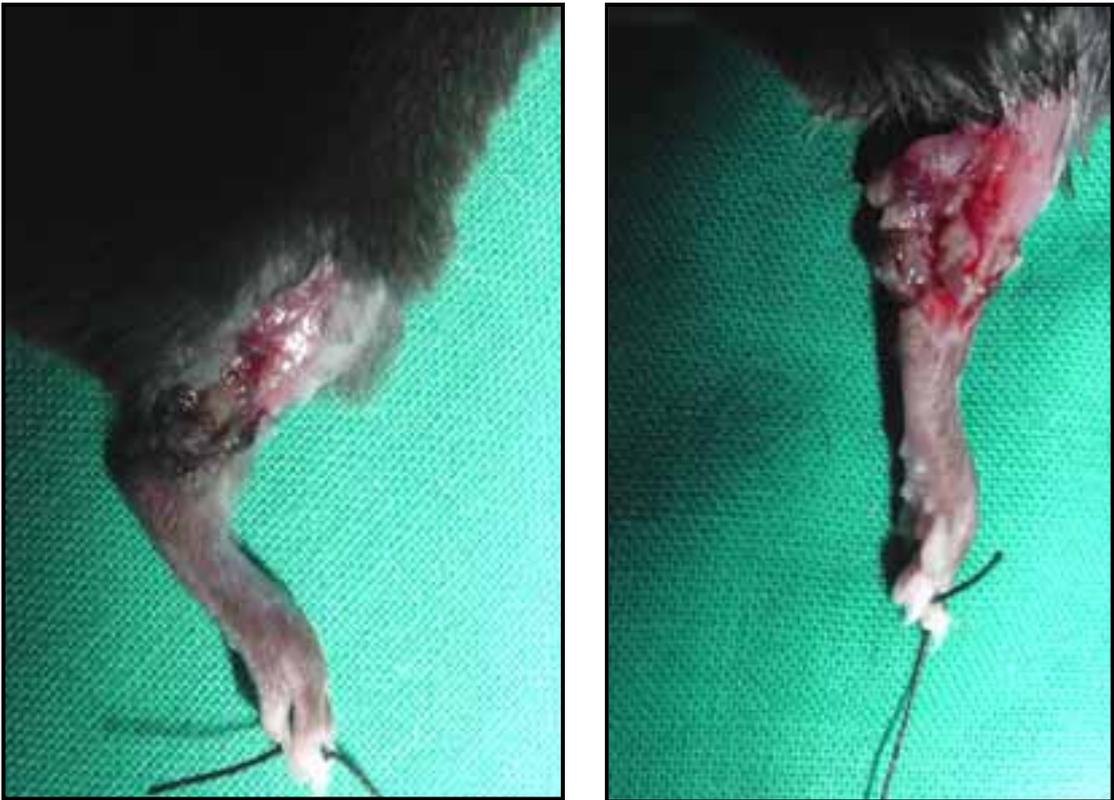


Foto 8.- Detalle en la disección tumoral. Obsérvese la pigmentación y gran vascularización presente. El volumen alcanzado es notablemente menor. Implante en zona tobillo sin irradiación previa.

Grupo IIA: macroscópicamente, se objetiva crecimiento tumoral en la zona implantada, sus características son, en todo similares a las descritas para los grupos IA y IB, es decir, coloración negruzca, crecimiento típicamente expansivo y gran cantidad de vasos que provocan hemorragia profusa en el momento de la disección.

Grupos IIB, IIC y IID: agrupamos éstos por ser los hallazgos macroscópicos encontrados, superponibles. Las características del crecimiento neoplásico son radicalmente distintas a las encontradas en los grupos anteriores. La coloración no

era la típicamente melánica, sino blanco-grisácea y pardusca, la consistencia del bloque tumoral era menor y los márgenes difíciles de precisar incluso bajo microscopio quirúrgico (Fotos 9 y 10). En ocasiones observamos tractos nerviosos respetados en el seno de la fungosa masa tumoral (Foto 11).



Fotos 9 y 10.- Detalle en la disección del grupo IIC (lecho irradiado con 60 Gy e implante distal). Nótese la dificultad para definir los límites netos del tumor, así como la coloración blanco-grisácea. Destacamos también los signos de depilación y retracción de la pata secundarios a la acción de las radiaciones ionizantes.

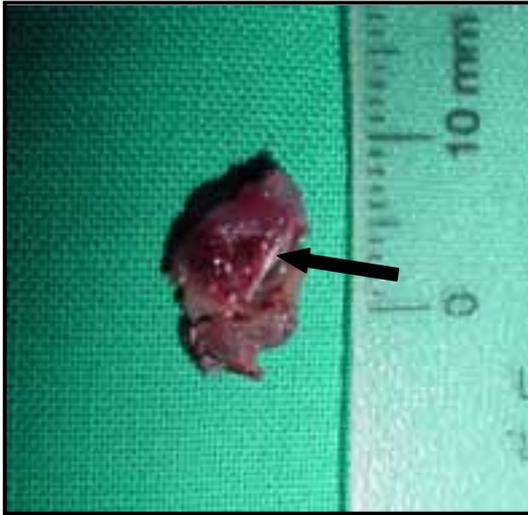


Foto 11.- Tumor sobre lecho irradiado 60 Gy (zona tobillo). Nótese la imprecisión de los límites y la coloración blanco-pardusca. Se observa trayecto nervioso (flecha) conservado envuelto por melanoma.

4.3.2 Hallazgos microscópicos

Grupo IA (Lecho no irradiado-Implante en muslo):

La neoplasia muestra crecimiento sólido con acúmulos en forma de nidos y masas celulares alternantes con focos de necrosis. Las células neoplásicas que forman dichos acúmulos muestran morfología poligonal, con núcleos voluminosos y nucleolos prominentes (Figs 1 y 2). Los citoplasmas son amplios, claros o eosinófilos, pudiéndose poner de manifiesto variable cantidad de pigmento melánico, según el área estudiada. Efectivamente se distinguen acúmulos de células melanóticas junto a otras amelanóticas. Los hechos anteriormente expuestos son confirmados en cortes semifinos, en los cuales se precisan los detalles de las células neoplásicas (Figs. 3 y 4). Estas últimas aparecen bien delimitadas y en sus núcleos se confirman varios nucleolos de diferente tamaño.

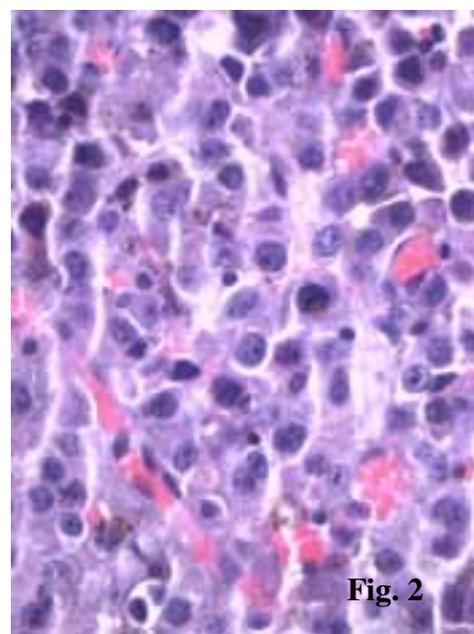
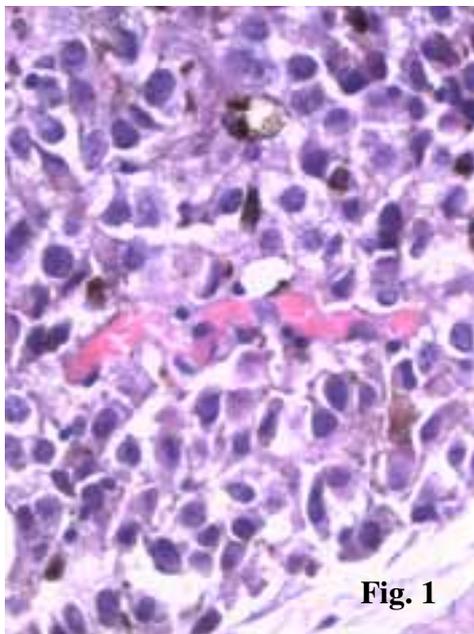
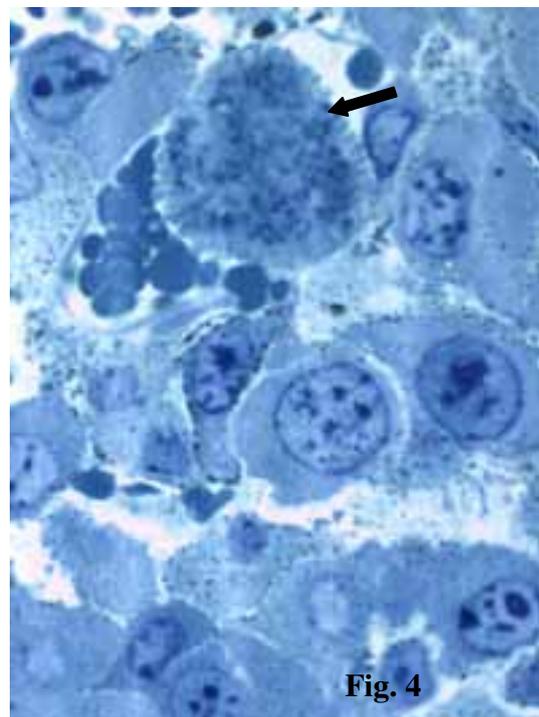
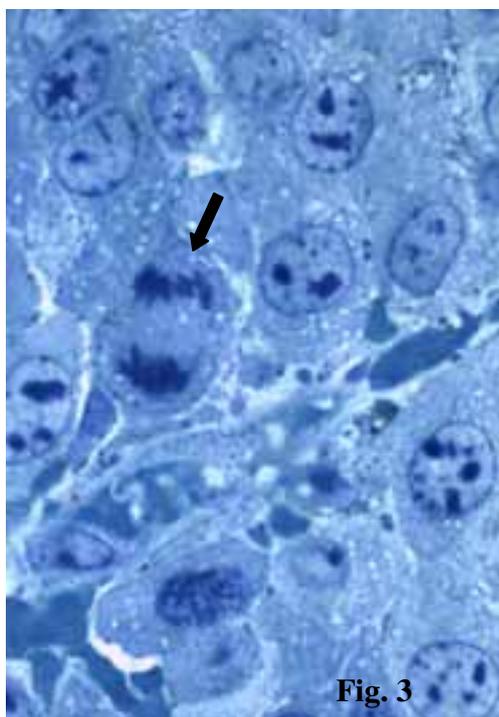


Fig. 1 y 2.- Se observan acúmulos de células neoplásicas en torno a vasos sanguíneos. Serie Control IA (Implante de tumor en muslo sin irradiar 14 días después del experimento). Las células neoplásicas son poligonales, con citoplasmas amplios y núcleos voluminosos, en los que se distinguen prominentes nucleolos. Algunos de los elementos neoplásicos muestran pigmento melánico intracitoplásmico.

La cromatina se encuentra en su mayor parte desespiralizada y los límites nucleares pueden ser esféricos y, en ocasiones, presentan algunas escotaduras. En el citoplasma también se evidencian microvacuolas que poseen melanosomas, cuyo número es variable. Su disposición suele ser periférica en el citoplasma, donde adquieren aspecto de punteado finamente granular. En ocasiones hemos observado células en las que los melanosomas se encuentran en una cantidad muy elevada, distribuyéndose por todo el citoplasma, incluso en las prolongaciones del mismo. Las mitosis son numerosas y los cromosomas suelen apreciarse con gran nitidez en cortes afortunados. El tumor crece en gran medida por expansión aunque también se observa infiltración entre los haces musculares y tejido fibroadiposo. En las zonas expansivas puede haber dehiscencia entre las células, distinguiéndose vasos rodeados de coronas de células conservadas (Figs. 5, 6 y 7)



Figs. 3 y 4.- Imágenes de cortes semifinos de las células neoplásicas en torno a los vasos sanguíneos. Obsérvense los núcleos con nucleolos prominentes y figuras de mitosis (flechas).

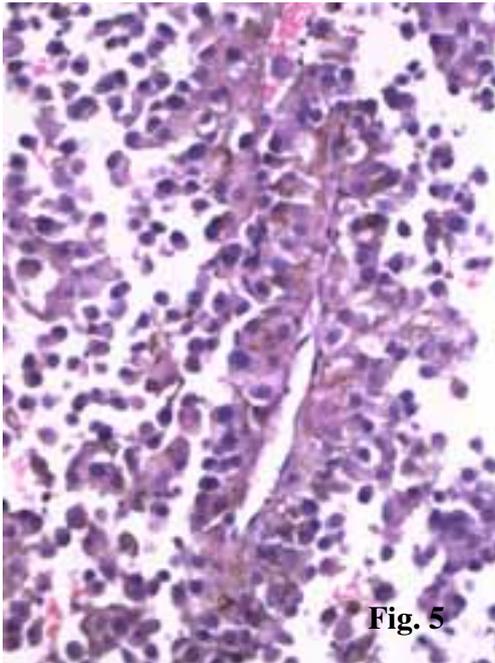


Fig. 5

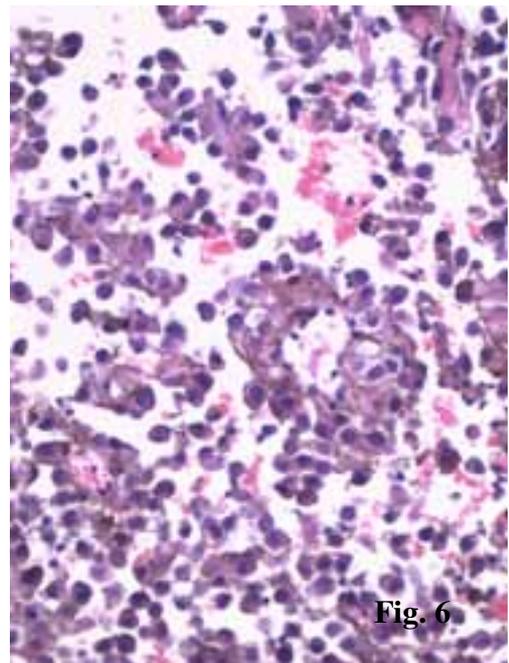


Fig. 6

Figs. 5, 6 y 7.- Áreas de crecimiento expansivo tumoral. Obsérvense las células agrupadas en torno a vasos. A medida que se alejan de los mismos hay dehiscencia celular, con muy escaso o inexistente estroma intercelular. (Serie Control IA Implante de tumor en muslo no irradiado)

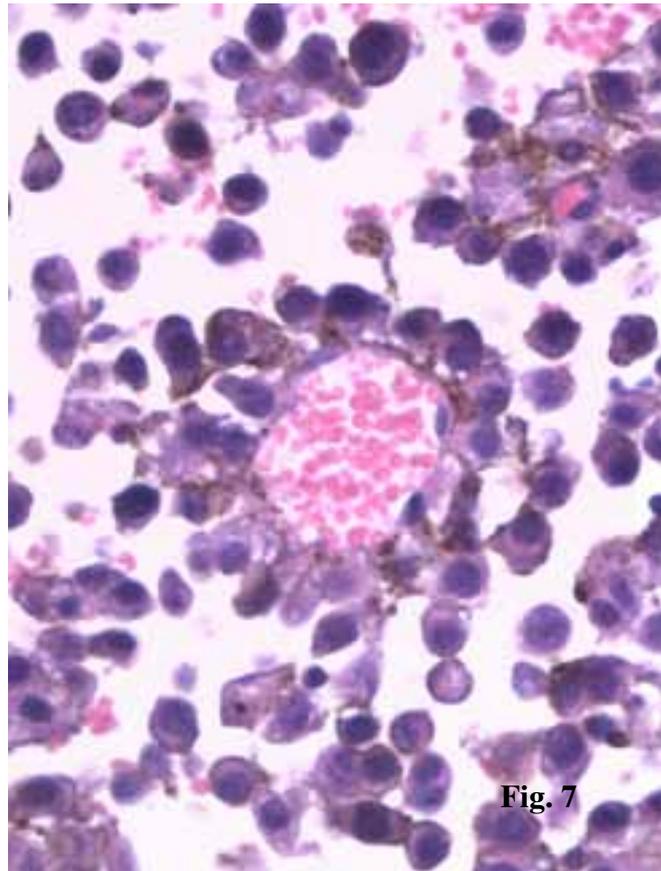
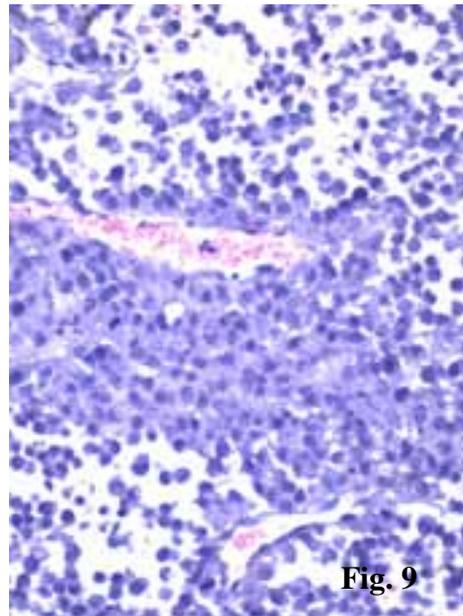
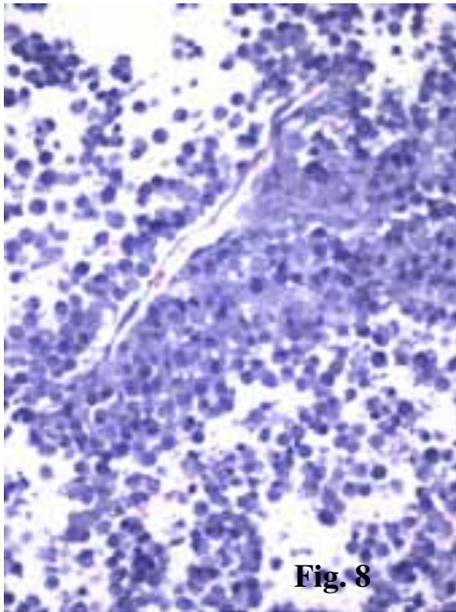


Fig. 7

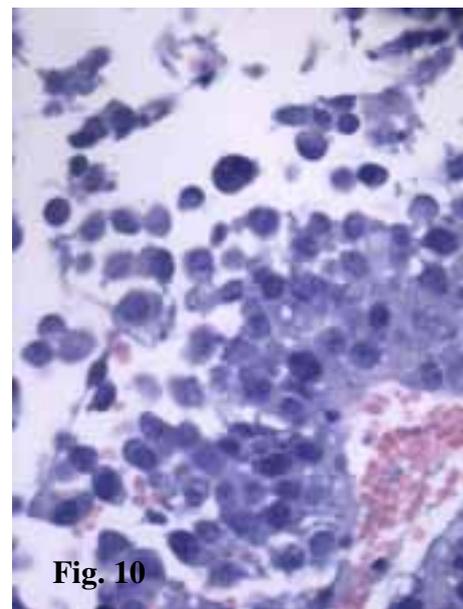
que, cuando se alejan del foco vascularizado, muestran fenómenos de necrosis. En las zonas donde el músculo esquelético se ve infiltrado por las células neoplásicas, éste presenta alteraciones en los núcleos y pérdida de la estriación normal.

Grupo IB (lecho no irradiado-Implante en tobillo):

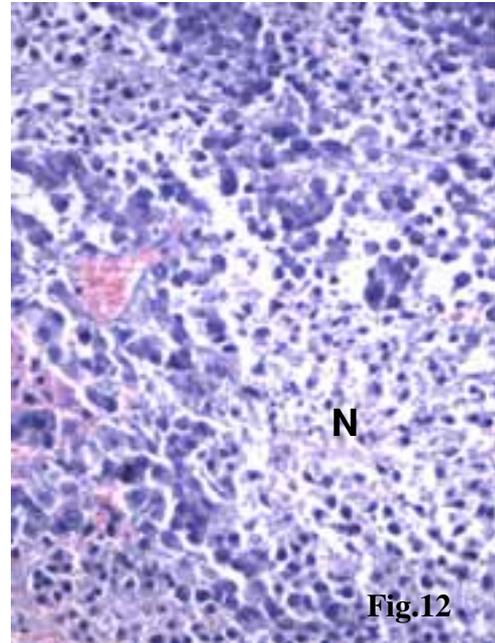
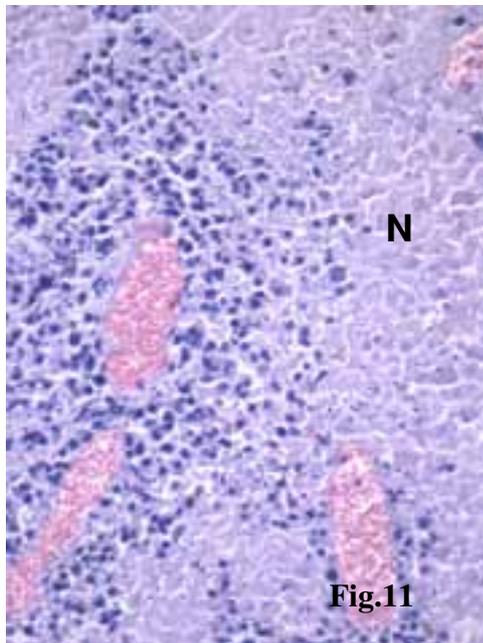
Los resultados han sido similares a los descritos para la serie IA, por lo que, para evitar repeticiones, únicamente haremos referencia a la forma predominante de crecimiento. Efectivamente, en este último predomina el expansivo, con dehiscencia del componente celular, dispuesto entre escaso estroma (Figs. 8, 9 y 10) en las áreas que se van alejando de las estructuras vasculares neoformadas.



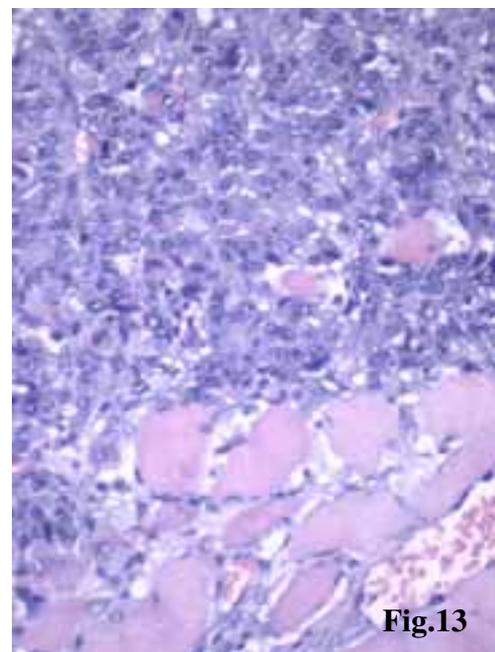
Figs. 8, 9 y 10.- Se pone de manifiesto el crecimiento tumoral en torno a la neovascularización. Obsérvese que las células neoplásicas, cuando se aislan de los vasos, aparecen dehiscentes y con escaso estroma (Serie Control IB Implante de tumor en tobillo no irradiado).



En estas últimas áreas de dehiscencia es frecuente observar zonas de necrosis (Figs. 11, 12 y 13).



Figs. 11, 12 y 13.- Serie control IB (Implante de tumor en tobillo, sin irradiar, 14 días después de iniciado el experimento). Se observan fenómenos de necrosis (N en las Figs. 11 y 12) en las zonas más alejadas del foco vascularizado, más o menos conservado. En la Fig 13 se pone de manifiesto fibras musculares estriadas incorporadas por la neoformación con atrofia y pérdida de la estriación.



Grupo IIA:(lecho irradiado con 80 Gy e implante inmediato en muslo)

En el presente grupo confirmamos los hechos expuestos en la tesis doctoral de Peñate J.G. 1998. Efectivamente, se observa crecimiento infiltrante entre células musculares estriadas, de tal manera que, estas últimas van siendo disecadas progresivamente (Fig. 14). Así mismo hay zonas expansivas con áreas de necrosis a medida que se alejan de las formaciones vasculares. El componente neoplásico conserva su capacidad de divisional, observándose, figuras de de mitosis con relativa frecuencia (Fig. 15).

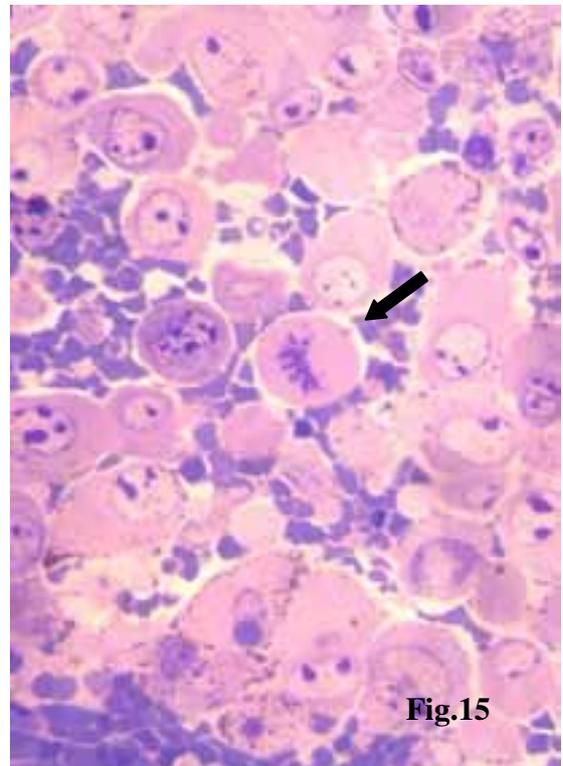
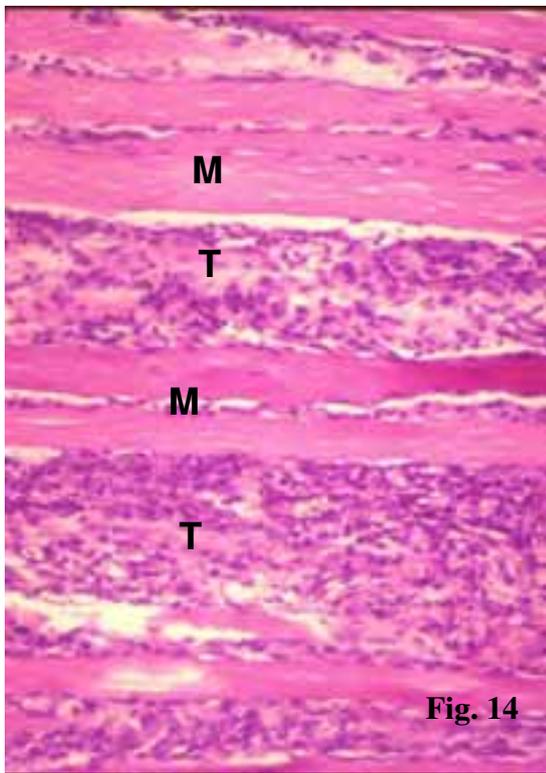


Fig. 14 y 15.- Grupo IIA. Lecho irradiado implante en el muslo. Se observa en la fig. 14 el crecimiento infiltrante de la neoplasia, con presencia de regueros de células tumorales (T) entre fibras musculares estriadas (M). En la fig. 15 se distinguen, rodeando los elementos neoplásicos, en cortes semifinos, con presencia de una figura de mitosis (flecha)

Así mismo detectamos la presencia de estructuras vasculares que sirven de soporte nutricional al componente neoplásico. Dichos vasos están revestidos por fino endotelio, en cuya periferia hay células perivasculares en variable número (Fig. 16 y 17).

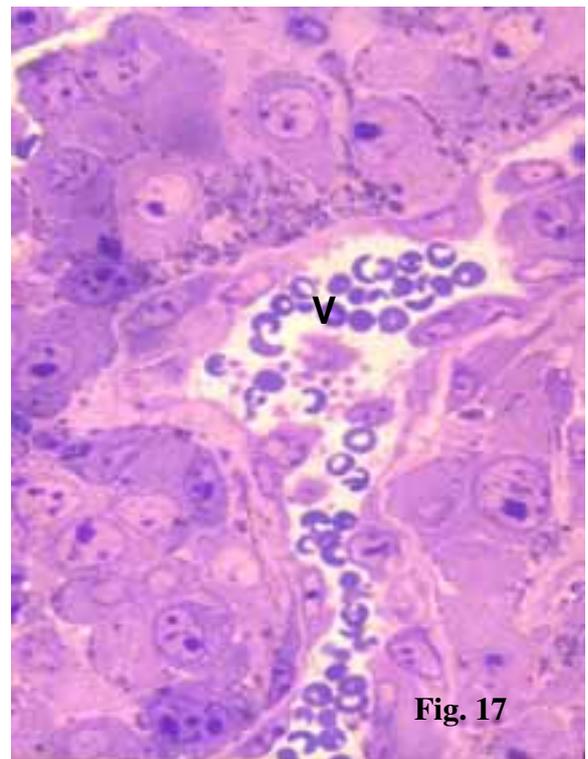
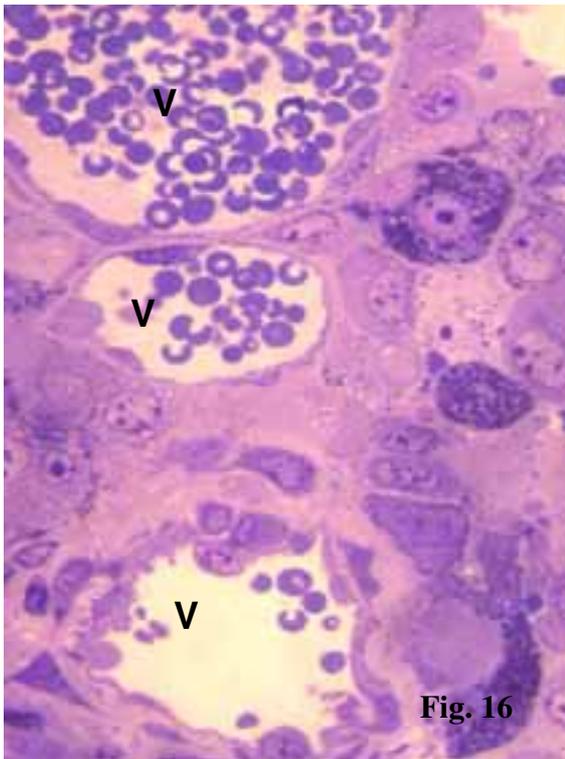
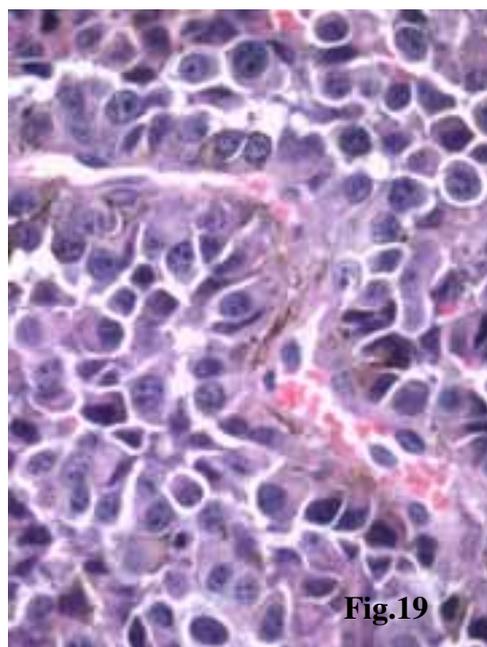
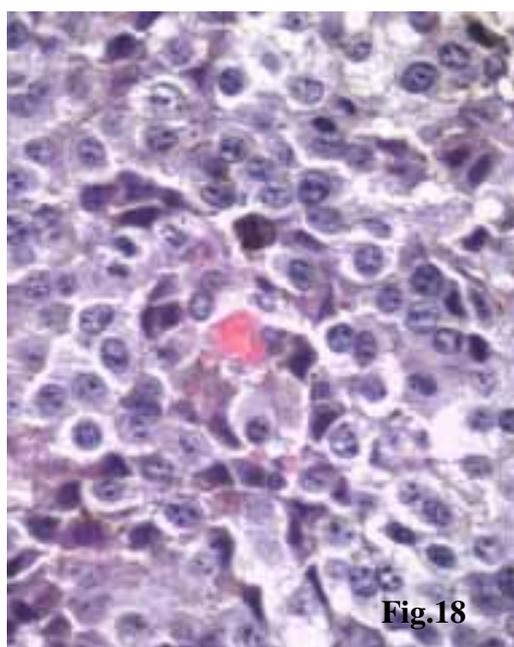


Fig. 16 y 17.- Se observan, en cortes semifinos, células neoplásicas en torno a vasos sanguíneos (V) revestidos por elementos endoteliales y pericitarios. Grupo IIA, lecho irradiado implante en muslo.

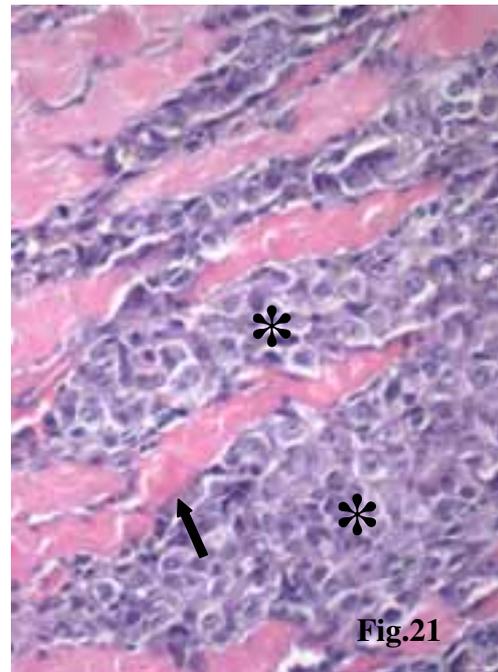
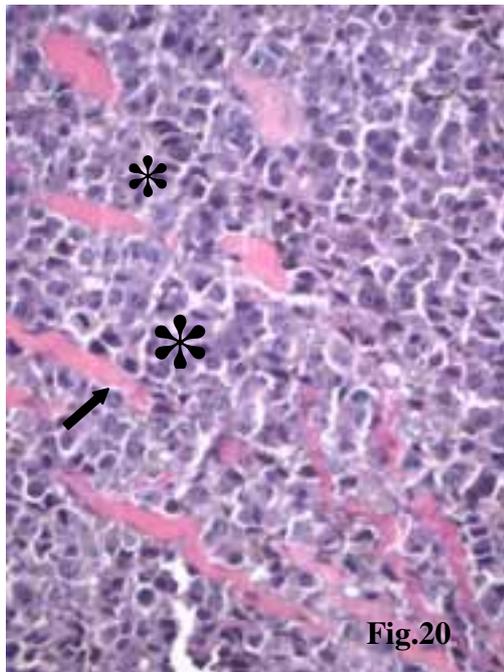
Grupo IIB (lecho irradiado con 60 Gy-implante inmediato en zona tobillo)

El estudio histológico en la presente serie puso de manifiesto crecimiento neoplásico que, de forma predominante, infiltra músculo estriado y, en su caso, tejido adiposo. En general, las células neoplásicas muestran características estructurales similares a las descritas en otras series (Figuras 18 y 19). Efectivamente, presentan núcleos ovoides, con nucleolos prominentes y figuras de mitosis relativamente frecuentes. Los citoplasmas celulares son eosinofílicos y en algunas de las células hay fino granulado pigmentario melánico intracitoplásmico. El componente neoplásico presenta vascularización, entre la que se encuentran capilares y vénulas postcapilares (Figuras 18 y 19).

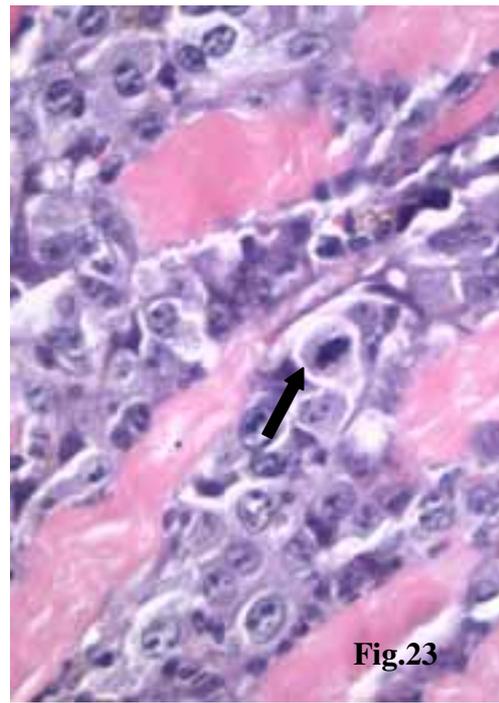
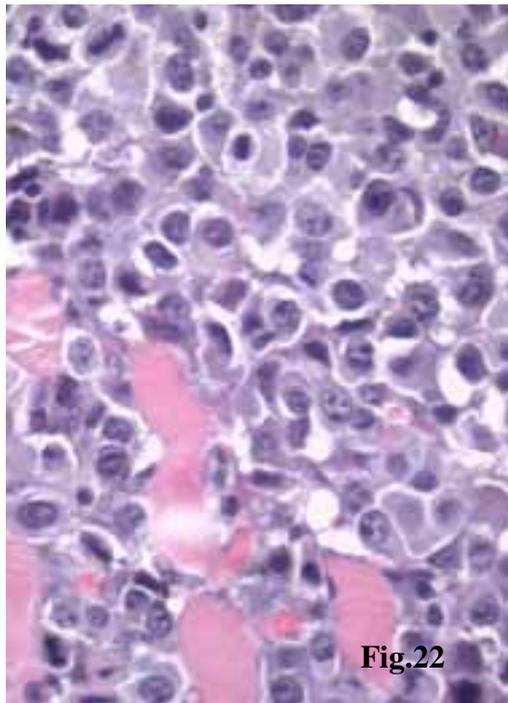


Figs. 18 y 19.- Implante inmediato en lecho irradiado (zona tobillo-60 Gy). Se aprecian los elementos neoplásicos con estructuras vasculares tipo capilar y venular postcapilar. Las células neoplásicas presentan nucleolos evidentes, así como citoplasmas eosinofílicos, algunos de ellos con pigmento melánico finamente granular.

Cuando se estudian amplias zonas de la neoplasia, se demuestra que la mayor parte de ella queda dispuesta entre fibras musculares estriadas, las cuales aparecen disecadas por bandas celulares de variable amplitud (Figuras 20 y 21). Estas células penetrantes muestran actividad proliferativa manifiesta, con figuras de mitosis evidentes (Figuras 22 y 23: flecha). Así mismo, se demuestra variable cantidad de pigmento melánico intracitoplásmico (Compárense las figuras 22 y 23 con la 24). En los intersticios se sigue comprobando la existencia de vasos sanguíneos entre los elementos neoplásicos.



Figs. 20 y 21.- Se pone de manifiesto crecimiento de franjas formadas por células neoplásicas (asteriscos) entre fibras musculares estriadas con fenómenos alterativos (flechas). Implante en lecho irradiado (zona tobillo-60 Gy)



Figs. 22 y 23.- Crecimiento tumoral entre fibras musculares estriadas del lecho receptor. Las células neoplásicas infiltrantes muestran figuras de mitosis con relativa frecuencia (fecha).

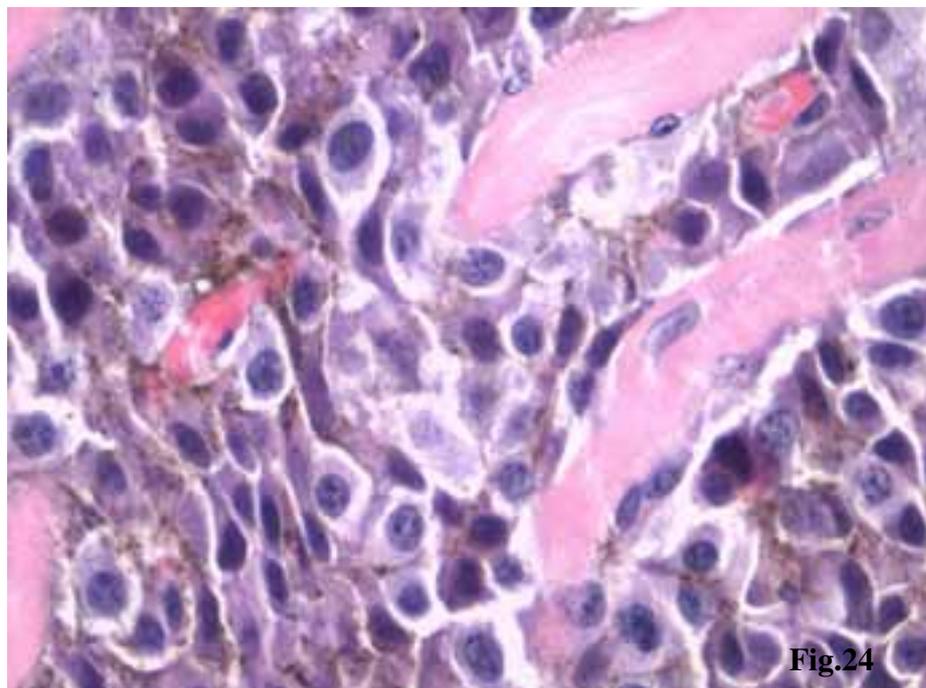
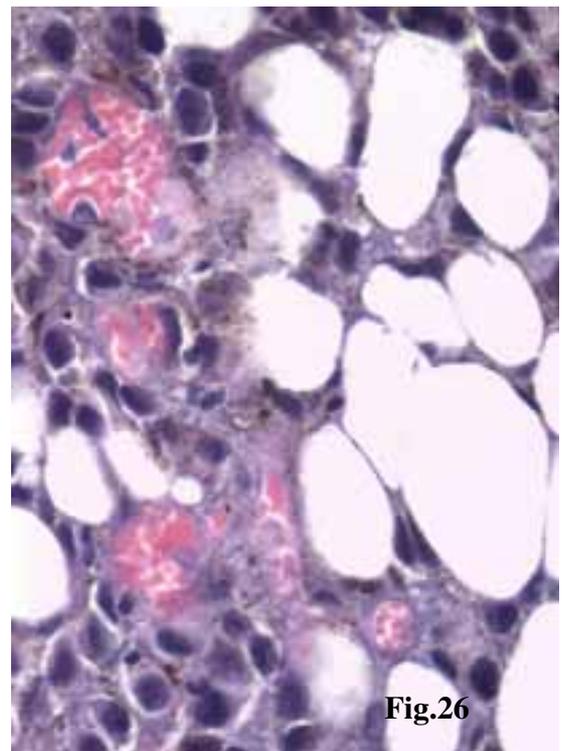
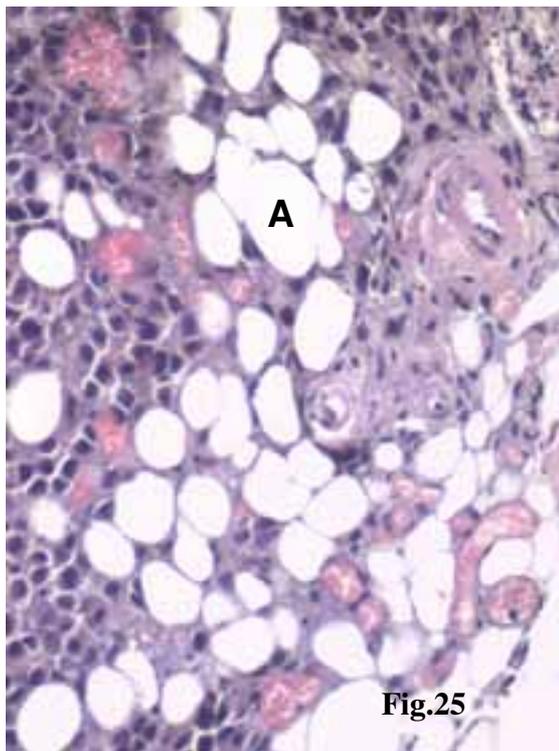
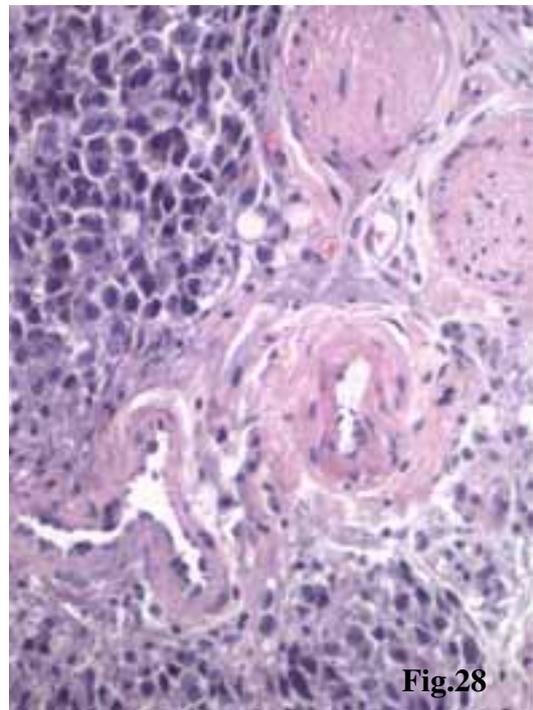
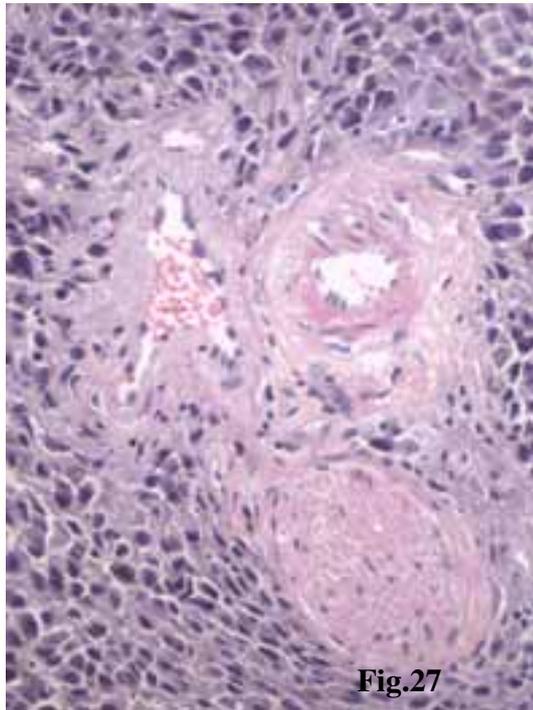


Fig. 24.- Se demuestra pigmento melánico intracitoplásmico en las células neoplásicas que infiltran el músculo estriado. Compárese la pigmentación de esta zona con las apigmentadas de las figuras 22 y 23.

Como se expuso previamente, el tejido adiposo puede ser también infiltrado por el componente neoplásico, quedando los adipocitos, aislados o en pequeños grupos, incorporados entre el mismo. En estas zonas neoplásicas se sigue evidenciando elevada microvascularización. Esta última se constata en su recorrido cuando se efectúa estudio en cortes sucesivos (Figura 25 y 26). En su crecimiento, la neoplasia engloba también otras estructuras preformadas, entre las que se encuentran nervios y vasos de diferente calibre, los cuales aparecen relativamente bien conservados dentro del territorio neoplásico (Fig. 27 y 28).

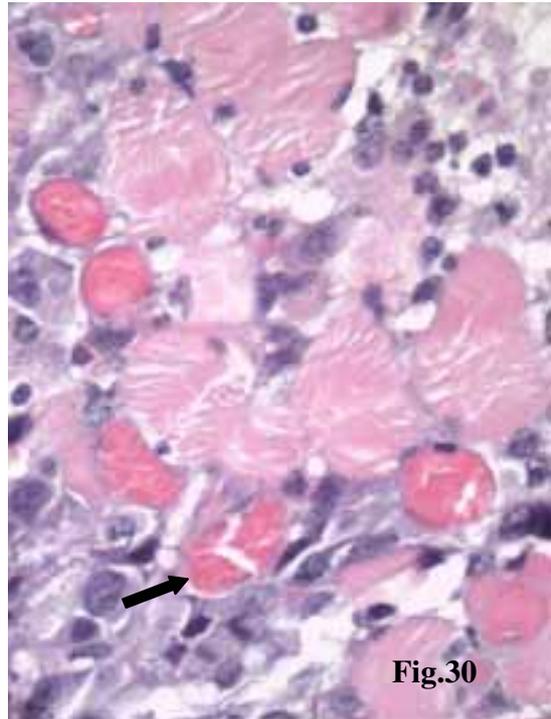
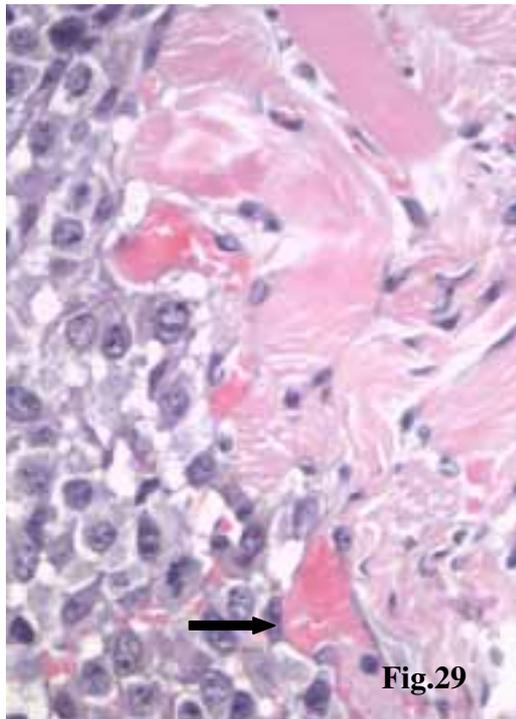


Figs. 25 y 26.- Infiltración del tejido adiposo por elementos neoplásicos. Se observan los adipocitos (A), aislados o en grupos, entre células tumorales. Se distingue también la microvascularización presente en las áreas tumorales. La figura 26 corresponde a un detalle de la 25.

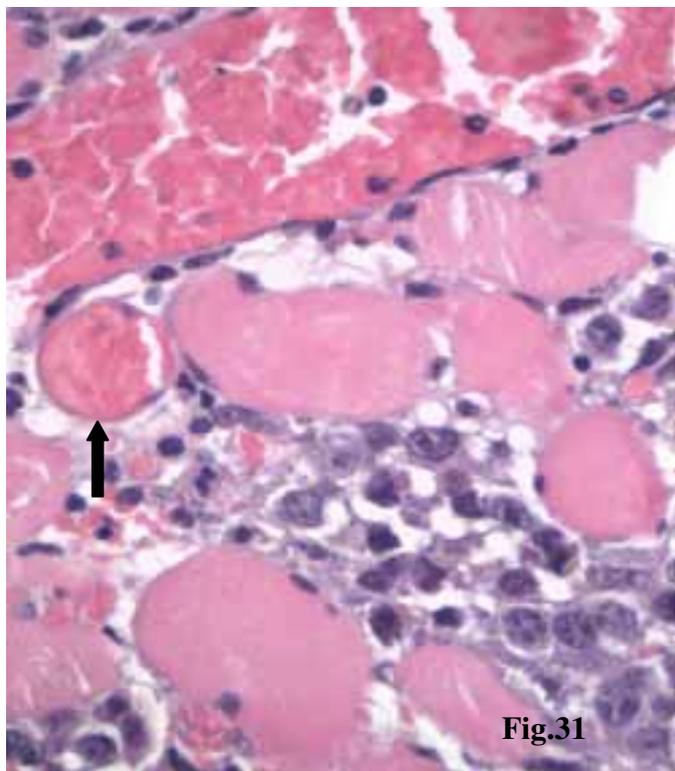


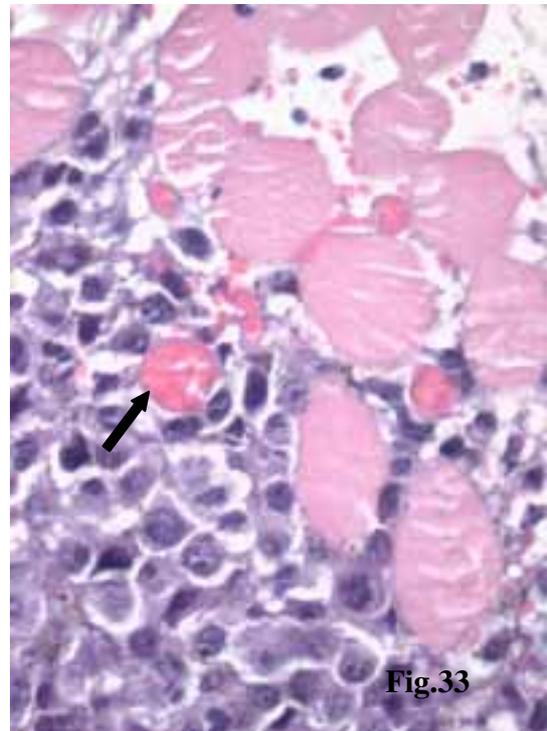
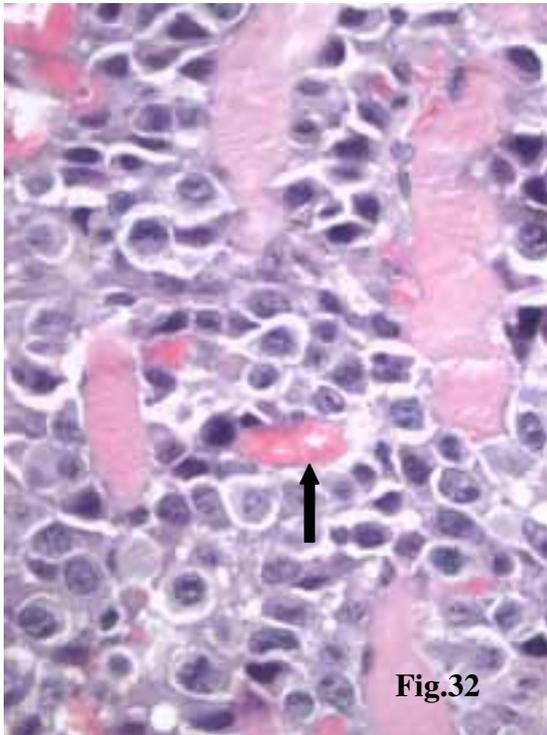
Figs. 27 y 28.- Presencia de estructuras nerviosas y vasculares de gruesas paredes (arteriales y venosas) englobadas por el crecimiento neoplásico. Implante inmediato en lecho irradiado (zona tobillo-60Gy).

Un estudio detallado de las áreas de penetración entre el músculo, fascias y tejido adiposo, pone de manifiesto que el componente microvascular presente en estas áreas corresponde al preexistente, el cual va siendo disecado de forma progresiva hasta quedar incorporado por los elementos infiltrantes (figuras 29, 30 y 31). Efectivamente, los vasos son primero contactados parcialmente y, con posterioridad, rodeados en su totalidad (Figuras 32 y 33).



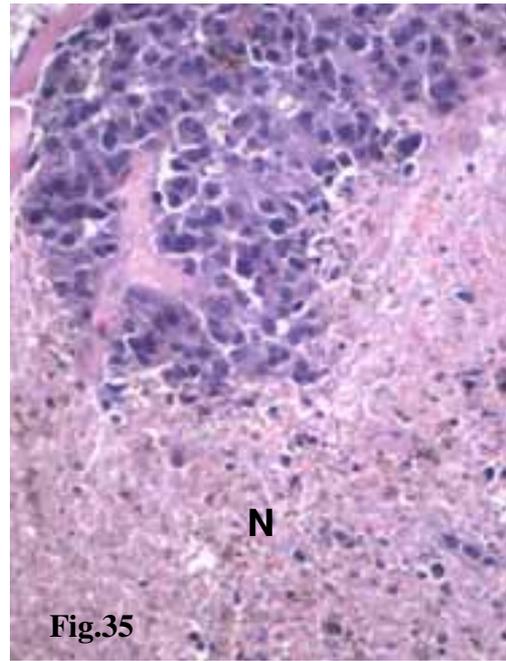
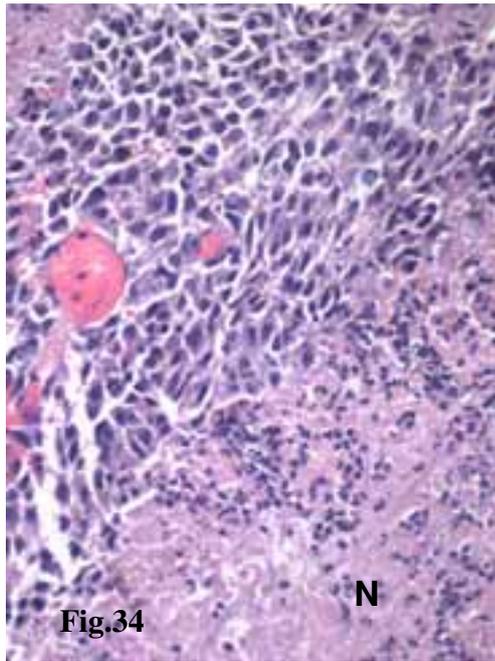
Figs. 29, 30 y 31.- Se observa disección de estructuras vasculares (flechas) por las células neoplásicas infiltrantes entre las fascias y células musculares estriadas. Implante inmediato en lecho irradiado (zona tobillo-60Gy).





Figs. 32 y 33.- Se evidencian capilares preexistentes del lecho muscular (flechas) rodeados en su totalidad por células neoplásicas infiltrantes entre las musculares estriadas. Implante inmediato en lecho irradiado (zona tobillo-60 Gy).

Cuando el crecimiento se intensifica en una determinada área, se asiste a la presencia de necrosis en los espacios que quedan más separados de los vasos incorporados por la neoplasia (Figuras 34 y 35). En ocasiones, esta última adquiere peculiares formas de crecimiento, de tal manera que progresa por las propias fibras musculares estriadas, ocupando la parte central de las mismas (Figura 36), o bien sus regiones laterales, persistiendo sólo una imagen semilunar de la primitiva célula muscular (Figura 37).



Figs. 34 y 35.- Implante inmediato en lecho irradiado (zona tobillo-60 Gy). Se observan amplias áreas tumorales con focos de necrosis (N). Estos últimos aparecen en los espacios más alejados de los vasos sanguíneos incorporados por el crecimiento neoplásico.

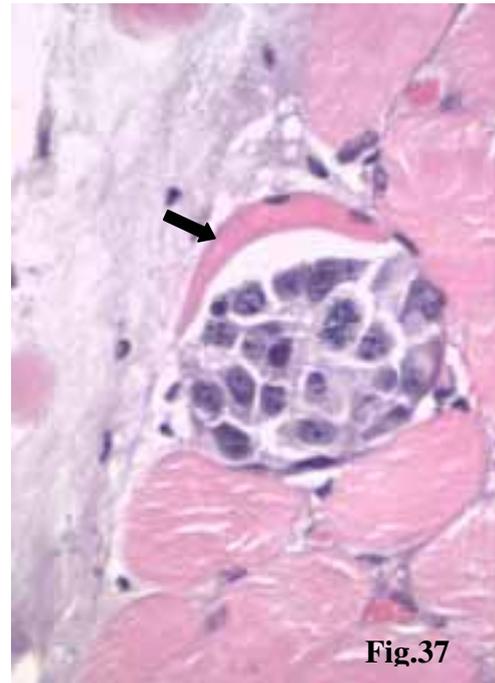
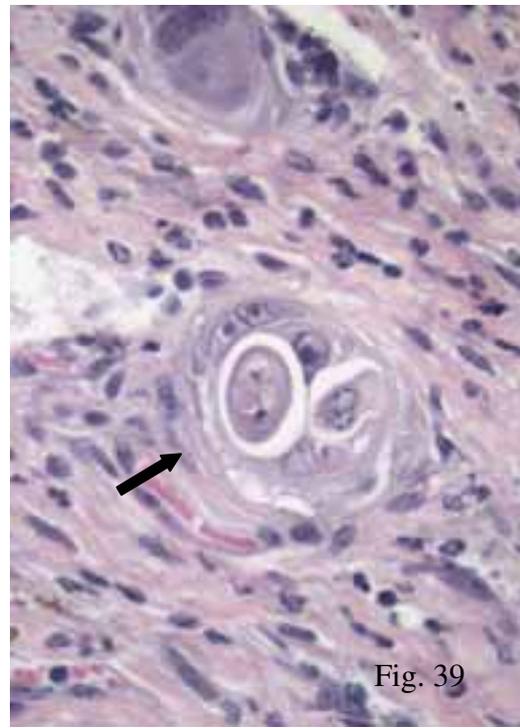
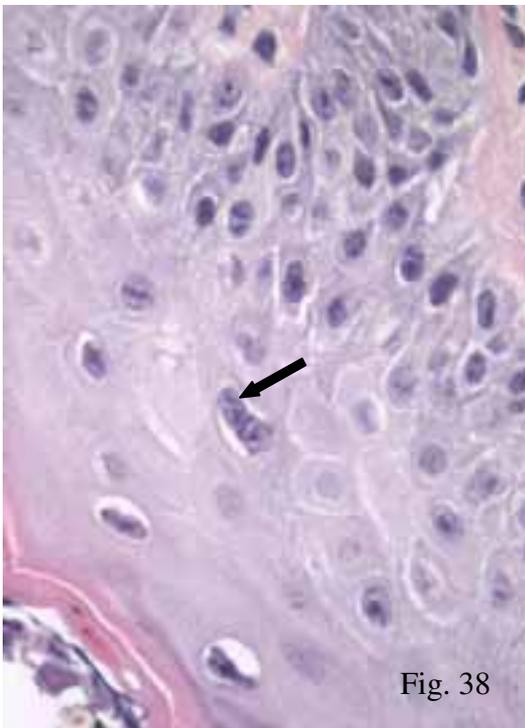


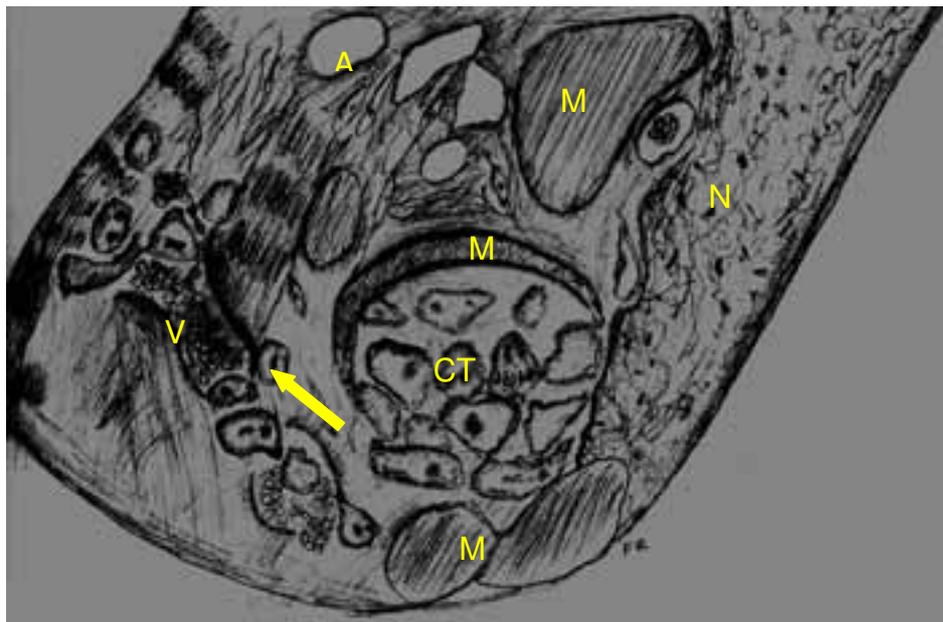
Fig. 36 y 37.- Formas peculiares de crecimiento neoplásico en el tumor implantado en lecho irradiado (zona tobillo-60 Gy). Se ponen de manifiesto grupos de células tumorales en el centro de una fibra muscular estriada (Figura 36- flecha) y en la periferia de otra, dejando un área residual, en semiluna, de dicha célula muscular (Figura 37- flecha).

Como hechos colaterales se han puesto de manifiesto fenómenos secundarios a las radiaciones en el epitelio poliestratificado escamoso y en las estructuras anexiales. Efectivamente, se distinguen núcleos cromáticos e irregulares en la capa basal y en el estrato de Malpighio de la epidermis (Fig. 38). Así mismo, se comprueban núcleos irregulares con nucleolos prominentes en las células que forman parte de las estructuras sudoríparas y pilosas (Fig. 39). Se evidencia también infiltrado inflamatorio moderado, constituido predominantemente por células linfocitarias.

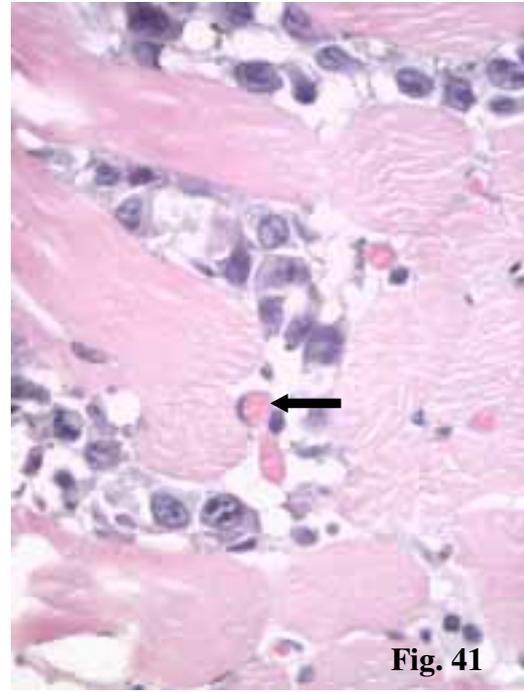
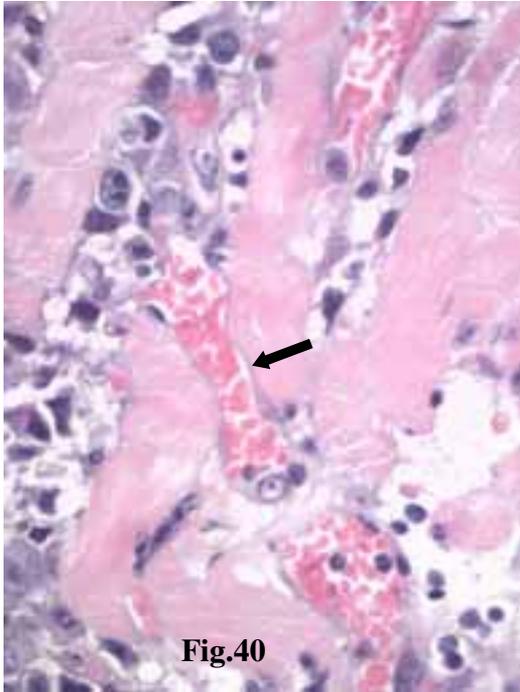


Figs. 38 y 39.- Se ponen de manifiesto fenómenos secundarios a la irradiación en el epitelio del lecho receptor (Irradiado con 60 Gy, con implante tumoral inmediato en zona tobillo). En la figura 38 se observan queratinocitos, de la capa basal y de la de Malpighio, con irregularidades e hiperchromatismo en uno de los núcleos (flecha). En la figura 39 se distinguen también cambios similares y nucleolos prominentes en las células de los anejos cutáneos (flecha).

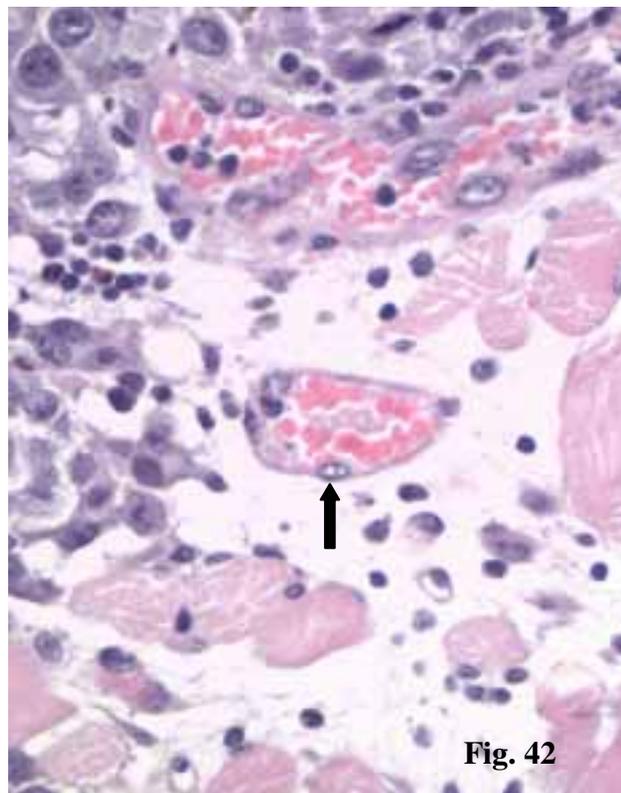
Como resumen de los resultados con microscopía convencional en esta serie hemos de destacar el hecho de la incorporación de vasos del lecho receptor por los grupos de células tumorales que infiltran los tejidos que componen este último. Aunque es difícil seguir todo el recorrido de los vasos, es posible poner de manifiesto, sin lugar a dudas, que no son de nueva formación, sino preexistentes. El fundamento que avala esta afirmación es la demostración de vasos que forman parte parcialmente de las estructuras receptoras y que van siendo abrazados por el componente tumoral. Este fenómeno es muy demostrativo en el límite de las fascias y del conectivo fibroso que envuelve fascículos musculares. Aunque ya se ha dejado constancia previamente, dada su importancia presentamos imágenes esquemáticas y microfotografías demostrativas de vasos del lecho receptor que van pasando a formar parte del tumor, en los límites de éste con las células musculares estriadas y con el tejido conectivo fibroso denso o laxo dispuesto en vecindad (Esquema, Fig. 40, 41 y 42)



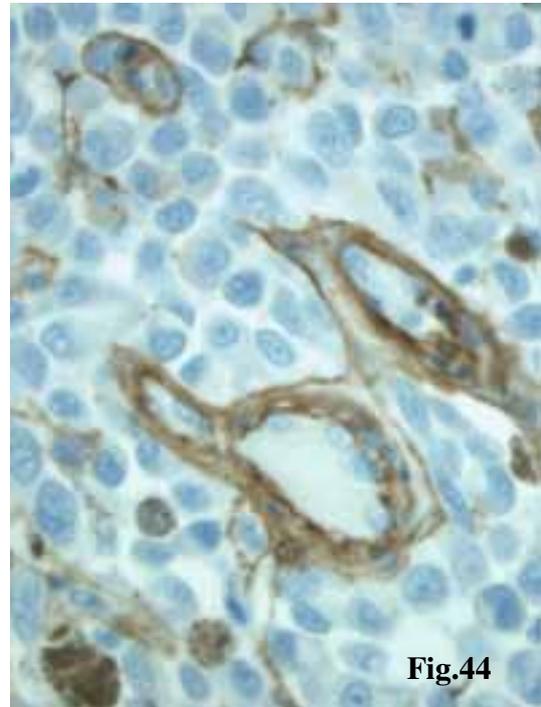
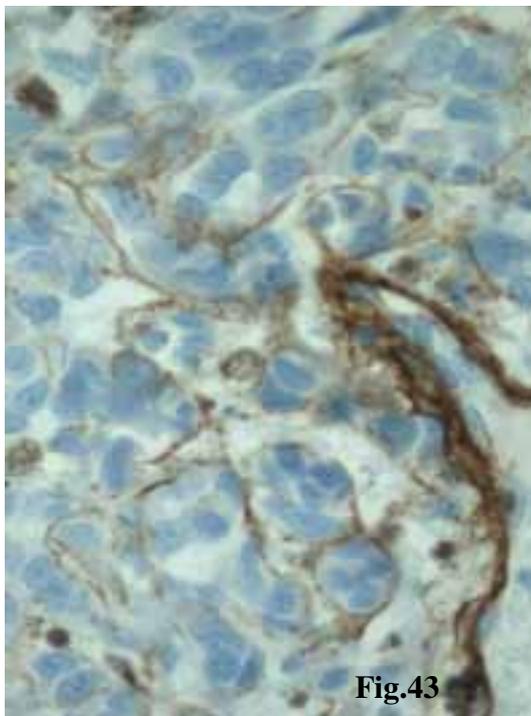
Esquema.- Presentamos en este dibujo un resumen de todas las fases del crecimiento descrito. La flecha indica el frente de avance de la neoplasia disecando las fibras musculares estriadas. De esta manera las fibras (M) quedan aisladas entre las células tumorales (CT), asimismo se representa cómo las células del tumor se dirigen hacia los vasos preexistentes (V). Por último en las zonas más alejadas de la neoplasia, se encuentran fenómenos de necrosis.



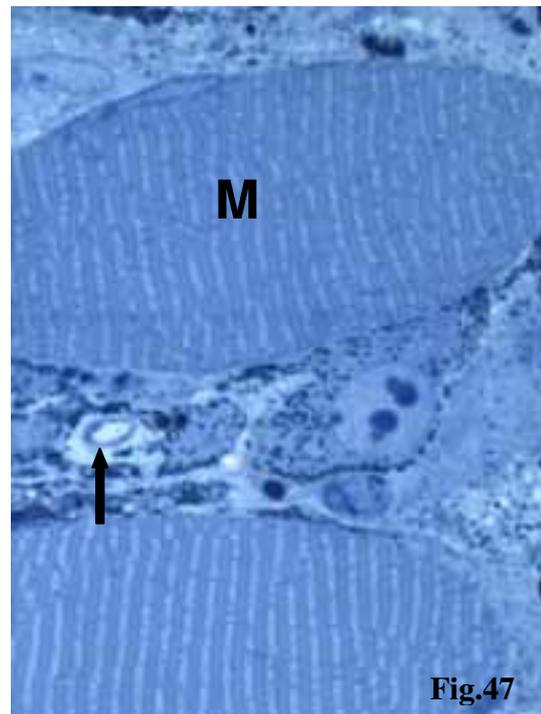
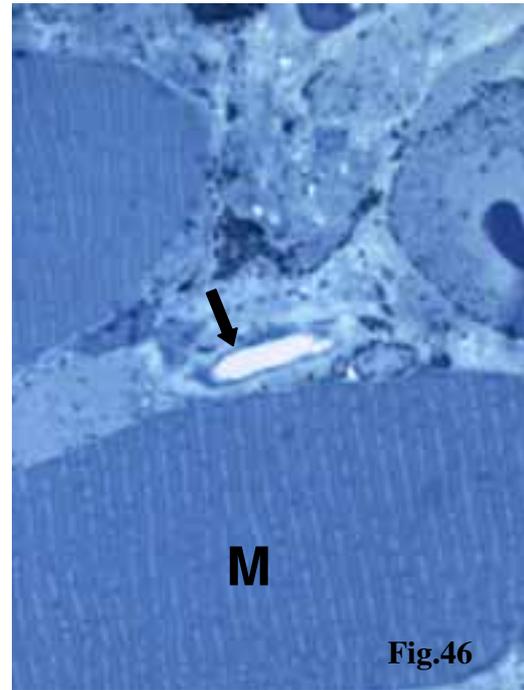
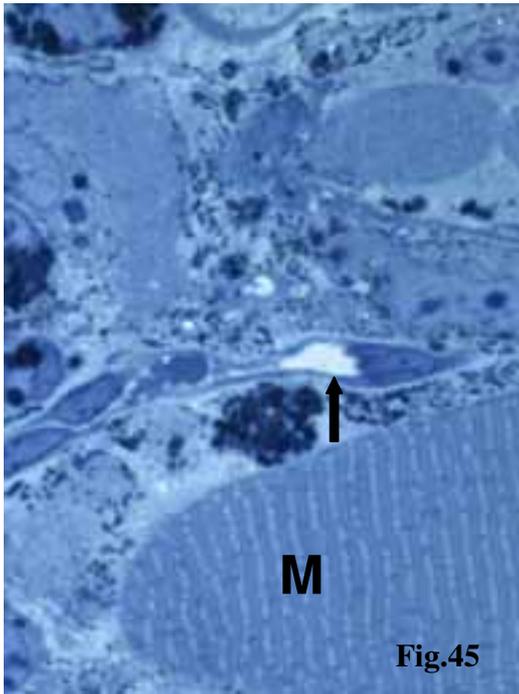
Figs. 40, 41 y 42.- Demostración en diferentes cortes histológicos de la incorporación de capilares preexistentes del lecho receptor por parte del componente neoplásico infiltrante en el mismo (flechas). Lecho irradiado con 60 Gy e implante inmediato en zona tobillo.



Los estudios inmunohistoquímicos, utilizando marcadores vasculares (CD3 y Factor VIII), así como de membranas basales (Laminina y Colágena IV) han confirmado los hechos previamente expuestos, detectándose las estructuras vasculares incorporadas en el tumor, así como el fino componente colágeno persistente. Dado que dichas imágenes son muy similares exponemos en las figuras (43 y 44) las características observadas con dichos procedimientos. Así mismo, las técnicas en cortes semifinos y ultraestructurales demuestran la penetración de las células neoplásicas en los intersticios entre el componente muscular estriado, incorporando a su estroma capilares preexistentes en el mismo (Figs. 45, 46 y 47).



Figs. 43 y 44.- Con técnica inmunohistoquímica (colágena IV), se demuestran nítidamente las estructuras vasculares vasculares incorporadas en el tumor.



Figs. 45, 46 y 47.- Se observan células tumorales y melanófagos en el intersticio muscular. Las células musculares (M) muestran característica estriación. Se pone de manifiesto la incorporación de capilares (flechas)entre las células neoplásicas.

Grupo IIC (lecho irradiado con 80 Gy-implante inmediato en tobillo):

En este grupo se han puesto de manifiesto hechos similares al grupo IIB, es decir cuando la irradiación fue de 60 Gy con implante inmediato en la zona del tobillo. Efectivamente, se demuestra crecimiento predominantemente intersticial, disecando fibras musculares estriadas, tejido fibroso y en ocasiones adiposo. En su crecimiento, la neoplasia muestra microvascularización que, por sus características y desarrollo parecen corresponder a vasos preexistentes en el lecho receptor. Dichos vasos van siendo incorporados paulatinamente por los elementos neoplásicos.

En las figuras 48, 49 y 50 se presentan imágenes demostrativas del crecimiento neoplásico entre las fibras musculares estriadas, así como la presencia de vasos sanguíneos congestivos entre los acúmulos de células neoplásicas. Los procedimientos inmunohistoquímicos y los cortes semifinos y ultrafinos permitieron observar hechos similares a los descritos en el grupo IIB, por lo que evitamos su presentación detallada para evitar reiteraciones.

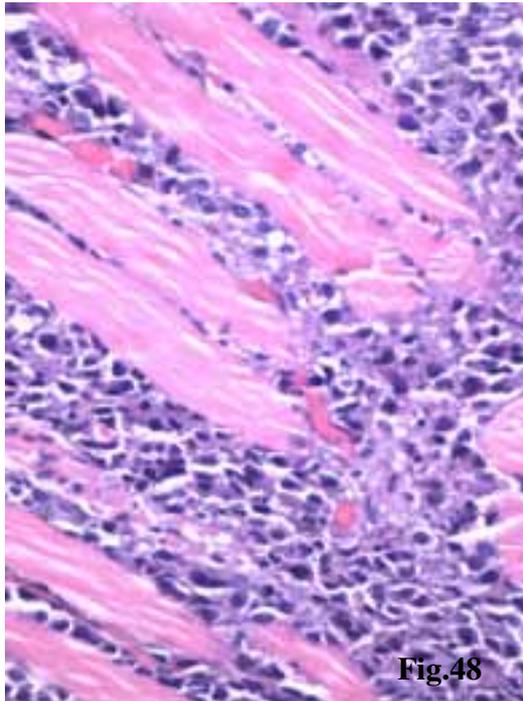


Fig.48

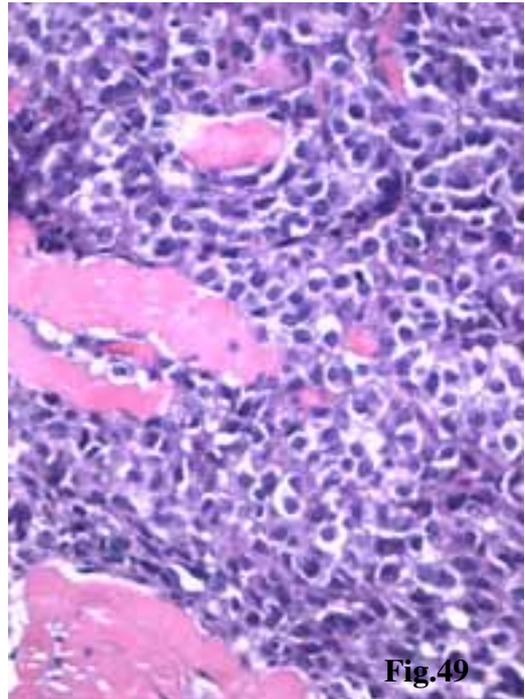


Fig.49

Figs. 48, 49 y 50.- Grupo IIB (80 Gy-implante inmediato en zona del tobillo). Se observa crecimiento neoplásico infiltrante entre fibras musculares estriadas. Las masas de células tumorales muestran microvasculización.

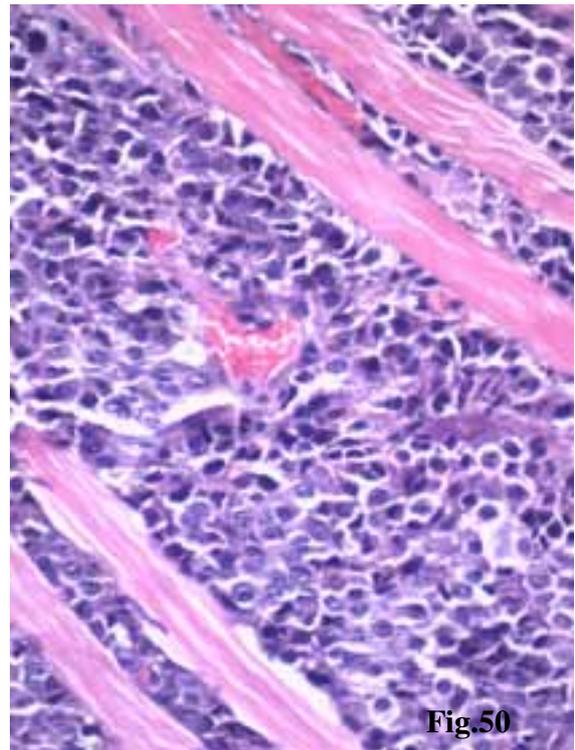
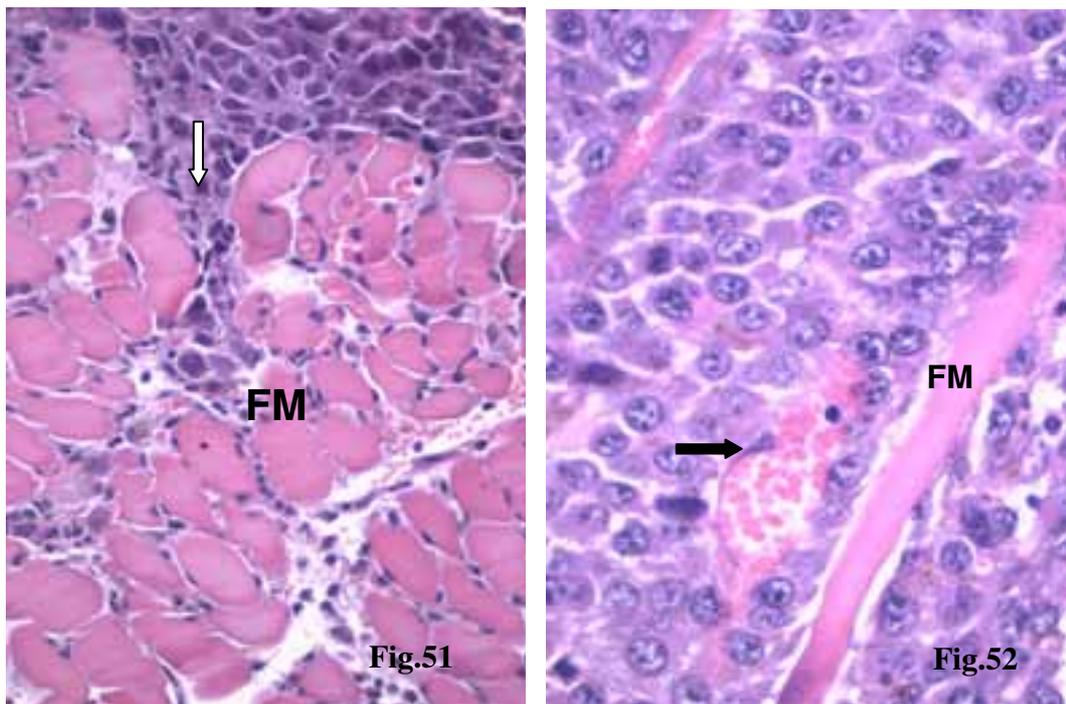


Fig.50

Grupo IID (Lecho irradiado con 60 Gy intervalo de 7 días hasta el implante):

Nuevamente los hallazgos son superponibles a los de los grupo IIB y IIC, a pesar de que en este grupo se dejaron transcurrir siete días desde la irradiación hasta el momento del implante. Se evidencia crecimiento neoplásico, que, en su mayor parte, es infiltrante (Fig. 51 y 52). Como en los grupos anteriores se pueden apreciar acúmulos de células tumorales que se sitúan alrededor de los vasos de la vertiente muscular (Fig. 53). De la misma forma ya descrita, los cordones de células tumorales infiltran los haces de fibras musculares estriadas, de forma que pierden su distribución normal. También se ponen de manifiesto figuras de mitosis y en ocasiones hay amplias dehiscencias entre los elementos neoplásicos, dando la sensación de falta de cohesión entre los mismos (Fig. 52).



Figs. 51 y 52.- Grupo IID (irradiación del lecho con 60 Gy, intervalo de 7 días hasta el implante e injerto en zona tobillo). Nótese que la masa de células tumorales (flecha) se introduce entre las fibras musculares (FM) disecándolas. En la Fig 48 apreciamos el resto de una célula muscular estriada (FM) junto a un vaso sanguíneo (flecha) que ha quedado aislado entre el crecimiento neoplásico.

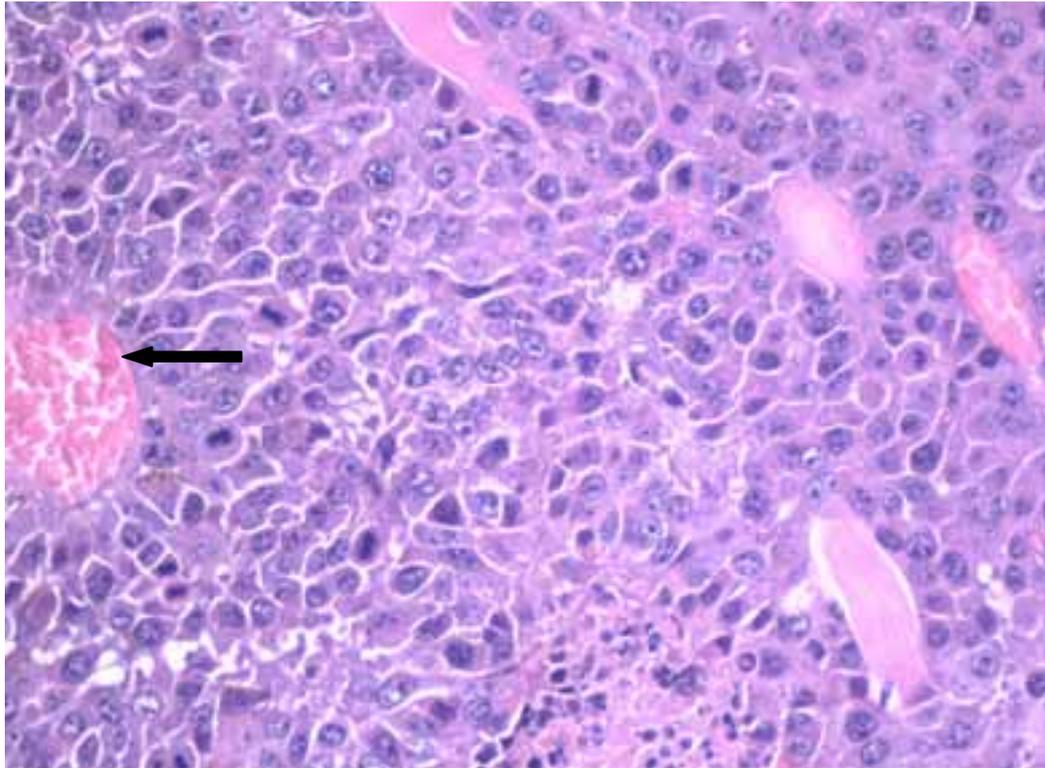


Fig. 53.- En el margen izquierdo de la fisura, se observa un vaso con hematíes en su interior (flecha), totalmente rodeado por células del melanoma, restos de músculo esquelético y, en el área alejada del vaso, fenómenos necróticos (N). Las células tumorales siguen presentando un halo claro a su alrededor. (Grupo IID- Irradiación del lecho con 60 Gy, intervalo de 7 días hasta el implante e injerto en zona del tobillo).

5. DISCUSIÓN

Como ya señalamos anteriormente, a partir de trabajos previos de nuestra línea de investigación, (Otón L.F 1997; Peñate J.G. 1998), se plantearon diversas hipótesis sobre el origen de los neovasos del melanoma implantado en el muslo irradiado del ratón. Entre dichas hipótesis se encontraban las siguientes:

.- Que los vasos procedan del propio injerto. Ese hecho fue descartado en el último trabajo de tesis (Peñate J.G), ya que se procedió al implante de células provenientes de cultivo.

.- Que provinieran del lecho. La dosis en estudios anteriores fueron también de 80 Gy, que es una dosis muy superior a los 7,5-20 Gy necesarios, según la literatura (Jaffe J. 1971; Fischer-Dzoga, K y cols. 1984), para inhibir totalmente la división de la célula endotelial, por lo que esta posibilidad también se descartó entonces.

.- Que el origen de los neovasos sea a partir de células circulantes, bien endoteliales, provenientes de territorios no irradiados, bien de células precursoras de la médula ósea, circulantes.

.- Por último, y como más probable, que los vasos fueran llamados por el tumor desde el margen sano del campo de irradiación. Fue esta nuestra hipótesis de partida.

Tomando esta última hipótesis como la más factible decidimos alejar el implante lo más posible del margen de irradiación, manteniendo invariables el resto de condiciones del estudio. En el momento de la disección de los grupos con lecho expuesto e implante en tobillo, apreciamos que las características del tumor habían cambiado respecto a los estudios anteriores. En primer lugar el tumor es

capaz de crecer cuando se implanta en el tobillo del lecho irradiado, no presenta la rica vascularización del melanoma injertado en el muslo, sus límites son difíciles de precisar y el color no es melánico sino pardusco. Estos hechos llamaron nuestra atención ya que la neoplasia crecía de una manera aparentemente más infiltrante y menos expansiva. La disminución en el volumen en los casos en los que el tumor se implantó en el tobillo la interpretamos como una dificultad para adquirir neovasos a partir de un lecho pobremente vascularizado de forma primaria. Es decir, a nuestro parecer el lugar del implante es un hecho determinante en el crecimiento, ya que, en la serie control sin irradiar cuando se implanta el melanoma en el tobillo adquiere menor peso y volumen que cuando se implanta en el muslo. Eso sí en este caso no cambian las características del crecimiento.

La agresividad del melanoma implantado en un lecho sin irradiar y bien vascularizado, se pone de manifiesto al analizar los resultados paramétricos obtenidos en cuanto a peso y volumen para el grupo control del muslo. Existen diferencias muy significativas, a su favor, al compararlo con cualquiera de los demás grupos, incluyendo el grupo IB también de la serie control, en el que no se irradió el lecho pero el implante se realizó en la zona más distal de la pata, próxima al tobillo. Desde el punto de vista macroscópico los hallazgos fueron los siguientes: gran capacidad de crecimiento de tipo expansivo, enorme formación de neovasos y coloración melánica, circunstancias que como veremos a continuación se relacionan con los hallazgos microscópicos. Estas características son las propias de un tumor agresivo que crece libremente en un lecho propicio, con espacio suficiente y ricamente vascularizado. Todos estos hallazgos se encuentran en concordancia con trabajos previos de nuestra línea de investigación (Otón L.F.

1997; Peñate J.G. 1998). Por último señalaremos que todos los animales de este grupo control con injerto en el muslo, desarrollaron metástasis linfáticas ilíacas homolaterales y paraaórticas; este dato es también coincidente con trabajos de tesis previos de la línea (Peñate J.G. 1998) en los que se dejó constancia de que para intervalos de seguimiento de 14 días se desarrollaban metástasis linfáticas y si dicho período se alargaba hasta los 24-28 días, entonces aparecían metástasis hematógenas.

Se demuestra que existe también crecimiento tumoral en el grupo IB de la serie control e implante en el tobillo, sin embargo los volúmenes alcanzados son significativamente menores a los del grupo IA. Interpretamos este hecho como un retraso en crecimiento debido, probablemente a una mayor dificultad para adquirir neovasos por la pobre vascularización preexistente del lecho en el que se implantó el melanoma y también al menor espacio disponible para su crecimiento. Como ya hemos señalado sus características macroscópicas fueron similares al grupo IA, es decir crecimiento expansivo así como gran cantidad de neovasos y pigmentación intensamente melánica. Además este grupo no dio lugar metástasis de ningún tipo, a nuestro parecer, por el retraso experimentado en su desarrollo. Cuando lo comparamos con el resto de los grupos de la serie de estudio no encontramos diferencias estadísticas con el grupo IIA en la que a pesar de irradiarse el lecho, el tumor se implantó en el muslo y por lo tanto próximo al margen de campo de irradiación, desde donde, a nuestro juicio, este último grupo adquiere la neovascularización. Esta circunstancia hizo que ambos alcanzaran volúmenes y pesos muy similares y que las características macroscópicas fueran afines. Al enfrentarlo con los grupos que recibieron radiación y en los que el implante se

realizó en la zona del tobillo, encontramos discrepancias macroscópicas de gran interés ya que el crecimiento en estos últimos apareció crecimiento poco consistente, no expansivo, de color pardusco y con poca vascularización. No encontramos en general diferencias estadísticas entre los diferentes grupos de estudio excepto al realizar comparaciones con el grupo que recibió 60 Gy y el implante fue distal y que es el que menor volumen alcanzó .

5.1 Angiogénesis

En la línea de trabajo seguida por nuestro grupo, hemos utilizado dosis únicas de 80 Gy con el objeto de inhibir la neovascularización tumoral (Peñate J.G. 1998). Una vez demostrado que el tumor era capaz de crecer y que lo hacía además de forma angiogénico-dependiente, partimos de una de las hipótesis que quedaron abiertas y cuyo planteamiento era la posibilidad de que los vasos sanos del margen de campo fueran el origen de los neovasos tumorales. Con este propósito alejamos el lugar del implante 1 cm aproximadamente y realizamos el injerto en el tobillo del animal.

Los resultados expuestos demuestran que el tumor crece, pero aparentemente con mayor agresividad infiltrativa, avanza a través de las células y fibras musculares para disponerse en torno a los vasos preexistentes y de esta manera va ascendiendo por la pata del ratón, dejando tras de sí un reguero de necrosis. Estos datos no coinciden con lo hasta ahora reportado por la literatura, ya que, se asume desde 1971 que un tumor no puede alcanzar más de 1-2 mm sin formación de neovasos (Folkman 1971). Efectivamente, en nuestro caso el tumor se “vasculariza” pero no forma neovasos, tal y como puede apreciarse en las figuras

expuestas. Lo que en realidad sucede es que, ante la imposibilidad de generar una respuesta neovascular, en un lecho angiogénicamente estéril, el tumor busca las zonas alrededor de los vasos, y avanza a medida que se dispone junto a ellos. Estos hallazgos se confirman para todos los casos en los que el injerto tumoral se realizó en la zona más distal del lecho expuesto, y fue indiferente la dosis administrada así como el intervalo temporal transcurrido desde la irradiación hasta el implante (<6 h ó 7 días). Las dosis administradas son suficientes para inhibir la respuesta endotelial, estudios experimentales con dosis desde los 7,5 a los 20 Gy han demostrado impedir totalmente el crecimiento endotelial (Jaffe J. 1971; Fischer-Dzoga, K y cols. 1984).

Algunas de las más innovadoras teorías como el “vasculogenic mimicry” (Maniotis y cols. 1999; Hendrix y cols. 2001) y la migración y formación de neovasos a partir de células madre de la médula ósea tampoco parecen explicar estos acontecimientos, ya que en ningún caso encontramos canales o pseudovasos y la neoplasia, claramente, se dirigía a los vasos preexistentes, tanto en el tejido muscular como en sus fascias englobándolos e incorporándolos a la propia neoplasia. Estos resultados confirman, de forma indirecta, que cuando el implante se realiza en el muslo y por lo tanto a menor distancia del margen sano de campo, los neovasos provienen de dicho margen, descartados ya, como origen de la neovascularización, el lecho tumoral (Fischer-Dzoga, K y cols. 1984; Peñate J.G. 1998) y el propio estroma del tumor injertado (Peñate J.G. 1998). El hecho que en este trabajo presentamos puede quizá, en parte, explicar los todavía poco alentadores resultados de los antiangiogénicos. Estas sustancias parecieron hace pocos años la posible solución para las enfermedades neoplásicas, sin embargo

esto no ha sido así. Es posible que la existencia de un tipo de crecimiento angiogénico independiente pueda, en parte, explicar los, hasta ahora, pobres resultados de las citadas sustancias. Aunque no pretendíamos con nuestro estudio ni con nuestra línea buscar una aplicación clínica directa de los resultados, dado el alto predicamento que estas sustancias están adquiriendo en los últimos tiempos no podemos resistir la tentación de hacer apunte de trascendencia clínica haciendo referencia a las recidivas en lecho irradiado, esta circunstancia, que se observa en la práctica, responde mal al tratamiento oncológico, tal y como se define en el efecto lecho. Es posible que a pesar del daño vascular, el tipo de crecimiento aquí descrito pueda tener lugar en las recidivas y que por lo tanto el daño vascular no sea suficiente para detener el desarrollo del tumor, pero tampoco para explicar la escasa respuesta al tratamiento oncológico.

5.2 Metástasis

Como se desprende de los resultados sólo encontramos metástasis linfáticas en el grupo IA, pero no en el resto de grupos, en los que bien por la radiación, bien por el lugar distal del implante o por ambos motivos se producía un retraso en crecimiento. Estudios experimentales sobre el efecto lecho han demostrado que un tumor creciendo en un lecho irradiado, lo hace más lentamente y da más metástasis para un mismo volumen tumoral (Milas L. 1987), podemos decir que en nuestro trabajo ninguno de los grupos de estudio alcanzó el mismo volumen que el grupo IA, por lo que no podemos establecer comparaciones entre ellos. En trabajos previos sí se encontraron metástasis para intervalos de seguimiento superiores (28 días) en ratones con lecho irradiado e implante en el muslo, pero

en nuestro caso no era un objetivo del trabajo. En dichas series se demostró que cuando el tumor alcanzaba el mismo volumen que el implantado en un lecho no irradiado el número de metástasis era mayor, estos hallazgos estaban en consonancia con lo referido en la literatura y quizás a modo de especulación pudiera ser la causa de la ausencia de metástasis en nuestras series.

6. CONCLUSIONES

1.- Se confirma que el crecimiento del melanoma B16F10, implantado en el muslo del ratón, se efectúa predominantemente en forma de masas celulares expansivas y dehiscentes, induciendo, a partir del lecho receptor angiogénesis y proliferación celular, destinadas a la vascularización y a la formación de estroma de las mismas. También hay crecimiento infiltrante entre los tejidos del lecho receptor.

2.- Se demuestra que, a pesar de su menor crecimiento, el implante neoplásico en las zonas más distales y menos distensibles, en concreto en el tobillo, no cambia la forma de crecimiento tumoral, que es similar a la del implante en el muslo. Se observan masas celulares dehiscentes y expansivas que se nutren fundamentalmente mediante neovascularización inducida por el propio tumor en crecimiento.

3.- En todos los casos (muslo y tobillo) en los que el lecho receptor es previamente irradiado se observa una importante disminución de la masa tumoral neoformada.

4.- El crecimiento del melanoma en el muslo irradiado es sobre todo angiogénico y parece depender de los vasos del borde de campo.

5.- El crecimiento del melanoma en el tobillo irradiado adquiere unas características peculiares, se hace pardusco, mal delimitado e histologicamente más infiltrante.

6.- En el caso del implante en el tobillo irradiado el crecimiento del tumor se efectúa sin signos histológicos de angiogénesis y su oxigenación se consigue al ser englobados, por la neoplasia, los vasos preexistentes en el lecho receptor.

7.- Aparecieron metástasis linfáticas exclusivamente en los ratones no irradiados y con implante en el muslo, lo que coincide con los tumores que alcanzaron mayor volumen.

8.- Queda establecida la validez del modelo experimental, pues las dosis aplicadas, de 60 y 80 Gy en sesión única, sobre la pata del ratón, han permitido conseguir condiciones de nula respuesta angiogénica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- .- Adamson I.Y.R.; Bowden D.H. Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol*; 112:224-230 1983
- .- Albright J.W.. Tres resistance a l'infection par Tripanosoma musuli et a l'infection en general 1981.
- .- Alfthan O.S. A comparative study of the growth of skin and human skin tumors on the chorioallantoic membrane of the embryonated chicken eggs. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 9.(Suppl 34) 1-78 1956
- .- Algire G.H., Chalkley H.W., Legallais F.Y. and Park H.D. Vascula reactions of normal and malignant tumors "in vivo": I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl. Cancer Inst.* 6, 46-73. 1945.
- .- Allen J.B., Sagerman R.H. and Stuart M.J. Irradiation decreases vascular prostacilin formation with no concomitant effect on platelet tromboxane production. *Lancet*; II: 1193-1196 1981
- .- Ando K. and Koike S. The relationship between lung colony and in situ assays. *Int. J.Radiation Oncology Biol Phys* 11:1495-1502 1985
- .- Auerbach R. Angiogenesis-inducing factors: a review. *In: Lymphokines. Vol IV. Pick E. (ed) Academic Press. New York. Pp 69-88 1981*
- .- Auerbach R., Auerbach W. and Polakowski. Assays for angiogenesis, a review. *Pharmacol. Ther.* 51, 1-11 1991

- .- Aunsprung D. H. And Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in perfused blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 114:53-65. 1977.
- .- Aunsprung D.H., Falterman K. and Folkman J. The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab. Invest.* 38, 284-294. 1978
- .- Azmi T.I. and O'Shea. J.D. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab. Invest.* 38, 206-217. 1984
- .- Baird A. and Walicke P.A. Fibroblast growth factors. *Br.Med. Bull.* Apr; 45 (2): 438-52. 1989.
- .- Bashkin P., Doctrow S., Klasbrung M., Svahn C.M., Folkman J. and Vlodavsky I. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28,1737-1743. 1989
- .- Bavisotto L.M., Schwartz S.M. and Heimark R.L. Modulation of Ca-dependent intercellular adhesion in bovine aortic and human umbilical vein endothelial cells by heparin-binding growth factors. *J. Cell. Physiol.* 143, 39-51. 1990
- .- Ben- Ezra D. Neovascularogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *M. J. Ophthalmol.* 24: 167-176. 1978
- .- Ben-Ezra D., Hemo I. and Maftzir G. In vivo angiogenesis activity of interleukins. *Arch. Ophthalmol.* 108, 573-576. 1990
- .- Bicknell R. and Vallee B.L. Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 ,5961-5965. 1988

- .- Bishop D.K. Jutila M.A. Sedmark D.D. Beatle M.S. and Orosz C.G. .
Lymphocyte entry into inflammatory tissues in vivo. Qualitative differences
of high endothelial venule-like vessels in sponge matrix allografts vs
isograft. *J.Immunol.* 142,4219-4224. 1989
- .- Bishop D.K., Sedmark D.D. Leppink D.M. And Orosz C.G. vascular
endothelial differentiation in sponge matrix allograft. *Hum Immunol.*
28,128-133 1990
- .- Boehm T., Folkman J., Browder T. and O'Reilly M.S. Antiangiogenic
therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.
Nature 390, 404-407.1997
- .- Bogdanov A Jr, Marecos E, Cheng HC, Chandrasekaran L, Krutzsch HC,
Roberts DD, Weissleder R. Treatment of experimental brain tumors with
trombospondin-1 derived peptides: an in vivo imaging study. *Neoplasia*
Nov;1(5):438-45 1999.
- .- Bowersox JC; Ritchers A; Sorgente N. Altered characteristics of B16
melanoma cells induced by chemically crosslinking fibronectin to cell
surfaces. *Journal of Surgical Oncology* 29:11-14 1985
- .- Brem H. and Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by
cartilage. *J. Exp. Med.* 141: 427-438.1975
- .- Burger P.C. and Klintworth G.K. Autoradiographic study of corneal
neovascularization induced by chemical cautery. *Lab Invest.* 45, 328-335.
1981

- .- Burger P.C., Chandler D.B. and Klintwoth G.K. Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular casts. *Lab. Invest.* 48, 169-180. 1983
- .- Camplehon R.S. and Miranda Penhaligon. The tumor bed effect: a cell kinetic and histological investigation of tumours growing in irradiated mouse skin. *The British Journal of Radiology* 58: 443-451 1985
- .- Carmichael D.F., Sommer A. Thompson R.C. Anderson D.C., Smith C.G., Welgus H.G. and Stricklin G.P. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2407-2411. 1986
- .- Cavallo T., Sade R., Folkman J. And Cotran R.S., Ultrastructural autoradiographic studies of the early vasoproliferative response in tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 70, 345-362. 1973
- .- Clark E.R. and Clark E.L. Microscopic observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. *Am:J.Anat.* 64, 251-301 (1935)
- .- Clifton K.H. and Jirtle R.. Mammary carcinoma cell population growth in preirradiated and unirradiated transplant sites. *Radiology* 117, 459-465. 1975
- .- Cuevas P., González A. N., Carceller F. and Baird A. Vascular response to basic fibroblast growth factor when infused onto the normal adventitia or into the injured media of the rat carotid artery. *Circ. Res.* 69, 360-369. 1991

- .- Culton M. Chandler D.B. Proia A. D. And Klinworth G.K. The effect of oxygen on corneal vascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31. 1277-1281 1990
- .- D'Amore P.A. and Thompson R.W. Mechanism of angiogenesis. *Annu.Rev.Phisiol.*49,453-464.1987
- .- Davis M.D. Diabetic retinopathy: a clinical overview. *Diabetes Metabol.Rev.*4,291-322. 1988
- .- De Gowin, R.L.; Lewis, L.J;Mason, R.E.,. Radiation-induced inhibition of human endothelial cells replicating in culture. *Radiat.Res;* 68:244-250 1976
- .- Derbyshire, E., nd Thorpe, P. E. Targeting the tumor andothelium using specific antibodies. *In: Tumour Angiogenesis, pp 343-356, Bicknell, R. L., and Claire, E. (eds). Oxford University Press, Oxford. 1997*
- .- Diaz Flores L.; Gutierrez R. Varela H.; Rancel N. and Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol. Histopath.* 6, 269-286 (1991b)
- .- Díaz-Flores L., Gutierrez R. and Varela H. Angiogenesis: an update. *Histol and Histopath Invited Rewiew* 9: 807-843. 1994.
- .- Díaz-Flores L., Gutierrez R., Gonzalez P. And Varela H. Incucible perivascular cells contribute to the neochondrogenesis in grafted perichondrium. *Anat. Rec.* 229, 1-8-1991a.
- .- Díaz-Flores L., Gutierrez R., Lopez Alonso A., Gonzalez R. And Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin. Orthop.* 275, 280-286.1992

- .- Díaz-Flores L., Martín A.I., García Montelongo R. And Gutierrez R. Role of the pericytes and endothelial cells in tissue repair and related pathological processes. *J. Cutan. Pathol.* 17, 191-192. 1990 b.
- .- Díaz-Flores L., Martín A.I., García R. And Gutierrez R. Proliferative fasciitis: ultrastructure and histogenesis. *J. Cutan. Pathol.* 16, 85-92. 1989
- .- Díaz-Flores L., Rodriguez E., Gayoso M.J. and Gutierrez R. Growth of two types of cartilage after implantation of free autogeneic perichondrial grafts. *Clin Orthop.* 234, 267-279. 1988
- .- Díaz-Flores L., Valladares F., Gutierrez R and Varela H. The role of pericytes of the adventitial microcirculation in the arterial intimal thickening. *Histol. Histopath.* 5, 145-153. 1990 a.
- .- DiCorleto P.E. and Bowen-Pope D.F. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 80,1919-1923. 1983
- .- DiPietro L.A. and Polverini P.J. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am. J. Pathol.* 143, 678-684. 1993
- .- Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, Little CD. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev Biol.* 2000 Aug 15;224(2):178-88.
- .- Dvorak H.F. Dvorak A. M. Manseau E.J. Wiberg L. And Churchill W.H. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs: role of cellular

immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line tumor regression. *JNCI* 62, 1459-1372. (1979)

- .- Dvorak H.F. Harvey V.S. Estrella P. Brown L.F. McDonach J. And Dvorak A.M. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab. Invest.* 57, 673-686 1987
- .- Dvorak H.F. Nagy J.A. Dvorak J.T. and Dvorak A.M. identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J. Pathol.* 133,95-109 1988
- .- Dvorak H.F. Orenstein N.S. and Carvalho A.C. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor secreted products. *J. Immunol.* 122:166-174 1979^a
- .- Dyce M; Sharif SF; Whalen GF. Search for anti-metastatic therapy effects of phenitoin on B16 melanoma metastasis. *Journal of Surgical Oncology* 49: 107-112 1992
- .- Easa E. H. M. and Casarett G.W. Effect of epsilon- amino-n-aproic.acid on radiation-induced increase in capillary permeability. *Radiology* ;106:679-688 1973
- .- Ehrlich H.P., Jug W.K., Costa D.E. ad Rajaratnam J.B. Effects of heparin on vascularization of artificial skin grafting. *Exp. Mol. Pathol.* 48,244-251. 1988
- .- Eisenstein R., Kuettner K.E., Neopolitan C., Soble L.W. and Sorgete N. The resistance of certain tissues to invasion. III. Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblasts and edothelial cells in culture. *Am. J. Pathol.* 81, 337-348. 1975

- .- Eisenstein R., Sorgente N., Soble LW., Miller A. and Kuettner K.E. The resistance of certain tissues to invasion: penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme. *Am. J. Pathol.* 73, 765-774 1973.
- .- El-Sabban ME; Pauli BU. Adhesion- mediated gap junctional communication between lung- metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis; 14: 164-176, 1995.*
- .- Evans M.L.; Graham M.M.; Mahler P.A. Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. *Radiat. Res; 107:262-271 1986*
- .- Fajardo L.F., Kwan H.H., Kowalski J., Prionas S.D. and Allison A.C. Dual role of tumor necrosis factor alpha in angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 140, 539-544. 1992.
- .- Fajardo L.F.; Stewart, J.R. :Pathogenesis of radiation-induced myocardial fibrosis. *Lab. Invest; 29:244-257 1973*
- .- Fajardo LF. The unique physiology of endothelial cells and its implications in radiobiology. (In) Vaeth JM; Meyer JL, Radiation Tolerance of Normal Tissues. *Front Radiat Ther Oncol 23: 96-112, Basel, Karger 1989.*
- .- Falardeau P., Champagne P., Poyet P., Hariton C. and Dupont E. *Semi. Oncol. Dec 28(6) 620-625. 2001.*
- .- Ferrara N. and Henzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-859. 1989

- .- Ferrara N., Houck K., Jakeman L. and Leung D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endoc. Rew. 13,18-32. 1992*
- .- Ferrara N., Leung D.V. and Phillips H.S. Molecular characterization and distribution of vascular endothelial growth factor. *In. Neuroendocrine Perspectives. Muller E.E. and McLeod R.B. (Eds). Springer Verlag. New York. 9, 127-161.1991*
- .- Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethue J.L., Riordan J.F. and Vallee B.L. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry 24, 5480-5486.1985*
- .- Fidler I J. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature(New Biol) 242:148-149 1973*
- .- Fischer-Dzoga K., Dimitrievich G.S., Griem M.L. Radiosensitivity of vascular tissue. II. Differential radiosensitivity of aortic cells in vitro. *Radiat. Res. 99:536-546 1984*
- .- Foidart J.M., Bere E. W., Yaar M., Rennard S.I., Gullino M., Martin G.R. and Katz S.I. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest. 42, 336-342. 1980.*
- .- Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis. *Lab. Invest. 51 601-602.1984*
- .- Folkman J. and Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev. Exp Pathol. 16, 207-248. 1976*

- .- Folkman J. Angiogenesis: Initiation and control. *Ann N.Y: Acad. Sci.* 401, 212-227. 1982.
- .- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer. Res.*43, 175-203 1985b
- .- Folkman J., Haundenschild C.C., and Zetter B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 76, 5217-5221.1979
- .- Folkman J., Klangbrun M. Sasse J. Wadzinski M.G. Inger D. And Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor is stroed within basement membrane. *Am.J.Pathol.* 130,393-400 1988
- .- Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995. 1. 27-31.
- .- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*. 285: 1182-1186 1971.
- .- Form D. and Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172, 214-218. 1983
- .- Forsman A.D. and McCormack J.T. Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throught the estrous cycle. *Anat. Rec.* 233,515-520. (1992)
- .- Fournier G.A. Luty G.A. Watt. S. Fenselau A. And Patz A. A corneal micropocket assay for angiogenesis en the rat eye. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci* 21. 351-354 1981
- .- Frater-Schroder M., Risau W, Hallman R., Gautsi P and Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in

vitro , is angiogenic in vivo *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 5277-5581.
1987.

- .- Furusato M., Fukunaga M., Kikuchi Y., Yokota K., Joh K., Aizawa S. And Ishikawa E. Two and Three dimensional ultrastructural observation in juvenile hemangioma. *Vrchows Arch. (Cell Pathol.)*. 46, 229-237. 1984.
- .- Furusato M., Wakui S., Suzuki M., Takagi K., Hoi M., Asari M., Kano Y. Ushigome S. Three dimensional ultrastructural distribution of cytoplasmic interdigitation between endothelium and pericyte of capillary in human granulation tissue by serial section reconstruction method. *J. Electron. Microsc. Tokyo* 39, 86-91. 1990.
- .- George D. Platelet –derived growth factor receptors: a therapeutic target for solid tumors. *Semin. Oncol* 2001 Oct: 28 (5 Suppl 17) 27-33. 2001
- .- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 13;285(5430):1028-32. Review Aug 1999
- .- Gillette, E.L.; Maurer, G.D.; Severin,G.A.; Endothelial repair of radiation damage following Beta irradiation. *Radiology*;116:175-177 1975
- .- Gimbrone M.A. Jr, Cotran R.S, and Folkman J. Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture. *Ser. Haematol.*6, 453-455 (1973)
- .- Gimbrone M.A. Jr., Cotran R.S., Leapman S.B. and Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J.Natl Cancer Inst.* 52,413-427 (1974)
- .- Gitay- Goren H., Soker S., Vlodavsky I. and Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell

surface associated heparin-like molecules . *J. Biol. Chem.* 267, 6093-6098. 1992

.- Gospodarowicz D. Growth factors and their action in vivo and in vitro *J. Pathol* 141:201-233. 1983

.- Gospodarowicz D., Cheng J., Liu G.M., Fujii D.K., Baird A. and Bohlen P. Fibroblast growth factor in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128 554-562 1985.

.- Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L. And Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8: 95-114. 1987

.- Goto F. Goto K. Weindel K. and Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells with collagen gel. *Lab. Invest.* 69, 491-493 1993

.- Greenberg G. And Hunt T.K. The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. *J. Cell. Physiol.* 97; 353-360 (1978)

.- Greenberg G., Vlodaysky I., Foidart J.M. and Gospodarowicz D. Conditioned medium from endothelial cell cultures can restore the normal phenotypic expression of vascular endothelium maintained in vitro in the absence of fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol.* 103: 333-341. 1980

- .- Gross J.L., Moscatelli D. And Rifkin D.B. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80,2623-2627. 1983
- .- Grunt T.W. Lametschwandter A., Karrer K. and Staindl O. The angioarchitecture of the Lewis lung carcinoma in laboratory mice. *Scanning Electron. Microsc. II* 557-573 1986
- .- Hambry J.M. and Showalter H.D. Small molecule inhibitors of tumor-promoted angiogenesis including protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* Vol 82. Nos 2-3, 169-193. 1999.
- .- Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364. 1996.
- .- Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., and Arbeit, J. Transgenic mouse models of tumor angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur. J. Cancer* 32 A: 2386-2393. 1996
- .- Hans-jorg Herniger and John J Dorey. Handbook on genetically standardized Jax mice (3rd Ed). *New York* 1980.
- .- Hasuike T., Hino N., Yamane T., Nishizawa Y., Morii H. and Tatsumi N. Effects of TNP-470, a potent angiogenesis inhibitor, on growth of hematopoietic progenitors. *Eur. J. Haematol.* 58:293-94. . 1997
- .- Haynes W.L. Proia A.D. and Klinworth . Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30. 1588-1593 1989.

- .- Heath E.I., O'Reilly S., Humphrey R., Sundaresan P., Donehower R.C., Sartorius S., Keedy M.J., Armstrong D.K. Carducci M.A., Sorensen J., Kumor K., Kennedy S. and Grochow L.B. Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12.9566 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol. Oct; 48 (4): 269-274. 2001*
- .- Heimark R.L. And Schwartz S.M. The role of cell-cell interaction in the regulation of endothelial cell growth. In: the molecular and cellular biology and wound repair. *Clark R.A.F. and Henson P.H. (eds) Plenum. New York p.359 1988*
- .- Henderson B.W.; Bitcher H.I; Johnson R.J. Loss of vascular fibrinolytic activity following irradiation of the liver. An aspect of late radiation damage. *Radiat. Res.; 95: 646-652 1983*
- .- Hendrix M., Seftor E.A., Meltzer P.S., Gardner L.M. Hess A.R., Kirseychmann D.A., Schattema G.C. and Seftor R.E. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA July 3; 98 (14): 8018-8023. 2001*
- .- Herbert J.M., Laplace M.C. and Maffrand J.P. Effect of heparine on the angiogenic potency of basic and acidic fibroblast growth factors in the rabbit cornea assay. *Int. J. Tissue Reac. X, 133-139. 1988*
- .- Hewitt H.B. and Blake, E.R. The growth of transplant murine tumors in pre-irradiated sites. *British Journal of Cancer, 22, 808-824 1968*

- .- His W. Untersuchungen uber die erste Anlage des Wirbelthierleibes. *F:C:W: Vogel. Leipzig. 1868*
- .- Hopewell JW; Calvo W; Campling D; Reinhold HS; Rezvani M; Yeung TK. Effects of radiation on microvasculature. (In) Vaeth JM; Meyer JI, Radation Tolerance of Normal Tissues. *Front Radiat. Ther. Oncol 23: 85-95, Basel, Karger 1989.*
- .- Hopewell, J.W.; Campling,D.; Calvo, W y col.: Vascular irradiation damage:its cellular basis and likely consequences. *Br.J.Cancer;53 (suppl VII):181-191 1986*
- .- IFFA CREDO. Souris C57BL/6. *Folleto informativo: 92-96. Paris, 1989.*
- .-Ingber D, Fujita T, Kishimot S, Sudo K, Kanamaro T, Brem H and Folkman J. Synthetic analogs of fumagillin that inhibits angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature 348:555-557. 1990.*
- .- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine The plasminogen activator system: biology and regulation. *Y. Cell Mol Life Sci Oct 1;56(1-2):104-32 1999*
- .- Ishikawa F., Miyazono K., Hellman U., Drexler H., Wernstedt C., Hagiwara K., Usuki K., Takaku F., Risau W. and Heldin C-H. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature 338, 557-562. 1989*
- .- Ito H; Barkley T.Jr., Peters L., and Milas L. Modification of tumor response to cyclophosphamide and irradiation by preirradiation of the tumor bed: prolonged growth delay but reduced curability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 11:547-553 1985*

- .- Jaffe E.A. Nachman R.L. Becker C.G. and Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 51,46 a 1972
- .- Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumours. *Sci. Am.*58-65 1994
- .- Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumours. *Cancer metastases Rev.*): 253-266 1990
- .- Jirtle R., Rankin J.H.G., and Clifton K.H. Effect of X-irradiation of tumor bed on tumour blood flow and vascular response to drugs. *Br. J. Cancer*,37:1033-1038 (1978).
- .- Johnson L; Longenecker J.P.; Fajardo L.F. Differential radiation response of cultured endothelial cells and smooth myocytes. *Anal. Quant. Cytol.*4:188-198 1982
- .- Kanwar Y.S. and Farquhar M.G. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1303-1307. 1979.
- .- Kim YM, Kim YM, Lee YM, Kim HS, Kim JD, Choi Y, Kim KW, Lee SY, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J Biol Chem.* Mar 1;277(9):6799-805. 2002.
- .- Kubota Y. Kleinman H.K. Martín G.R. and Lawley T.J. Role of basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. cell. Biol.*107 1589-1598 1988
- .- Kwock, L.; Davenport, W.C.; Clark, R.L. y col.: The effects of ionizing radiation on the pulmonary vasculature of intact rats and isolated pulmonary endothelium. *Radiat. Res.*; 111:276-291. 1987

- .- Langer R. and Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797-800. 1976
- .- Law M.P., Thomlinson R.H., Vascular permeability in the ears of the rats after X-irradiation. *Br. J. Radiol*; 51. 895-904.1978
- .- Leibovich S.J., Polverini P.J., Shepard H.M., Wiseman D.M., Shively V. and Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor alpha. *Nature* 329, 630-632. 1987.
- .- Leith. John T; Lynn E. Faulkner, Sarah F. Bliven And Seth Michelson. Tumor Bed Expression in Xenografted Artificial Heterogenous Colon Tumors. *Int. Journal Radiation Oncology, Biology and Physics*, Volume 15, Number 1. ; July 1988
- .- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W-J., Goeddel D.V: and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309. 1989.
- .- Liaw L. and Schwartz S.M. Microtubule disruption stimulates DN synthesis in bovine endothelial cells and potentiates cellular response
- .- Lund EL, Bastholm L, Kritjansen PE. Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts. *Clin. Cancer Res Mar*;6(3):971-8. 2000
- .- Maciag T. Kadish J. Wilkins L. Stermerman M.B. And Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell. Biol.* 94,511-520 1982

- .- Madri J.A. and Stern K.S. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. *Am.J. Pathol.*106,180-186 1982
- .- Maier J.A.M., Delia D., Thorpe P.E. and Gasparini G. In vitro inhibition of endothelial cell growth by the antiangiogenic drug AGM-1470 (TNP-470) and the anti-endoglin antibody TEC-11. *Anticancer Drugs* 8: 238-244. 1997
- .- Maisin J.R. The influence of radiation on blood vessels and circulation. III. Ultrastructure of the vessel wall. *Curr. Top. Radiat. Res.*;10:29-57.1974
- .- Maniotis AJ, Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Peter J., Meltzer P.S., Hendrix M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J. Pathol.* 155 (3): 739-752. Sep 1999
- .- Martin, D.F.; Fischer,J.J.: Radiation sensitivity of cultured rabbit aortic endothelial cells. *Int. J. Radiat.Oncol.Biol.Phys*; 10:1903-1906 1984
- .- Martin, D.F.; Fischer,J.J.: Radiation sensitivity of cultured rabbit aortic endothelial cells. *Int. J. Radiat.Oncol.Biol.Phys*; 10:1903-1906 1984
- .- Mc Cracken J.S., Burger P.C. and Kintworth G.K. Morphologic observations on experimental corneal vascularization in the rat. *Lab Invest.* 41 519-530.1979.
- .- Milas L.; Hirata H.; Hunter N.; Peters L.J. Effect of radiation-induced injury of tumor bed stroma on metastatic spread of murine sarcomas and carcinomas. *Cancer Res.*48:2116-2120 1988.
- .- Milas L.; Hisao Ito.; Hunter N.; Jones S. And Lester J. Peters. Retardation of Tumor Growth in Mice Caused by radiation-induced injury of tumor

bed stroma: dependency on tumor type. *Cancer Research* 46: 723-727
February 1986

- .- Milas L.; Hunter N.; Peters L.J. The tumor bed effect: dependence of tumor take, growth rate, and metastasis on the time interval between irradiation and tumor cell transplantation. *Int.J.Radiat. Oncol.Biol.Phys.* 13:379-383 1987.
- .- Miyazono K., Okabe T., Urabe A., Takaku F. and Heldin C-H. Purification and properties of an endothelial cell mitogen from human platelets. *J. Biol. Chem.* 262, 4098-4103. 1987.
- .- Montesano R. and Orci. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis "in vitro" . *Cell* 42,469-477 1985
- .- Montesano R., Orci L. and Vasalli P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell. Biol.* 97, 1648-1652 1983
- .- Montesano R., Vasalli J.D., Baird A., Guillemin R. And Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83. 7297-7301. 1986.
- .- Moscateli D., Presta M. and Rifkin D.B. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2091-2095. 1986
- .- Moses M.A., Sudhalter J. and Langer R. Identification of inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 248, 1408-1410. 1990.

- .- Murray J.B. Brown L., langer R. and Klagsbrun M. A microsustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro* 19, 743-748 1983
- .- Murray R. Spiegel. Manual de fórmulas y tablas matemáticas. *Mc Graw Hill*.
Pag 10 1982
- .- Nehls V., Denzer K. and Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 270, 469-474. 1992
- .- Nicolson GL. Metástasis cancerosas. *El cáncer. Cap 14. Libros de Investigación y Ciencia. Grafesa, Barcelona (1985).*
- .- Nicosia R.F. and Madri J.A. The microvascular extracellular matrix. Developmental cages during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. *M. J. Pathol* 128, 78-90 1987
- .- Norrby K. Jakobsson A. And Sorbo J. Mast cell mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch.(B)* 52, 195-206 (1986)
- .- Norrby K. Jakobsson A. And Sorbo J. On mast cell mediated angiogenesis in the rat mesenteric window assay. *Agents Actions* 30, 231-233 1990b
- .- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H. and Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the supression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328. 1994.
- .- Obeso J.L. and Auerbach R. A new microtechnique for quanting cell movemnt in vitro using polystyrene bead monolayers. *J. Immunol: Mewth* 70,141-152 (1984).

- .- Okamura K., Sao Y., Matsuda T Hamanaka R., Ono M., Khono K, and Kuwano M. Endogenous basic fibroblast growth factor –depend induction of collagenase and interleukin-6 in tumor necrosis factor-treated human endothelial cells. *J. Biol. Chem* 266, 19162-19165. 1991.
- .- Otón Sanchez L.F. Metástasis Hematógenas en Pulmón irradiado. Estudio experimental. *Tesis Doctoral; Universidad de La Laguna. Facultad de Medicina. Marzo de 1997.*
- .- Ovejera A.A. The use of human tumor xenograf in large-scales drug screening. (In) Kallman RF. Rodent tumour models in experimental therapy *Chap 46. Pergamon Books, Inc. 1987.*
- .- Penhaligon M; Laverich M. Radiation response of endothelial cells in vitro. *Br.J. Radiol ;58:913-914 1985*
- .- Pepper M.S. and Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff. Dev. 32: 319-328. 1990*
- .- Pepper M; Montesano R. Angiogénesis: paradigm for balanced extra cellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein 49: 138-162. 1996* Esta publicación describe todos los procesos morfológicos y funcionales de las fases de la angiogénesis.
- .- Pepper, M. S. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator-Plasmin Systems in Angiogenesis. *Arterioscler Thromb 21: 1104-1117 2001.*
- .- Philips G. D., Whitehead R. A and Knighton D.R.,. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. *Am. J. Anat. 192: 257-262. 1991.*

- .- Phillips H.S., Hains J., Leung W. and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 131, 254-260. 1990.
- .- Phillips T.L.: An ultrastructural study of the development of radiation injury in the lung. *Radiology* ; 87:49-54 1966
- .- Ploüet J., Schilling J. and Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 8, 3801-3806. 1989.
- .- Plunkett M.L. and Hailey J.A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab. Invest.* 62, 510-517 1990
- .- Polverini P.J. Cotran. R.S. Gimbrone M.A. Jr. And Unanue E.R. Activated macrophagos induce vascular proliferation. *Nature* 269, 804-806 1977
- .- Proia A. D. Chandler D.B. Haynes W.L. Smith C.F. Suvarnamani C. Erkel F.H. and Klinworth G.K. Quantitation of corneal neovascularization using computerized image analysis. *Lab. Invest.* 58. 473-479. 1988
- .- Ravindranath N., Little-Ihrig L., Phillips H.S., Ferrara N. and Zeleznick A.J. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in the primate ovary. *Endocrinology* 141, 254-260. 1992.
- .- Reinhold, H.S; Buisman , G.H.; Radiosensitivity of capillary endothelium. *Br. J. Radiol.*;46:54-57. 1973
- .- Rhee J.G., Lee I., Song, C.W. The clonogenic response of bovine aortic endothelial cells in culture to radiation. *Radiation Res.*;106:182-189 1986

- .- Rhine W. Hsieh D.S.T. and Langer. Polymers for sustained macromolecule release: procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. *J. Pharm. Sci.* 69, 265-270 (1980)
- .- Ribatti D., Rocali L., Nico B. and Bertossi M. Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. *Acta Anat* 130, 257-263. 1987
- .- Ribatti D., Vacca ., Nico B., Crivellato E., Roncali L. and Dammaco F. The role of mast cells in tumour angiogenesis. *British J. Haematol* 115, 514-521 2001
- .- Rifkin D.B., and Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Biol.* 109, 1-6.1989.
- .- Rifkin D.B., Gross J.L., Moscatelli D. and Jaffe E. Proteases and angiogenesis: Production of plasminogen activation and collagenase by endothelial cells. In: Pathobiology of the endothelial cell. Nossel H.L., and Vogel H.J. (eds). *Academic Press Inc. New York. Pp 191-197. 1982.*
- .- Risau W., Sariola H., Zerwes H.G., Sasse J., Eklom P., Kemler R. and Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell derived embryoid bodys. *Development.* 102, 471-478. 1988
- .- Robertson N.E. Discapani C.M. Downs E.C. Hailey J.A. Sarre O. Runkle R.L. Jr Popper T.L. and Plunkett M.L. a quantitative in vivo mouse model used to assay inhibitors to tumor-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 51,1339-1344 1991
- .- Rodríguez Hernández. F. Estudio experimental de la acción de las radiaciones ionizantes sobre la proliferación y diferenciación celular

durante los fenómenos reparativos. *Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. Facultad de la Medicina. 1991*

- .- Roftad E.K. Growth and vascular structure of human melanoma xenograft. *Cell Tissue Kinet. 17, 91-101 1984*
- .- Rose L. Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *The Oncologist 5 (suppl 1): 20-27. 2000*
- .- Royds J.A., Dower S.K., Qwarnstrom E.E. and Lewis C.E. Response of tumor cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *Mol. Pathol. 51: 55-61. 1998*
- .- Sabin F.R. Studies on the origin of the blood vessels as seen in the living blastoderm of chick during the second day of incubation. *Contr. Embriol. 9, 215-262. 1920.*
- .- Sato Y. and Rifkin D.B. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor , regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis. *J. Cell. Biol. 107, 1199-1205. 1988.*
- .- Scatena R. Prinomastat, a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor. A novel pharmacological approach for tissue remodeling-related diseases. *Expert Opin. Invest. Drugs Sep, (9) 2159-2165. 2000*
- .- Schoefl G.I. Studies of inflammation. III. Growing capillaries: Their structure and permeability. *Virchows Arch. Pathol. Anat. 337: 97-141. 1963*
- .- Schwartz S.M., Gajdusek C.M. and Owens G.K. Vessel wall growth control. In: Pathobiology of the endothelial cells. Nossel H.L. and Vogel H.J. (eds). *Academic Press Inc. New York. Pp 63-78 1982*

- .- Schweigerer L., Malerstein B. and Gospodarowicz D. Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. *Biophys. Res. Commun* 143, 997-1004. 1987
- .- Scott P.A.E., Gleadle J.L., Bicknell R. and Harris A.L. Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 75: 706-712. 1998
- .- Sekido, K., Fong, K. M., and Minna, J. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1378: F21-F59.1998
- .- Selye H. On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury. *J. Am. Med. Ass.* 152, 1207-1213 1953
- .- Shepro D. Endothelial cells, inflammatory edema, and the microvascular barrier: Comments by a "free radical". *Microvasc. Res.* 35,247-264. 1988
- .- Sholley M.M., Ferguson G.P., Seibel H.R., Montuor J.L. and Wilson J.D.. Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest.* 51, 624-634. 1984.
- .- Sholley M.M., Gimbrone M.A. and Cotran R.S. Cellular migration and replication in endothelial re-epithelialization: a study using irradiated endothelial cultures. *Lab Invest.* 36, 18-25. 1977
- .- Shweiki D., Itin A., Neufeld G., Gitay-Goren H. and Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 91, 2235-2243. 1993.

- .- Silverstein R.L., Leung L.K. and Nachman R.L. Thrombospondin: a versatile multifunctional glycoprotein. *Arteriosclerosis* 6, 245-253. 1986.
- .- Simionescu N. and Simionescu M. Endothelial cell dysfunction. *Plenum Press. New York. 1991*
- .- Simons. MD. General concepts of angiogenesis. *Uptodate* ® 9.3 2002.
www.uptodate.com
- .- Sinzinger, H.; Firbas, W.: Irradiation depresses prostacyclin generation upon stimulation with the platelet-derived growth factor. *Br. J.Radiol.*58:1023-1026 1985
- .- Soff G.A. Angiostatin and angiostatin related proteins. *Cancer Metastase Rev* 19, (1-2) 97-107. 2000
- .- Sparagen S.C., Bond V.P., and Dahl L.K. Role of hyperplasia in vascular lesions of cholesterol-fed rabbits studied with thymidine- H3 autoradiography. *Circ. Res.* 11, 329-336. 1962.
- .- Stenstrom,K.W., Vermund, H., Mosser,D.G. Effects of roentgen irradiation on the tumor bed.I. The inhibition action of local pretransplantation roentgen irradiation (1500 r) on the growth of mouse mamary carcinoma. *Radiat. Res.* 2:180-191 1955
- .- Stenstrom.K.W.; Mosser,D.G. And Johnson, E.A.: Effects of Roentgen irradiation on the tumor bed.II. The inhibition action of differen dose levels of local pretransplantation roentgen irradiation on the growth of mouse mammary carcinoma. *Radiat. Res.* 354-364 1956

- .- Steward WP and Thomas .L. Marimastat: the cliical development of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Expert.Opin. Invest. Drugs.Dec 9, (12): 2913-2922. 2000*
- .- Summers W.C., Clifton K.H. and Vermund H. X-irradiation of the tumor bed. A Study of the indirect actions of radiation on transplantable tumors. *Radiology,82.691-703 1964*
- .- Takiwana M. Nishida Y. Susuki F. Kishi J. Yamashita K. And Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yol-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 1264-1271 1990b*
- .- Tannock I.F. and Hayashi S. The proliferation of capillary endothelial cells. *Cancer Res. 32, 77-82 1972*
- .- Tano Y., Chandler D. B., and Machener R. Vascular casts of experimental retinal neovascularization. *Am. J. Ophthalmol. 92: 110-118. 1981.*
- .- Taraboletti G. Roberts D. Liotta L.A. and Giavazzi R. platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J. Cell Biol. 111, 765-772 1990*
- .- Terranova V.P., Di Florio R., Lyall R.M. Hic S., Friesel R. And Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell. Biol. 101, 2330-2334. 1985.*
- .- Thomas K., Ríos Candelore M., Gimenez Gallego G., Di Salvo J., Bennet C., Rodkey J. And Fiuzpatrick S. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent vascular endothelial cell mittogen with sequence

homology to interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82. 6409-6413.
1985

- .- Thompson WD, Shiac KJ, Fraser RA :Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol Apr;151(4):323-327* 1987.
- .- Tomanek R.J., Schalk K.A., Marcus M.L. and Harrison D.J. Coronary angiogenesis during long-term hypertension and left ventricular hypertrophy in dogs. *Circ. Res.* 65, 352-359. 1989.
- .- Trott K.R. and Kummermehr J. Split dose recovery of a mouse tumour and its stroma during fractionated irradiation. *Br. J. Radiol.*55:841-846 1982
- .- Tsao C.H., Ward W.F., Port C.D. Radiation injury in rat lung. III. Plasminogen activator and fibrinolytic inhibitor activities. *Radiat. Res.;* 96:301-308.1983
- .- Tseung S., Savion N., Sern R. and Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor modulates synthesis of collagen in cultured vascular endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 122: 355-362. 1982.
- .- Turk B.E., Su Z., Liu J.O. Synthetic analogues of TNP-470 and ovalicin reveal a common molecular basis for inhibition of angiogenesis and immunosuppression. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1163-1169.1998
- .- Urano M. and Suit H.D. Experimental evaluation of tumor bed effect for CH3 mouse mammary carcinoma and for CH3 mouse fibrosarcoma. *Radiation Research*,45,41-49.1971
- .- Uría J.A. López-Otín C. Matrilysin-2, a new matrixmetalloproteinase expressed in human tumours and showing the minimal domain

organization required for secretion, latency and activity. *Cancer Res Sep*
1:60 (17): 4745-512000

- .- Vaisman N., Gospodarowicz D. and Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 265, 19461-19466. 1990.
- .- Van den Brenk, H.A.S. Crowe, M.C. and Stone, M.G. Reactions of the tumor bed to lethally irradiated tumor cells and the Revesz effect. *Br. J. Cancer*, 36: 94-104. 1977
- .- Vlodavsky I. and Gospodarowicz D. Structural and functional alterations in the surface of vascular endothelial cells associated with the formation of a confluent cell monolayer and with the withdrawal of fibroblast growth factor. *J. Supramol. Struct* 12 (Suppl.1) 73-114. 1979
- .- Wakui S.T. Two and three dimensional ultrastructural observation of two cell type angiogenesis in human granulation tissue. *Virchows Arch. (B)* 56, 127-139.
- .- Warren B.A. The vascular morphology of tumors. In: Tumor blood circulation. Peterson H.I. (ed) CRC Press. Boca Raton. 1-47. 1979 a
- .- Warren B.A., Greenblatt M. and Kommineni V.R.C. Tumor angiogenesis: ultrastructure of endothelial cells in mitosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 53, 216-224 1972
- .- Wernert ., Stanjek A., Kiriakidis S. Inhibition of angiogenesis in vivo by Ets-1 antisense oligonucleotides- inhibition of Ets-1 transcription factor expression by the antibiotic fumagillin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 3228-3231. 1999

- .- Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, Liu H, Daniel TO, Smith CA, Fanslow WC A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis.. *Immunity Nov;15(5):837-46 2001*
- .- Winkles J.A. Friesel R., Burgess W.H. Howk R., Mehiman T., Weinstein R. and Moeiag T. Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor 1 (endothelial cell growth factor) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7124-7128. 1987.*
- .- Zatterstrom U.K., Felbor U., Fukai N. and Olsen B.R. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell. Struct. Funct. Apr; 25 (2): 97-101. 2000.*
- .- Zetter B.R. Angiogenesis. State of the art. *Chest 93,159S-166S 1988*
- .- Ziche M., Alessandri G. and Gullio P.M. Gangliosides promote the angiogenic response. *Lab. Invest. 61, 629-634. 1989*