

La resistencia adaptativa a terapias antiangiogénicas en un modelo murino de cáncer

Marta Pàez Ribes

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**LA RESISTENCIA ADAPTATIVA A TERAPIAS
ANTIANGIOGÉNICAS EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER**

Marta Pàez Ribes

Noviembre 2010



Programa de Doctorado de Biomedicina
Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

**LA RESISTENCIA ADAPTATIVA A TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS EN UN
MODELO MURINO DE CÁNCER**

Memoria presentada por Marta Pàez Ribes para optar al grado de Doctora por
la Universitat de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Oriol Casanovas Casanovas
en el Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia (ICO).

Oriol Casanovas Casanovas
Director

Francesc Viñals Canals
Tutor

Marta Pàez Ribes
Doctoranda

Noviembre 2010

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	11
Angiogénesis	13
Angiogénesis tumoral	14
Fenómeno del <i>switch</i> angiogénico	15
Factores reguladores de la angiogénesis tumoral	17
Factores implicados en guiar la formación de nuevos vasos	22
La familia de las semaforinas	23
El papel de Semaforina 4D como promotora de la angiogénesis y la invasión tumoral	25
Estructura y función de los vasos tumorales	29
Terapias antiangiogénicas	32
Anticuerpos monoclonales	34
Inhibidores selectivos de la actividad quinasa	35
Efectos del tratamiento antiangiogénico	36
Resistencia al tratamiento antiangiogénico	38
Evasión a la terapia antiangiogénica	40
Resistencia intrínseca al tratamiento antiangiogénico	41
Modelo RIP-Tag2	42
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
Animales y estabulación	55

Modificación del modelo RIP-Tag2	55
RIP-Tag2;Rag1 knockout (RIP-Tag2 Rag ^{KO/KO})	56
RIP-Tag2/Cre;Vegf-A ^{fl/fl} (β-VEGF-KO)	56
Genotipado de los animales	56
Tratamiento antiangiogénico	57
Obtención de DC101	58
Electroforesis en gel de poli-acrilamida	58
Administración de Hypoxyprobe TM y perfusión con PBS	59
Determinación del tiempo de supervivencia	60
Determinación del volumen tumoral	60
Determinación de los efectos antiangiogénicos de un fármaco	61
Obtención y procesado de muestras	61
Estudios histológicos	62
Cuantificación de la invasión	62
Determinación de metástasis	62
Inmunofluorescencia	63
Inmunohistoquímica	64
Inmunohistoquímica de antígeno T	65
Inmunohistoquímica con Hypoxyprobe MAb1	65
Cuantificación de la microdensidad vascular	66
Separación de células endoteliales mediante citometría de flujo	66
Extracción proteica de las muestras tumorales	68
Transferencia proteica	69
Western blotting	69
Extracción de RNA de muestras tumorales	70
Obtención de cDNA a partir de mRNA	70
PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	71
Análisis estadístico	73

RESULTADOS	75
Parte I: Caracterización a la resistencia a anti-VEGFR2	77
Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2	79
Efectos en el volumen tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2	80
Efectos en el fenotipo tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2	81
Estudio de la reversibilidad del fenotipo invasivo	85
Incremento de la invasión en tumores portadores de una delección en el gen <i>Vegf-A</i>	87
Efectos de la terapia anti-VEGFR2 en la diseminación a órganos distantes	90
Fenómeno de la vasoinvasión	94
Parte II: Relevancia clínica de los efectos producidos por la inhibición de la angiogénesis: utilización de sunitinib	97
Reversión tras el tratamiento interrumpido con sunitinib	99
Incremento en la supervivencia tras el tratamiento continuo con sunitinib	102
Efectos en el volumen tumoral tras el tratamiento con sunitinib	103
Efectos en el fenotipo tumoral tras el tratamiento con sunitinib	103
Efectos de la terapia con sunitinib en la metástasis a hígado y nódulo linfático	106
Parte III: Efectos de la inhibición de vías angiogénicas independientes de VEGF: Estudio de la inhibición de Semaforina 4D	109
Tratamiento con anticuerpo anti-Sema4D en ratones RIP-Tag2	114
Efecto antiangiogénico del tratamiento con anti-Sema4D	114
Efecto en el volumen tumoral tras el tratamiento con anti-Sema4D	121
Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-Sema4D	122
Efectos en el fenotipo invasivo tras la terapia anti-Sema4D	122
Diseminación linfática y hematológica tras el tratamiento con anti-Sema4D	125

Parte IV: Estudio de las causas de la invasión	129
Incremento de hipoxia tras el tratamiento antiangiogénico	131
Estudio de los cambios moleculares tras el tratamiento antiangiogénico	136
DISCUSIÓN	146
Resistencia adaptativa a la terapia con anti-VEGFR2 y sunitinib	148
Caracterización del efecto antiangiogénico y sus consecuencias tras el tratamiento con un inhibidor de una molécula implicada en la guía de nuevos vasos: Semaforina 4D.	156
Estudio de las causas de la invasión tras recibir tratamiento antiangiogénico.	158
Relevancia clínica	162
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	171
PUBLICACIONES	192

Índice de figuras**Introducción**

Figura 1: Fenómeno del <i>switch</i> angiogénico	16
Figura 2: La familia de VEGF	19
Figura 3: Principales familias de proteínas implicadas en la guía axónica que participan en angiogénesis	23
Figura 4: Modelo de estimulación de Plexina B1 que promueve una respuesta angiogénica	26
Figura 5: Vía de señalización tras la unión de Sema4D y Plexina B1	29
Figura 6: Diferencias entre vasos y células endoteliales normales y tumorales	30
Figura 7: Tabla de fármacos antiangiogénicos aprobados en la clínica y en fase de ensayos clínicos	33
Figura 8: Mecanismos de acción de los fármacos antiangiogénicos	34
Figura 9: Efectos de los fármacos antiangiogénicos sobre las células endoteliales y tumorales	37
Figura 10: Resistencia a sunitinib	39
Figura 11: Construcción génica que origina los tumores RIP-Tag2	43
Figura 12: Progresión tumoral del modelo RIP-Tag2	44
Figura 13: Posibles ensayos a realizar con el modelo RIP-Tag2 para tratar determinados estadios tumorales	46
Figura 14: Morfología de las lesiones pre-neoplásicas y de los tumores RIP-Tag2	48

Material y métodos

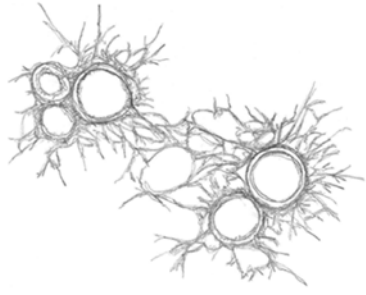
Figura 15: Gel de poli-acrilamida	59
Figura 16: Fórmula química del Hypoxyprobe	59
Figura 17: Esquema de PCR cuantitativa a tiempo real con tecnología Taqman	71
Figura 18: Curvas de amplificación	72

Resultados

Figura 19: Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2	79
Figura 20: Disminución del volumen tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2 a corto plazo	80
Figura 21: Efectos de la terapia anti-VEGFR2 en la vasculatura tumoral	81
Figura 22: Incremento en la invasión después del tratamiento con DC101	83
Figura 23: Incremento de la invasión local tras el tratamiento con anti-VEGFR2	84
Figura 24: Irreversibilidad de la invasión	86
Figura 25: Incremento en la supervivencia tras una semana de tratamiento con DC101	87
Figura 26: Incremento de la invasión tras la delección específica para tumor del gen Vegf-A	88
Figura 27: Incremento en el número de tumores altamente invasivos en el modelo RIP-Tag2 β -VEGF-KO	89
Figura 28: Incremento en la invasión a nódulo linfático	91
Figura 29: Invasión a nódulo linfático incrementada en tratados	92
Figura 30: Incremento de invasión a hígado	92
Figura 31: Aumento de metástasis hepáticas en ratones tratados con DC101	93
Figura 32: Vasoinvasión de un pequeño grupo de células	94
Figura 33: Presencia de células tumorales en vasos del hígado	95
Figura 34: Incremento en la invasión tumoral después del tratamiento a tiempo corto con sunitinib	100
Figura 35: Invasión a órganos distantes incrementada tras el tratamiento interrumpido con sunitinib.	101
Figura 36: Incremento en la supervivencia tras el tratamiento continuo con sunitinib	102
Figura 37: Disminución del volumen tumoral tras el tratamiento con sunitinib.	103
Figura 38: Efectos del tratamiento con sunitinib en la vasculatura tumoral	104

Figura 39: Incremento en la invasión después del tratamiento continuado con sunitinib	105
Figura 40: Incremento de la invasión local tras el tratamiento continuado con sunitinib	106
Figura 41: Invasión a nódulo linfático e hígado	107
Figura 42: Cambios en la invasión a órganos distantes tras el tratamiento con sunitinib	108
Figura 43: Expresión de Sema4D y Plexina B1 en los tumores RIP-Tag2	112
Figura 44: Localización de Sema4D en los tumores RIP-Tag2	113
Figura 45: Disminución del número de lesiones hemorrágicas tras los tratamientos durante 2 semanas	115
Figura 46: Disminución del número de lesiones hemorrágicas tras los tratamientos durante 4 semanas	116
Figura 47: Cambio en el fenotipo hemorrágico tumoral tras los tratamientos	118
Figura 48: Efectos sobre la microdensidad vascular.	119
Figura 49: Recuento de microdensidad vascular	120
Figura 50: Disminución del volumen tumoral tras los tratamientos con anti-VEGFR2 y anti-Sema4D durante 4 semanas.	121
Figura 51: Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2 y anti-Sema4D	123
Figura 52: Cuantificación de la invasión local tras 2 semanas de tratamiento.	124
Figura 53: Cuantificación de la invasión local tras 4 semanas de tratamiento	125
Figura 54: Invasión a nódulo linfático incrementada en tratados.	126
Figura 55: Invasión a hematogena a hígado incrementada en tratados.	127
Figura 56: Detección de hipoxia en el interior de los tumores RIP-Tag2 y RIP-Tag2 β -VEGF-KO.	132
Figura 57: Detección de hipoxia en tumores tratados.	133
Figura 58: Detección de hipoxia en micrometástasis hepáticas	134
Figura 59: Cuantificación de la hipoxia.	135

Figura 60: Cuantificación de la invasión en los tumores con hipoxia	136
Figura 61: Expresión relativa de VEGFA en tumores controles y tratados	138
Figura 62: Expresión relativa de E-cadherina en tumores controles y tratados	139
Figura 63: Incremento de E-cadherina y β -catenina en tumores tratados	140
Figura 64: Expresión relativa de NCAM en tumores controles y tratados	142
Figura 65: Los niveles de NCAM no presentan cambios tras el tratamiento anti-VEGFR2	143
Figura 66: Cambio de isoforma de NCAM tras recibir 4 semanas de terapia anti-VEGFR2	144
<u>Discusión</u>	
Figura 67: Resistencia adaptativa-evasiva de los tumores en respuesta a las terapias antiangiogénicas	155



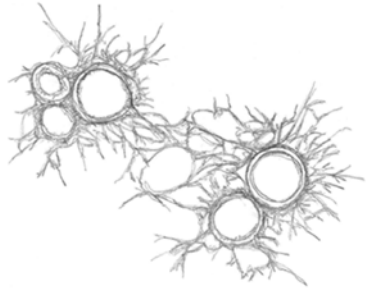
Abreviaturas

Abreviaturas

Angpt	Angiopoyetina
ATP	Adenosin trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma-2
BMDC	Células derivadas de la médula ósea
CAM	Molécula de adhesión celular
c-KIT	Stem cell factor receptor
CMC	Carboximetilcelulosa
CSF-1	Receptor tipo I de factor estimulador de colonia
Ct	Ciclo umbral
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Efna	Efrina
EMT	Transición epitelio mesénquima
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 2
FLT3	Por sus siglas en inglés, Fms-like tyrosine kinase 3
g	Gramo
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GBM:	Glioblastoma multiforme
GFP	Proteína verde fluorescente

GIST	Tumor del estroma gastrointestinal
Gusb	Beta-glucouronidasa
H&E	Hematoxilina-eosina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
Hprt1	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa 1
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
LDA	Low Density Array
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
mg	Miligramo
MIP	Promotor de ratón de la insulina
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mmHg	Miligramos de mercurio
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MT1-MMP	Metaloproteinasa de matriz tipo 1 (también MMP14)
Mrpl19	Proteína mitocondrial L19
NCAM	Neural cell adhesion molecule
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
NRG	Neurregulina
NRP	Neuropilina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM	Molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales
Pg	Picogramos
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinasa

PIGF	Factor de crecimiento placentario
Pmol	Picomol
Ppia	Peptidil-prolil isomerasa A
PRb	Proteína retinoblastoma
RET	Receptor del factor neutrófico derivado de la línea celular glial
RIP	Promotor de rata de la insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe Combined Immuno Deficient
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis
Sema4D	Semaforina 4D
SPF	Zona libre de patógenos (Specific Patogen Free)
STAT	Transductor de señal y activador de proteínas de transducción
SV40	Virus de simio 40
Tag	Antígeno T (T-antigen)
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tie	Receptor tirosina quinasa específico de célula endotelial
TSP-1	trombospondina 1
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial
WT	Salvaje (wild type)
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar



Introducción

ANGIOGÉNESIS

El límite para la difusión de oxígeno en los tejidos se halla entre 100 y 200 μm (Folkman, 1971). Más allá de esta distancia las células necesitan crear nuevos vasos para la obtención de oxígeno y nutrientes para su supervivencia (Carmeliet and Jain, 2000).

La formación de nuevos vasos puede producirse mediante diferentes procesos. En el desarrollo temprano del embrión el proceso de formación de vasos es denominado vasculogénesis (Yancopoulos et al., 2000). En la vasculogénesis las células precursoras indiferenciadas o angioblastos sufren un proceso de proliferación y diferenciación *in situ* que acabará formando una red de túbulos primitivos. En esta red primaria, se observan los grandes vasos como la aorta y venas de gran calibre. A continuación mediante la angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, esta red primaria es modificada para formar una red de vasos interconectados característicos de la vasculatura madura.

La angiogénesis fisiológica es limitada, está estrictamente regulada y es fundamental durante la reproducción y el desarrollo embrionario. En la vida postnatal y adulta, la angiogénesis es el único proceso por el cual se pueden formar nuevos vasos, siendo esencial en la reparación de heridas y en el ciclo reproductivo femenino (Kerbel, 2000). Pero la desregulación de este proceso da lugar a la angiogénesis patológica, que suele ser persistente y comporta el crecimiento y progresión de neoplasias, procesos inflamatorios crónicos, como la enfermedad de Crohn, la destrucción de cartílago en la artritis reumatoide o la ceguera en la diabetes entre muchos otros procesos patológicos.

La angiogénesis tiene lugar en 4 fases:

a) Fase inicial: se caracteriza por un incremento de la permeabilidad a proteínas y vasodilatación.

b) Fase de progresión: donde se produce la degradación y remodelación de la matriz extracelular por parte de proteasas liberadas desde las células endoteliales, la migración y proliferación de las células endoteliales y la interacción con las integrinas de la matriz.

c) Fase de diferenciación: incluye cambios en la morfología de las células endoteliales para alcanzar una estructura tubular o luminal.

d) Fase de estabilización y maduración: caracterizada por el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas y el depósito de nuevas proteínas de la matriz.

En todo este proceso se mantiene un estricto equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis. La ruptura de este equilibrio dará lugar a la persistencia de la neovascularización que caracteriza la angiogénesis patológica.

Angiogénesis tumoral

La angiogénesis es reconocida como un proceso fundamental y crítico para el crecimiento de tumores sólidos y el desarrollo de metástasis. Gimbrone y colaboradores en 1972 demostraron que el proceso de angiogénesis era necesario para el crecimiento de fragmentos de tumor o de grupos de células tumorales implantadas en un tejido avascular como la córnea. Dichos implantes eran neovascularizados desde el limbo esclerocorneal, y su inhibición era capaz de detener el crecimiento tumoral (Gimbrone et al., 1972).

Posteriormente se observó que todo tumor que excede de 2-3 mm de grosor necesita la creación de nuevos vasos para su nutrición (Folkman and Klagsbrun, 1987).

El proceso de angiogénesis se produce en la periferia de la lesión tumoral y está constituida por células normales derivadas del huésped (Weidner, 1993). Esta zona de vasos neoformados es infiltrada posteriormente por las células tumorales.

Fenómeno del *switch* angiogénico (o interruptor angiogénico)

Cuando las células progresan hacia el fenotipo tumoral adquieren dos características fundamentales:

- La capacidad de multiplicarse sin restricciones
- La capacidad de crear un medio favorable para la nutrición de la población tumoral en crecimiento (Carmeliet and Jain, 2000).

En condiciones de normalidad las células son fundamentalmente antiangiogénicas: producen gran cantidad de sustancias inhibitoras de la angiogénesis, así como una escasa cantidad de moléculas inductoras (Bouck, 1996).

En el proceso de adquisición del fenotipo tumoral, las células crean su propio medio favorable al crecimiento y nutrición celular, mediante la producción de factores angiogénicos debido a la activación de diversos oncogenes. Simultáneamente se produce una disminución en la síntesis de factores antiangiogénicos a causa de la pérdida o inactivación de genes supresores tumorales. El balance final será la estimulación de la angiogénesis que favorecerá el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis a distancia.

Los tumores se desarrollan a partir de tejidos normales donde no suele existir una actividad angiogénica significativa, y donde los vasos se hallan en un estado quiescente. Así, encontramos un equilibrio entre factores inductores de la angiogénesis y factores inhibidores que, en el tejido normal, se mantiene a favor de un predominio de la inhibición.

Cuando las células normales progresan al fenotipo tumoral, este equilibrio cambia hacia un predominio de sustancias proangiogénicas o estimuladoras de la angiogénesis (Bouck, 1996). Este cambio se produce por dos mecanismos principalmente (figura 1):

- Por una disminución de factores inhibidores de la angiogénesis.
- Por un aumento de factores proangiogénicos.

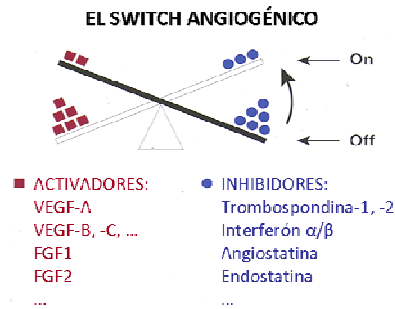


Figura 1. Fenómeno del *switch* angiogénico. Representación esquemática sobre la hipótesis de la existencia de un equilibrio entre sustancias proangiogénicas y antiangiogénicas, y el inicio del proceso de angiogénesis. Figura modificada de Hanahan & Folkman, *Cell*, 1996.

Las células tumorales utilizan ambos mecanismos para favorecer el desarrollo de nuevos vasos (Dameron et al., 1994). En estudios *in vitro* se ha observado que la estimulación de la proliferación de células endoteliales y el quimiotactismo generados por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), se inhiben al incrementar la presencia en el medio del inhibidor trombospondina 1 (TSP-1) (Good et al., 1990; Rastinejad et al., 1989). Esto sugiere que cuando los niveles del inhibidor son suficientemente altos las señales estimuladoras de la angiogénesis son sobrepasadas, y el equilibrio se desplaza hacia una inhibición del proceso.

Los tumores producen diversos factores angiogénicos que actúan en los receptores de pequeños vasos que rodean a las células tumorales (Folkman, 1987). A su vez la célula endotelial activada promueve su propio crecimiento y la neoformación vascular.

Además de la síntesis de factores angiogénicos las células tumorales atraen la formación de nuevos vasos mediante los siguientes mecanismos:

- a) Elaboración de enzimas de digestión de la matriz extracelular: permiten la liberación de factores angiogénicos secuestrados en el medio y facilitan la invasión por parte de nuevos vasos (Cherrington et al., 2000).
- b) Producción de factores quimiotácticos: atraen a macrófagos, mastocitos y linfocitos, que mediante su estimulación producen a su vez mayor cantidad de sustancias proangiogénicas (Carron et al., 1998).
- c) Estimulación de los fibroblastos del estroma: también sintetizan factores proangiogénicos.

Factores reguladores de la angiogénesis tumoral

Un factor angiogénico es un factor que selectivamente altera las características de las células endoteliales y estructuras perivasculares asociadas (pericitos, células musculares lisas de las paredes vasculares, etc.) pero no afecta la función de otros tipos celulares.

En condiciones de normalidad, en las células encontramos tanto factores proangiogénicos como factores antiangiogénicos naturales:

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF): Es el principal factor iniciador de la angiogénesis tumoral. Se han descrito seis miembros de la familia VEGF: VEGF-A, -B, -C, -D, -E y PlGF. El principal inductor de la angiogénesis es VEGF-A, que comúnmente se le conoce como VEGF (Ferrara, 2002; Hicklin and Ellis, 2005), y del cual existen cuatro isoformas que se generan por splicing alternativo (VEGF 165, VEGF 121, VEGF 189 y VEGF 206). VEGF 165 es la isoforma molecular predominante, y se encuentra, al igual que VEGF 121, en forma libre y soluble en el medio. En contraste, las formas de mayor peso molecular (VEGF 189 y VEGF 206) se encuentran secuestradas en la matriz extracelular y son liberadas y solubles por la acción de sustancias como la heparina o la plasmina (Park et al., 1993).

VEGF se expresa en muchos tipos de tumores humanos, y su elevada expresión está asociada a un peor pronóstico. El incremento en la expresión de

VEGF puede deberse a diversos factores, como la hipoxia, el pH, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas sexuales. Factores genéticos también pueden estar implicados en el incremento de expresión de VEGF, como la activación de distintos oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores (Kerbel and Folkman, 2002).

Los miembros de la familia de VEGF tienen la capacidad de unirse a tres receptores tirosina quinasa: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4) (figura 2). VEGF se une principalmente a VEGFR1 y VEGFR2. Ambos se localizan en el endotelio vascular y muestran gran afinidad por VEGF. Constan de un dominio extracelular, constituido por siete dominios inmunoglobulínicos, una región transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Shibuya et al., 1990; Terman et al., 1990). VEGFR3 se encuentra exclusivamente en el endotelio de vasos linfáticos y no muestra afinidad por VEGF (Pajusola et al., 1992).

La unión de VEGF a su receptor produce su dimerización con otro miembro de la familia de receptores. Posteriormente, se produce la autofosforilación de residuos tirosina en el dominio intracelular del receptor (Neufeld et al., 1999). Estas fosfotirosinas sirven de unión para otros sustratos, iniciando una cascada de señales intracelulares, que modulan la activación de varias proteínas de señales de transducción, como la proteína quinasa mitógeno-activada (MAPK), que favorece la transcripción genética e induce múltiples respuestas celulares que incluyen alteraciones de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y acciones sobre el crecimiento celular (Guo et al., 1995).

Diversos estudios han demostrado que VEGFR1 y VEGFR2 producen diferentes señales de transducción (Seetharam et al., 1995; Waltenberger et al., 1994), y que es VEGFR2 el principal receptor y el necesario para que VEGF produzca sus efectos mitógenos y de quimiotaxis. Así, VEGFR2 tiene una importancia crítica para que VEGF pueda desarrollar sus acciones biológicas, mientras que el papel de VEGFR1 en la angiogénesis está menos claro.

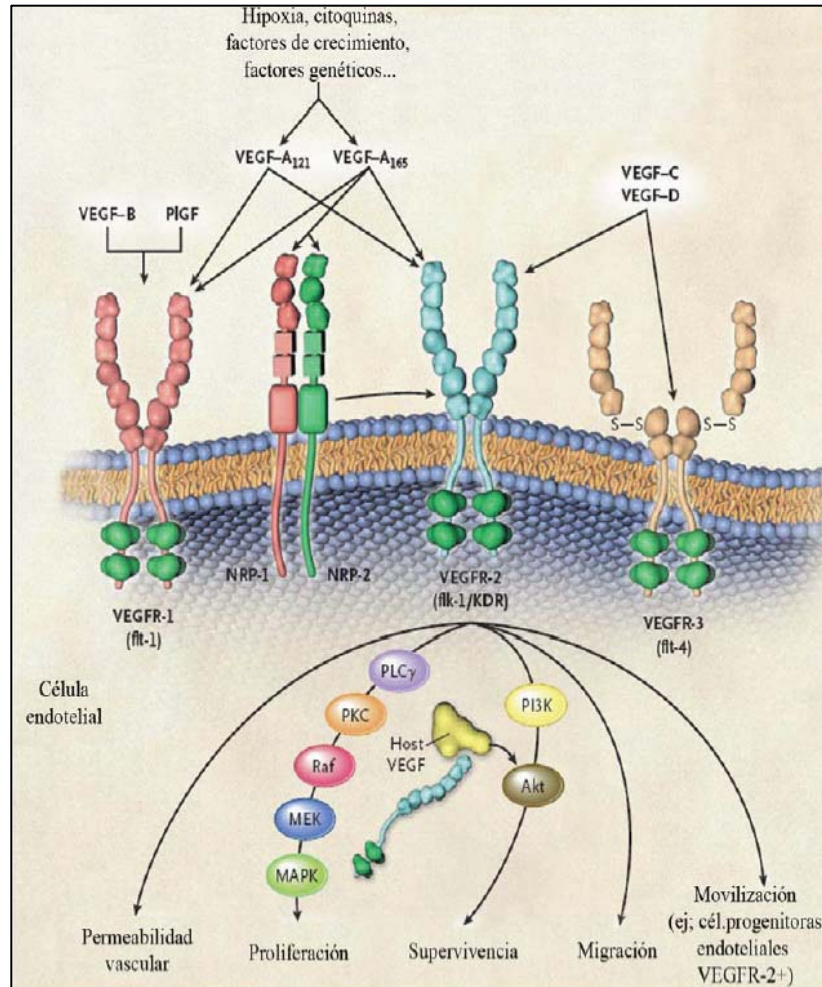


Figura 2. La familia de VEGF. El principal factor proangiogénico, VEGF-A, comúnmente conocido como VEGF, ejerce su función principalmente a través del receptor VEGFR2. VEGF se expresa en la mayoría de tumores humanos y un incremento en su expresión se asocia con un peor pronóstico. La unión VEGF-VEGFR2 induce la dimerización del receptor que promueve una cascada de señalización que activa diferentes vías, como la proliferación y la migración de las células endoteliales, su supervivencia o un incremento de la permeabilidad vascular. VEGF también puede unirse a los receptores neuropilinas (NRP) que actúan como co-receptores con VEGFR2 en la regulación de la angiogénesis. Figura modificada de Kerbel, N Engl J Med. 2008

Mediante su unión con VEGFR2, el VEGF contribuye a la vasodilatación inicial mediada por óxido nítrico, aumenta la permeabilidad vascular, estimula la proliferación y migración de las células endoteliales y disminuye la apoptosis. Además, a través del estímulo de la síntesis de los activadores del plasminógeno, interviene en el remodelado de la matriz perivasculare (Dvorak et al., 1995; Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Shibuya and Claesson-Welsh, 2006). Comúnmente el efecto de VEGF se atribuye a un mecanismo paracrino, ya que las células tumorales producen VEGF, y son las células endoteliales las que expresan el receptor en su superficie celular. Sin embargo, VEGF puede actuar en algunos casos de manera autocrina, ya que determinadas células tumorales además de producir VEGF, expresan de forma aberrante sus receptores, especialmente VEGFR1. Por último, también se ha descrito un efecto intracrino de VEGF, en aquellos casos en los que VEGFR se expresa en el interior de la célula. En estos casos, la activación del receptor induce la supervivencia de la célula endotelial (Kerbel, 2008).

Además de la unión a los receptores VEGFR, VEGF puede unirse a las neuropilinas (NRP1 y NRP2). Se trata de receptores sin actividad enzimática, pero cuya expresión es necesaria para la angiogénesis, ya que actúan como coreceptores, presentando el VEGF a su receptor VEGFR2 (Kawasaki et al., 1999; Neufeld et al., 2002).

Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2): Se trata de otro factor promotor de la angiogénesis que a través de la unión con su receptor FGFR promueve y regula la migración de las células endoteliales pero no su proliferación. También presenta un efecto antiapoptótico, ya que induce la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o survivina (Chavakis and Dimmeler, 2002).

FGF2 también ejerce diversos efectos sobre las células endoteliales, estimulando la expresión de VEGF de forma autocrina y paracrina, aunque también es capaz de estimular la angiogénesis por mecanismos VEGF independientes (Seghezzi et al., 1998). Además FGF2 puede modificar la morfología del endotelio

mediante la producción de las integrinas $\alpha v\beta 3$ (Sepp et al., 1994) y $\alpha\beta 2$ (Enestein et al., 1992), que son muy importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.

Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF): Se trata de otra familia con una importante función proangiogénica. Las células murales (pericitos y células musculares lisas) juegan un papel fundamental en la maduración, remodelación y mantenimiento de la vasculatura, ya que se encuentran envolviendo a las células endoteliales proporcionando estabilización a la vasculatura (Allt and Lawrenson, 2001). El reclutamiento de pericitos para formar las paredes de los nuevos vasos es un proceso crucial durante la fase de maduración de la vasculatura, y es llevado a cabo por distintos factores, el principal de los cuales es PDGF (Gullberg et al., 2004).

La familia de PDGF consta de cuatro miembros: PDGFA, -B, -C y -D, que pueden ser producidos por distintos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales. Actúan en forma de homodímeros (PDGF-AA, -BB, -CC, -DD) o heterodímeros (PDGF-AB), uniéndose a sus receptores tirosina quinasa PDGFR- α y PDGFR- β (Fredriksson et al., 2004). PDGFR es expresado por las células murales. La interacción ligando-receptor induce la dimerización del receptor en forma de homodímeros o heterodímeros, y la posterior activación de una cascada intracelular de señales que son cruciales para la estabilización de la vasculatura a través del reclutamiento de pericitos (Erber et al., 2004).

Angiopoyetinas: Representan otra familia importante de factores reguladores de la angiogénesis. Las más decisivas son la Angiopoyetina 1 (Angpt1) y la angiopoyetina 2 (Angpt2), que se unen al receptor de tipo tirosina quinasa Tie2 presente principalmente en las células endoteliales, induciendo efectos contrarios (Hanahan, 1997; Oliner et al., 2004). Angpt1, expresada por diferentes tipos celulares, actúa como agonista del receptor, estimulando su activación y favoreciendo así la estabilización de la vasculatura. Angpt1 también es requerida para la remodelación

y maduración de los vasos neoformados. Se ha demostrado que en ausencia de Angpt1 las células endoteliales no son capaces de asociarse e interactuar con células de soporte, como los pericitos, impidiendo la estabilización de los vasos neoformados (Suri et al., 1996). Después de la maduración vascular la Angpt1 continua siendo importante para mantener los vasos estables en estado quiescente. El cese de las señales estables coincide con el reinicio del proceso de remodelación vascular que se da en algunos tejidos del adulto o en tumores.

La unión de Angpt2 a Tie2 impide que Angpt1 pueda unirse y activar al receptor. Por lo tanto, Angpt2 actuaría como un inhibidor competitivo de Angpt1. Sin embargo, se ha descrito que las consecuencias del efecto de Angpt2 en la angiogénesis dependen de la presencia o no de VEGF. Así, en presencia de VEGF, Angpt2 tiene un efecto proangiogénico promoviendo la proliferación y migración de las células endoteliales, mientras que en ausencia de VEGF, la Angpt2 puede conducir a la apoptosis y a la regresión vascular (Hanahan, 1997; Maisonpierre et al., 1997; Oliner et al., 2004).

Trombospondina-1 (TSP-1): Se trata de una proteína secretada por la mayoría de células epiteliales capaz de actuar como un inhibidor multifuncional de la angiogénesis. Tiene efectos directos sobre las células endoteliales vía el receptor de membrana CD36, inhibiendo la migración y la movilización de factores de crecimiento, e induciendo la apoptosis. De esta manera TSP-1 atenúa significativamente la progresión tumoral y la metástasis (Jimenez and Volpert, 2001).

Factores implicados en guiar la formación de nuevos vasos

Durante la última década se ha observado que moléculas implicadas en guiar los axones en el sistema nervioso durante el desarrollo juegan también un importante papel en el desarrollo de los vasos sanguíneos. Ahora se conoce que proteínas implicadas en transmitir las señales de guía axónica entre las que se incluyen miembros de las familias de las netrinas, slit, efrinas y semaforinas (figura

3), son también ampliamente expresados fuera del sistema nervioso y desarrollan importantes funciones durante la guía de nuevos vasos sanguíneos y como precursores endoteliales durante el desarrollo de los nuevos vasos (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005).

De entre todas ellas, en este trabajo hemos centrado nuestra atención especialmente en la familia de las semaforinas, en concreto en la Semaforina 4D (Sema4D).

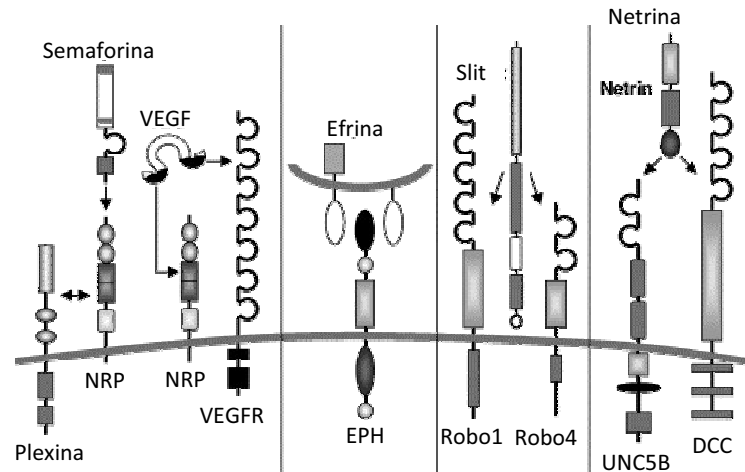


Figura 3. Principales familias de proteínas implicadas en la guía axónica que participan en la angiogénesis. Miembros de estas familias de proteínas, además de actuar en el sistema nervioso, se expresan ampliamente en otros tejidos, y tienen un importante papel en el desarrollo de nuevos vasos.

Figura extraída de Klagsbrun & Eichmann, Cytokine Growth Factor Rev, 2005.

La familia de las semaforinas

Las semaforinas son una gran familia de proteínas que se encuentran solubles o ancladas a membrana, que se describieron inicialmente por su relación con el desarrollo del sistema nervioso central y los mecanismos de la guía axónica. Actualmente se han identificado más de 20 tipos diferentes de semaforinas, que han sido agrupadas en 8 clases diferentes: las clases 1 y 2 las encontramos en

invertebrados, las clases 3-7 son propias de vertebrados, y una octava clase (la clase V) ha sido identificada en virus (Kolodkin et al., 1993).

En los últimos años las semaforinas se han relacionado con la regulación de la adhesión y la motilidad celular, el sistema inmune, la angiogénesis y la progresión tumoral. También se han implicado en funciones opuestas en cáncer: como supresores tumorales y factores antiangiogénicos, o como mediadores de la angiogénesis tumoral, la invasión y la metástasis. Parece ser que las semaforinas pueden jugar distintos papeles en los diferentes tipos celulares.

Este gran abanico de funciones puede ser explicado gracias a su unión con varios receptores, que pueden activar múltiples vías de señalización en diferentes tipos de células o de etapas funcionales (Rizzolio and Tamagnone, 2007).

Las plexinas son los receptores de alta afinidad para las semaforinas, aunque existen ciertas semaforinas que necesitan de co-receptores (las neuropilinas) para que la señalización de las plexinas sea completa. Además de las plexinas y las neuropilinas se han descrito otras moléculas de membrana a las que se unen las semaforinas pero con una menor afinidad.

Se han descrito diversos miembros de la familia de las semaforinas como posibles reguladores de la migración de las células endoteliales y la angiogénesis: Semaforina 3A, 3F, 3E, 4A y 6A pueden inhibir la angiogénesis (Dhanabal et al., 2005; Neufeld et al., 2005; Serini et al., 2003; Toyofuku et al., 2007). Además ciertas semaforinas pueden competir con el VEGF para unirse con las neuropilinas (Kawasaki et al., 1999; Miao et al., 1999; Soker et al., 2002). Por otro lado se ha observado que la Semaforina 4D es un factor proangiogénico secretado por las células tumorales humanas (vía fragmentación mediada por las metaloproteinasas de matriz (MMP)) y su actividad se ha visto involucrada en el crecimiento tumoral (Basile et al., 2006; Basile et al., 2007; Conrotto et al., 2005).

Además se ha comprobado que la semaforinas 4D y 7A inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los monocitos, lo que puede implicar que ciertas clases de semaforinas puedan tener un papel importante en la respuesta inflamatoria (Kikutani and Kumanogoh, 2003).

El papel de Semaforina 4D como promotora de la angiogénesis y la invasión tumoral

Semaforina 4D (Sema4D) es una proteína transmembrana de 150 kDa perteneciente a la clase IV de la subfamilia de las semaforinas, que se puede escindir para crear una forma soluble de 120 kDa, lo que nos indica dos posibles isoformas de Sema4D (Delaire et al., 2001; Herold et al., 1995).

Se conocen dos receptores para Sema4D: el receptor de alta afinidad, Plexina B1; y un receptor de baja afinidad, CD72, que se expresa principalmente en las células del sistema inmune (Kumanogoh et al., 2000).

Plexina B1 se encuentra ampliamente expresada en las células endoteliales y promueve la migración y la tubulogénesis cuando se une a Sema4D (Basile et al., 2004; Conrotto et al., 2005). Se ha observado que Sema4D está altamente expresada en la mayoría de los tumores sólidos más frecuentes, incluyendo tumores de mama, próstata y colon (Basile et al., 2006). Además, se ha comprobado que los macrófagos asociados a tumores (TAMs), ampliamente involucrados en la invasión tumoral y la angiogénesis así como en la diseminación metastásica (Dirkx et al., 2006) son una rica fuente de Sema4D en el estroma tumoral, y se ha descrito que esta habilidad para producir Sema4D es crucial para que se lleve a cabo la angiogénesis tumoral y la maduración de los vasos (Sierra et al., 2008). Esto sugiere que las semaforinas de clase IV pueden estar regulando la angiogénesis *in vivo*, y plantean la posibilidad que Sema4D pueda jugar un papel en la inducción de la angiogénesis tumoral. Pero para que se produzca dicha función proangiogénica, Sema4D, una proteína anclada a membrana, debe ser procesada y

liberada en su forma soluble para actuar de manera paracrina en las células endoteliales (Basile et al., 2007) (figura 4).

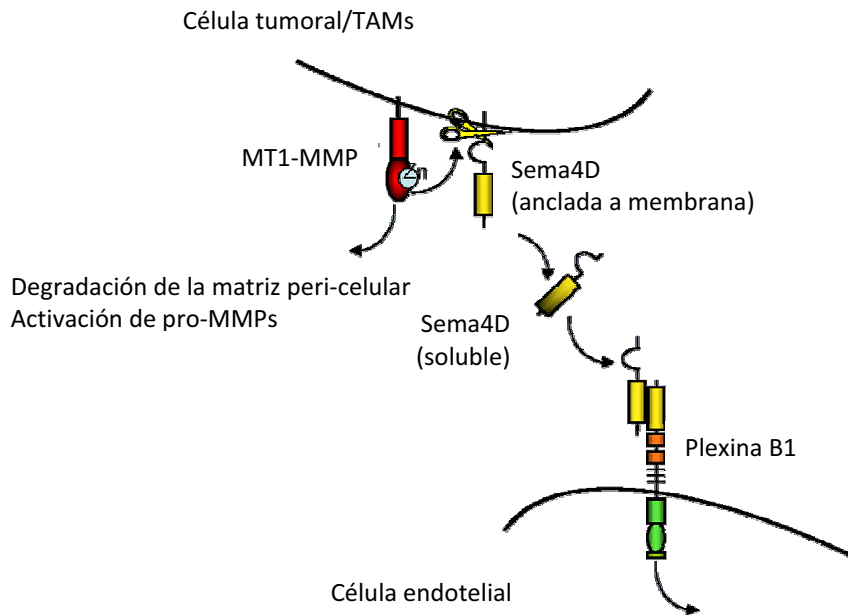


Figura 4. Modelo de estimulación de Plexina B1 que promueve una respuesta angiogénica. La MT1-MMP expresada en la superficie de las células tumorales escinde la Sema4D anclada a la membrana, que se podrá unir a la Plexina B1 presente en las células endoteliales, lo que iniciará una respuesta angiogénica. Figura modificada de Basile et al, JBC, 2007.

Aunque Sema4D se expresa en la superficie de las células tumorales como un homodímero, también se ha observado su presencia como proteína soluble en el ambiente tumoral gracias a la escisión proteolítica. La proteasa responsable de su escisión es la metaloproteínasa de matriz de membrana tipo 1 (MT1-MMP, también conocida como MMP14) (Basile et al., 2007; Elhabazi et al., 2001).

De esta manera, la forma soluble de Sema4D actúa a través de la Plexina B1 presente en la membrana de las células endoteliales, facilitando la supervivencia y el crecimiento tumoral gracias a la promoción de la angiogénesis (Basile et al., 2006).

Sema4D y Plexina B1 comparten homología estructural con los receptores de tipo *scatter factors*, una familia de receptores transmembrana con actividad quinasa. Dentro de esta familia, encontramos el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), codificado por el gen *Met* (Bottaro et al., 1991). La unión de HGF con su receptor (Met), provoca su activación, promoviendo varios procesos celulares, entre los que cabe destacar la morfogénesis epitelial (Sonnenberg et al., 1993; Weidner et al., 1993) y la migración de precursores miogénicos en el desarrollo embrionario (Bladt et al., 1995), la supervivencia y la proliferación de diferentes tipos neuronales (Maina and Klein, 1999), y, notablemente, la migración y proliferación de las células endoteliales y su organización en nuevos vasos durante el proceso angiogénico (Bussolino et al., 1992; Grant et al., 1993).

Se ha descrito que en células endoteliales Plexina B1 forma un complejo con Met, y que la activación de Plexina B1 mediante su unión con Sema4D, promueve la actividad tirosina quinasa de Met, aunque la fosforilación debida a la unión de Sema4D es más débil que la provocada por HGF. Así, Sema4D se puede considerar un agonista parcial de Met, lo que explica que en respuesta a Sema4D se produzca motilidad y morfogénesis de las células endoteliales, pero que no se promueva su proliferación (Conrotto et al., 2005). Entonces se puede considerar que Sema4D y HGF no tienen exactamente el mismo efecto en las células endoteliales, ya que HGF promueve la actividad mitogénica en las células endoteliales gracias a la activación de la vía de VEGF, mientras que Sema4D no ejerce ningún efecto sobre esta vía ni sobre la proliferación (Prat et al., 1998).

Además de éstos efectos pro-angiogénicos, varios estudios han concluido que la unión de Plexina B1 y Sema4D regula la función de las integrinas, que son receptores de membrana heterodiméricos que anclan las células a la matriz extracelular (Halloran and Wolman, 2006; Serini et al., 2008). La acción de las integrinas es esencial para activar vías de señalización intracelular que controlan importantes funciones como el crecimiento celular y la supervivencia, apoptosis y motilidad (Hanahan and Weinberg, 2000). Los mecanismos moleculares por los cuales la señalización de las semaforinas acaba regulando las integrinas aún se desconocen.

Se ha descrito que Plexina B1 tiene actividad intrínseca GAP (del inglés GTPase-activating protein), por lo que puede actuar con la GTPasa monomérica R-Ras, que sostiene la activación de las integrinas (Oinuma et al., 2004). Tras la unión de Sema4D, Plexina B1 inactiva R-Ras, inhibiendo así la adhesión mediada por las integrinas entre otras funciones (figura 5).

Plexina B1 también puede regular la activación de la GTPasa RhoA en respuesta a su unión con Sema4D. En esta línea se ha observado que la respuesta migratoria y proangiogénica promovida por la señalización de Sema4D en las células endoteliales es dependiente de la habilidad de Plexina-B1 para estimular RhoA (Barberis et al., 2005; Casazza et al., 2007). Debido a que la adhesión mediada por integrinas y la acción de las GTPasas monoméricas son fenómenos clave en la motilidad celular, la activación de la Plexina B1 frecuentemente conlleva la inhibición de la migración direccional, también descrita como “repulsión” celular, cuando estas señales migratorias se localizan en áreas específicas (Capparuccia and Tamagnone, 2009).

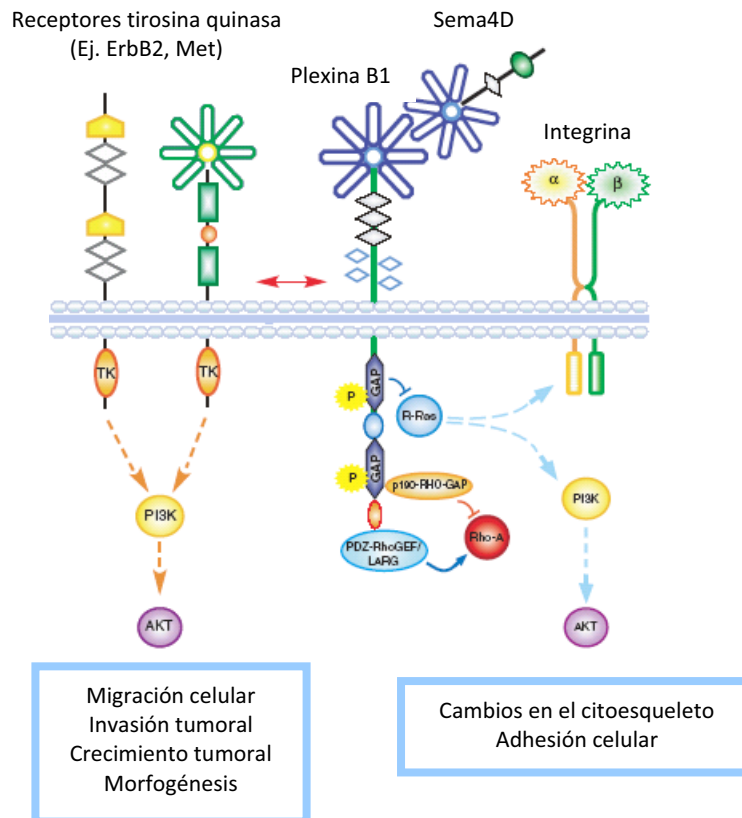


Figura 5. Vía de señalización tras la unión de Sema4D y Plexina B1. Plexina B1 puede promover varias vías de señalización intracelular, dependiendo del receptor celular con que se asocie. Además también pueden regular la función de integrinas y la dinámica del citoesqueleto gracias a la actividad intrínseca de las GAPs R-Ras, y el reclutamiento de moléculas que interaccionan con RhoA, afectando la migración y adhesión celular. Estas interacciones pueden activar respuestas opuestas dependiendo de la activación de diferentes vías en distintos tipos celulares.

Figura modificada de Capparuccia & Tamagnone, J Cell Sci, 2009.

Estructura y función de los vasos tumorales

Los vasos neoformados tumorales difieren en algunos aspectos respecto de los vasos del tejido normal adyacente. Son más permeables al paso de sustancias,

como lo demuestran diversos estudios ultraestructurales, que evidencian un mayor número de fenestraciones, aberturas y vesículas, mostrando membranas basales discontinuas o incluso ausentes (Dvorak et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998) (figura 6). Suelen tener una morfología aberrante, con formación de ángulos rectos, y un gran número de dilataciones que producen áreas de intensa hipoxia y pHs ácidos (Helmlinger et al., 1997). Estas zonas contribuyen a disminuir la eficacia en la llegada de drogas antiangiogénicas y seleccionan clones de células tumorales resistentes a la hipoxia (Giaccia, 1996).

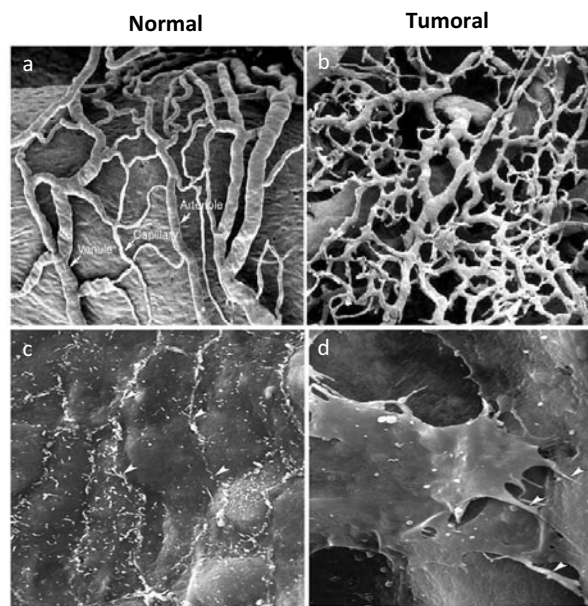


Figura 6. Diferencias entre vasos y células endoteliales normales y tumorales. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. Los paneles superiores muestran la estructura de vasos normales (a) y tumorales (b), donde podemos apreciar las formas mucho más tortuosas que adoptan los vasos tumorales. En las imágenes inferiores se observan micrografías que comparan la superficie luminal del vaso normal (c), con uniones estrechas entre las células endoteliales, y la superficie de los vasos tumorales (d), que han visto ampliados los espacios intercelulares, con células endoteliales superpuestas.

Figura extraída de McDonald & Choyke, Nat Med, 2003.

La pared de los vasos tumorales es un mosaico celular, formado en parte por células endoteliales y por células tumorales. Este hecho tiene importantes implicaciones en el desarrollo de metástasis, ya que las células tumorales tienen un acceso fácil al torrente circulatorio. Además, en la mayor parte de vasos tumorales falta la capa de células perivasculares que contribuyen a la estabilización y maduración vascular, y que permiten acomodar el flujo sanguíneo según las necesidades metabólicas.

Se ha revelado una escasa presencia de pericitos y células musculares lisas en los vasos tumorales. Además existe una gran heterogeneidad en los distintos tipos tumorales respecto a la presencia de células periendotheliales: mientras que en un estudio de glioblastoma se observó que el índice de asociación de pericitos con la microvasculatura era del 23% en el cáncer de mama fue del 67% (Eberhard et al., 2000). Se atribuyen a los pericitos funciones en la estabilización de los vasos neoformados. Su presencia sería mayor en tumores de crecimiento lento y menor en tumores más agresivos.

Las células endoteliales tumorales también difieren de las células endoteliales de la vasculatura normal en su gran heterogeneidad. Así, en algunas zonas se observa una elevada proliferación celular, mientras que en otras zonas del tumor las células endoteliales sufren apoptosis, acompañando a zonas de necrosis y fenómenos de regresión vascular (Holash et al., 1999).

Las células endoteliales de los vasos tumorales se caracterizan por su inestabilidad, pasando de estados hiperproliferativos a la apoptosis y regresión vascular. Las bases moleculares y celulares de esta inestabilidad están poco definidas.

Por otro lado se observan alteraciones en la expresión de diversas moléculas de la superficie endotelial que alteran las interacciones con las células inflamatorias circulantes (Eliceiri and Cheresch, 1999; Huang et al., 1997).

TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS

La angiogénesis no inicia la neoplasia, pero promueve la progresión tumoral y la metástasis. En 1971 Judah Folkman propuso la inhibición de la angiogénesis como diana para el tratamiento del cáncer, y desde entonces se han ideado y desarrollado diferentes fármacos que tienen como principal diana las células endoteliales. Pero ha sido sobretodo durante la última década cuando se han realizado importantes esfuerzos en desarrollar estrategias terapéuticas para inhibir la angiogénesis en el cáncer.

A diferencia de las células tumorales, las células endoteliales son genéticamente estables y por esa razón fueron consideradas una diana terapéutica ideal que no presentaría resistencia a la terapia antiangiogénica.

La gran mayoría de agentes antiangiogénicos que se han ido desarrollando desde inicios de la década de los 90 iban dirigidos contra las células endoteliales, pero recientemente las terapias antiangiogénicas se están dirigiendo también contra los pericitos, ya que proporcionan señales de supervivencia y soporte estructural a las células endoteliales, contribuyendo a la maduración de la vasculatura (Carmeliet, 2003).

Han aparecido una gran variedad de agentes antiangiogénicos a lo largo de los últimos años, que van dirigidos contra la inmensa mayoría de tipos tumorales. Como ejemplo, la tabla de la figura 7, publicada en 2007, en la que podemos observar la gran variedad de tipos tumorales que están siendo objeto de estudio para recibir tratamiento con fármacos antiangiogénicos.

Estos fármacos se pueden clasificar según su mecanismo de acción en dos grupos: Anticuerpos monoclonales o inhibidores selectivos de la actividad quinasa (small-molecules tyrosine-kinase inhibitors) (figura 8).

Table 2 | Anti-angiogenic drugs approved for clinical use and phase of clinical trials for other indications

Drug (Trade name; company)	Approved*	Phase III	Phase II	Phase I
Bortezomib (Velcade; Millennium Pharmaceuticals)	Multiple myeloma (2003)	NSCLC, multiple myeloma, NHL	Multiple myeloma, NHL, NSCLC, lymphoma, gliomas, melanoma, Waldenstrom's macroglobinaemia, prostate, head and neck, breast, liver, nasopharyngeal, gastric, pancreatic, colorectal, cervical/vaginal cancer, and others	Lymphoma, myelodysplasia, multiple myeloma, NHL, solid tumours, head and neck, cervical, colorectal, ovarian, prostate cancer, and others
Thalidomide (Thalomid; Celgene Corporation)	Multiple myeloma (2003 [†])	Multiple myeloma, brain metastases, SCLC, NSCLC, prostate, kidney, ovarian, hepatocellular cancer	Soft tissue sarcoma, multiple myeloma, ALS, melanoma, neuroendocrine tumours, leukaemia, glioma, glioblastomas, paediatric neuroblastoma, NSCLC, NHL, paediatric solid tumours, myelofibrosis, myelodysplastic syndrome, AML, CLL, SCLC, Hodgkin's disease, paediatric brain stem, liver, colorectal, kidney, neuroendocrine, endometrial, thyroid, uterine, ovarian cancer, and others	Solid tumours, glioma
Bevacizumab (Avastin; Genentech)	Colorectal cancer (2004), lung cancer (2006)	NSCLC, GIST, diabetic retinopathy, vascular occlusions, retinopathy of prematurity, colorectal, breast, ovarian, peritoneal, pancreatic, prostate, kidney cancer	Glioblastoma, glioma, mesothelioma, NSCLC, AML, CLL, CML, lymphoma, angiosarcoma, melanoma, biliary tumours, SCLC, Kaposi's sarcoma, sarcomas, NHL, carcinoid, oesophagogastric, gastric, renal cell, head and neck, rectal, hepatocellular, bladder, pancreatic, gall bladder, breast, neuroendocrine, cervical, ovarian, endometrial cancer, and others	NSCLC, pancreatic, solid tumours, head and neck tumours, VHL, retinal tumours
Erlotinib (Tarceva; Genentech, OSI Pharmaceuticals, Roche)	Lung cancer (2004)	NSCLC, colorectal, pancreatic, ovarian, head and neck, oral cancer	NSCLC, mesothelioma, glioblastoma, glioma, gall bladder, GIST, biliary tumours, bladder cancer prevention, malignant peripheral nerve sheath tumours, endometrial, colorectal, pancreatic, breast, renal cell, prostate, ovarian, head and neck, gastric/oesophageal, liver cancer, and others	NSCLC, glioblastoma, solid tumours, colorectal, pancreatic, head and neck cancer
Pegaptanib (Macugen; OSI Pharmaceuticals)	Age-related macular degeneration (2004)			
Endostatin (Endostar)	Lung cancer (2005 [‡])			
Sorafenib (Nexavar; Onyx Pharmaceuticals)	Kidney cancer (2005)	Kidney, melanoma, hepatocellular cancer	Melanoma, glioblastoma, GIST, SCLC, thyroid, neuroendocrine, mesothelioma, soft tissue sarcoma, NSCLC, CLL, multiple myeloma, cholangiocarcinoma, NHL, kidney, colorectal, prostate, ovarian, peritoneal, pancreatic, breast, gastric, head and neck, uterine, gall bladder, bladder cancer, and others	Solid tumours, melanoma, glioblastoma, NHL, glioma, multiple myeloma, Kaposi's sarcoma, ALL, CML, MDS
Lenalidomide (Revlimid; Celgene Corporation)	Myelodysplastic syndrome (2005)	Multiple myeloma, myelodysplastic syndrome	NSCLC, NHL, multiple myeloma, CLL, myelofibrosis, myelodysplastic syndrome, glioblastoma, ocular melanoma, AML, mantle-cell lymphoma, Waldenstrom's macroglobinaemia, ovarian/peritoneal, thyroid, prostate cancer	Multiple myeloma, prostate cancer, melanoma, myelodysplastic syndrome, solid tumours, paediatric CNS tumours
Sunitinib (Sutent; Pfizer)	GIST, kidney cancer (2006)	Renal cell cancer, GIST	Melanoma, VHL/solid tumour, NSCLC, GIST, hepatocellular, colorectal, prostate, breast, renal cell, gastric, neuroendocrine cancer, and others	Melanoma, solid tumours, colorectal, breast cancer
Ranibizumab (Lucentis; Genentech)	Age-related macular degeneration (2006)			

*Year of first approval by the US Food and Drug Administration, unless stated otherwise. [†]Australia, approved by US Food and Drug Administration in 2006. [‡]China State Food and Drug Administration. ALS, amyotrophic lateral sclerosis (or Lou Gehrig's disease); ALL, acute lymphoblastic leukaemia; AML, acute myeloid leukaemia; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; CNS, central nervous system; GIST, gastrointestinal stromal tumour; MDS, myelodysplastic syndromes; NSCLC, non-small-cell lung cancer; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; SCLC, small-cell lung cancer; VHL, von Hippel Lindau.

Figura 7. Tabla de fármacos antiangiogénicos aprobados en la clínica y en fase de ensayos clínicos. Tabla publicada en 2007 donde se observa la gran cantidad de tipos tumorales que están siendo diana en los estudios de nuevos fármacos antiangiogénicos.

Figura extraída de Folkman, Nat Rev Drug Disc, 2007.

Anticuerpos monoclonales: Tienen una acción directa y una indirecta. La acción directa consiste en bloquear el ligando o el receptor, el cual se puede internalizar dejando así de ejercer su función. La acción indirecta se encuentra mediada por el sistema inmune (activación del sistema del complemento, linfocitos citotóxicos y macrófagos) y contribuye a la destrucción de la célula tumoral.

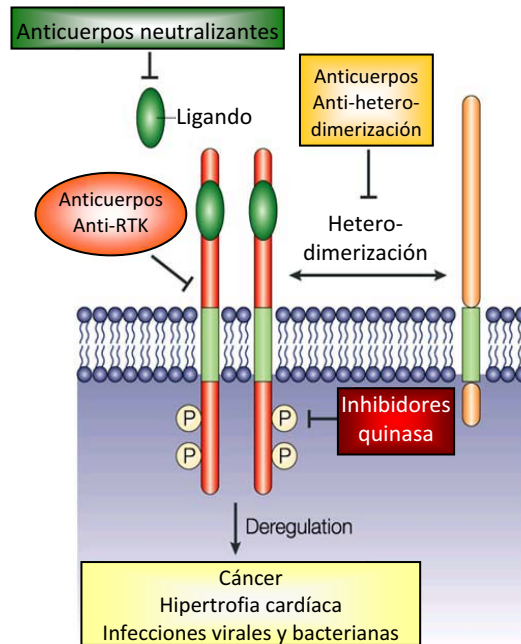


Figura 8. Mecanismos de acción de los fármacos antiangiogénicos. Representación de manera esquemática de los mecanismos para bloquear farmacológicamente un receptor tirosina quinasa: Mediante inhibidores del dominio y la actividad quinasa; o mediante anticuerpos monoclonales que neutralizan al receptor o a su ligando.
Figura modificada de Gschwind et al, Nat Rev Cancer, 2004.

En este grupo se encuentra el primer fármaco que demostró un claro efecto clínico aumentando la supervivencia en cáncer colorectal metastásico: el bevacizumab (Hurwitz et al., 2004).

Bevacizumab: Se trata de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se une a VEGF, evitando la interacción con sus receptores y, por lo tanto, la activación de las vías de señalización que éstos regulan. Bevacizumab fue aprobado por la FDA (Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos) en 2004 para el tratamiento del cáncer colorrectal, y en 2006 para el tratamiento del cáncer de pulmón. En la actualidad varios ensayos clínicos en fase II y III se están llevando a cabo en distintos tipos de tumores.

Inhibidores selectivos de la actividad quinasa: Compiten con el ATP por la unión al dominio catalítico de la proteína, bloqueando así su actividad quinasa. A finales de la década de los 80 este tipo de fármacos demostraron su uso potencial como agentes antiproliferativos, y desde entonces se ha desarrollado un importante número de inhibidores que actúan en diferentes vías y tipos celulares. Entre los que presentan actividad antiangiogénica, los inhibidores que mejor resultado han demostrado y que actualmente se están administrando en la clínica son el sunitinib y el sorafenib.

Sorafenib: Inhibidor oral multidiana de los receptores tirosina quinasa VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- β implicados en angiogénesis, y de la serina treonina quinasa Raf-1, implicada en proliferación celular (Wilhelm et al., 2004). En 2005 sorafenib fue aprobado para el tratamiento del carcinoma renal avanzado, y en 2007 para el tratamiento del carcinoma hepatocelular irreseccable.

Sunitinib: Inhibidor oral multidiana de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, con una potente actividad antitumoral y antiangiogénica. Sunitinib inhibe receptores tirosina quinasa implicados en angiogénesis y expresados por células endoteliales y murales como VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- α y PDGFR- β (Abrams et al., 2003a; Mendel et al., 2003). Por otro lado, también inhibe un conjunto de receptores implicados en proliferación y supervivencia celular

expresados en las células tumorales, como c-KIT (stem cell factor receptor), FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), CSF-1 (receptor tipo I de factor estimulador de colonia) y RET (receptor del factor neutrófico derivado de línea celular glial) (Abrams et al., 2003a; O'Farrell et al., 2003). Sunitinib fue aprobado por la FDA en enero de 2006 para el tratamiento de carcinoma renal de célula clara avanzado y para pacientes de GIST resistentes o intolerantes a Imatinib (Favre et al., 2007; Goodman et al., 2007).

Efectos del tratamiento antiangiogénico

Tras el tratamiento antiangiogénico se dan cambios morfológicos y biológicos en los tumores que son fácilmente observables. Entre éstos cambios se pueden destacar aquellos que reflejan un decremento del número de vasos y una reducción en el flujo sanguíneo en la parte central del tumor, los cuales han sido ampliamente descritos en la clínica (Demetri et al., 2006; Motzer et al., 2007).

Como consecuencia del tratamiento antiangiogénico se consiguen tres efectos: la regresión de la vasculatura tumoral, la normalización de los vasos existentes y la inhibición de la formación de nuevos vasos. La regresión vascular es el efecto más temprano que se observa (Willett et al., 2004). El proceso de normalización da lugar a una vasculatura más eficiente, ya que se reduce la permeabilidad y la presión intersticial, y esto mejora la distribución de la quimioterapia en el tumor (Jain, 2005; Kabbinar et al., 2005a).

Este comportamiento de los tumores tras recibir la terapia antiangiogénica se puede confundir con una no respuesta del tumor al tratamiento, ya que éstos cambios no siempre se traducen en variaciones en el diámetro de la neoplasia, lo que puede despistar en el momento de la evaluación de eficacia realizada mediante técnicas radiológicas.

Una de las características más comunes de la terapia con inhibidores de la angiogénesis es la rápida reducción de la densidad celular en la parte central del tumor, mientras que las zonas marginales se mantienen como áreas con tejido

tumoral bien vascularizado, formando una pseudo-cápsula en la interfase entre el tejido tumoral y el normal (figura 9).

El uso continuado de inhibidores de la angiogénesis puede prevenir la formación de nuevos vasos, mejorando la estabilización de la enfermedad y retrasando la progresión tumoral (Kabbinavar et al., 2005a; Kabbinavar et al., 2005b).

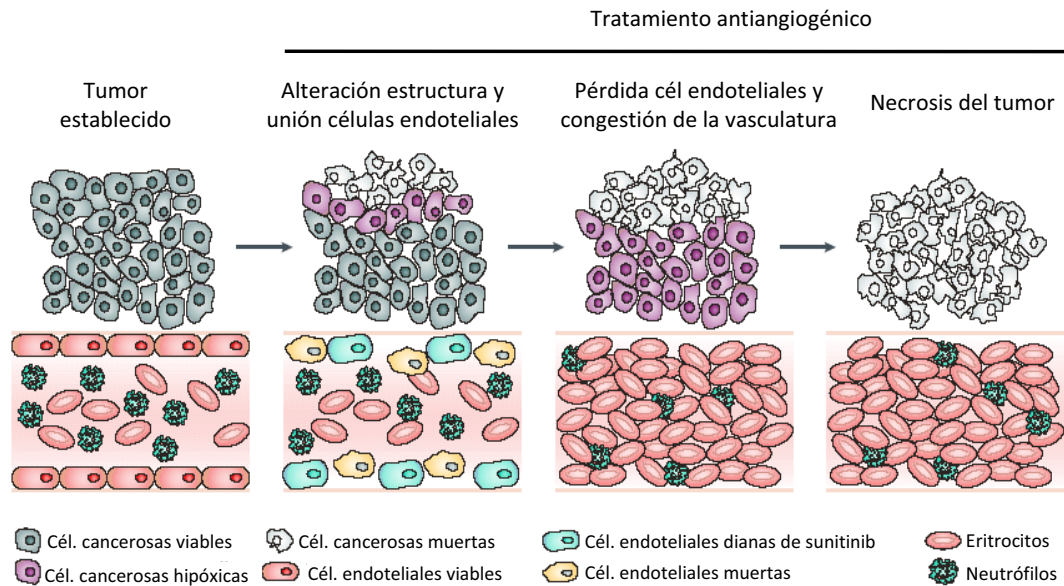


Figura 9. Efectos de los fármacos antiangiogénicos sobre las células endoteliales y tumorales. La exposición a agentes antiangiogénicos promueve una serie de alteraciones secuenciales en las células endoteliales que resulta en una congestión de la vasculatura y necrosis de la parte central del tumor. En un tumor establecido, mediante la angiogénesis se aporta oxígeno y nutrientes a las células tumorales. Tras la exposición a inhibidores de la angiogénesis se altera la morfología de las estructuras vasculares y se induce el desprendimiento de las células endoteliales del sustrato. La pérdida de las células endoteliales promueve la congestión de los vasos y reduce el flujo sanguíneo. Como resultado de la falta de oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes se produce necrosis. Figura modificada de Faivre et al, Nat Rev Drug Discov, 2007.

Ahora que algunos fármacos antiangiogénicos se han establecido en el tratamiento de enfermedad avanzada, irreseccable y/o metastásica en un amplio marco de tipos tumorales, en la clínica se ha empezado a estudiar como integrar estas terapias con los tratamientos loco-regionales tradicionales (como cirugía o radioterapia) de la manera más óptima. En pacientes con enfermedad avanzada la utilización de antiangiogénicos previamente a la cirugía podría facilitar la resección del tumor, mientras que utilizados como terapia post-operatoria podría eliminar o estabilizar la progresión de micrometástasis (Verhoef et al., 2006).

En algunos pacientes que se sometieron a cirugía para eliminar la enfermedad residual tras la terapia con un antiangiogénico, el examen patológico mostró una arquitectura tumoral muy heterogénea, que confirmaba la necrosis en la parte central envuelta por células tumorales viables y vasculatura funcional en los bordes del tumor. Tras varios periodos de exposición, algunos tumores recrecen a partir de las zonas más exteriores, sugiriendo que el borde del tumor es la primera zona que presenta evasión a la terapia antiangiogénica de los agentes anti-VEGF (Faivre et al., 2007).

Resistencia al tratamiento antiangiogénico

Los logros clínicos conseguidos con bevacizumab, sorafenib y sunitinib son muy relevantes y tienen gran importancia, pero no todos los datos obtenidos en el estudio con pacientes son altamente positivos: estos inhibidores de la vía de VEGF fracasan a la hora de producir respuestas clínicas duraderas en la mayoría de pacientes (Kindler et al., ; Saltz et al., 2007; Shojaei and Ferrara, 2007).

La introducción de la terapia antiangiogénica causa que los tumores paren o reduzcan su ritmo de crecimiento, e incluso en algunos casos, que se incremente la supervivencia de los pacientes. Pero inevitablemente, los tumores vuelven a crecer, reestableciendo la vasculatura inicialmente inhibida aunque los antiangiogénicos aún estén presente en el microambiente tumoral, demostrando que la angiogénesis

es un fenómeno elemental para que se de la progresión tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000).

El porqué de esta resistencia aún no se conoce, aunque parece que existen dos tipos de resistencia a las terapias dirigidas contra la vía de VEGF: La resistencia adaptativa (o evasiva) (figura 10); y la resistencia intrínseca (o preexistente), dónde los tumores no llegan a responder nunca al tratamiento (Bergers and Hanahan, 2008).

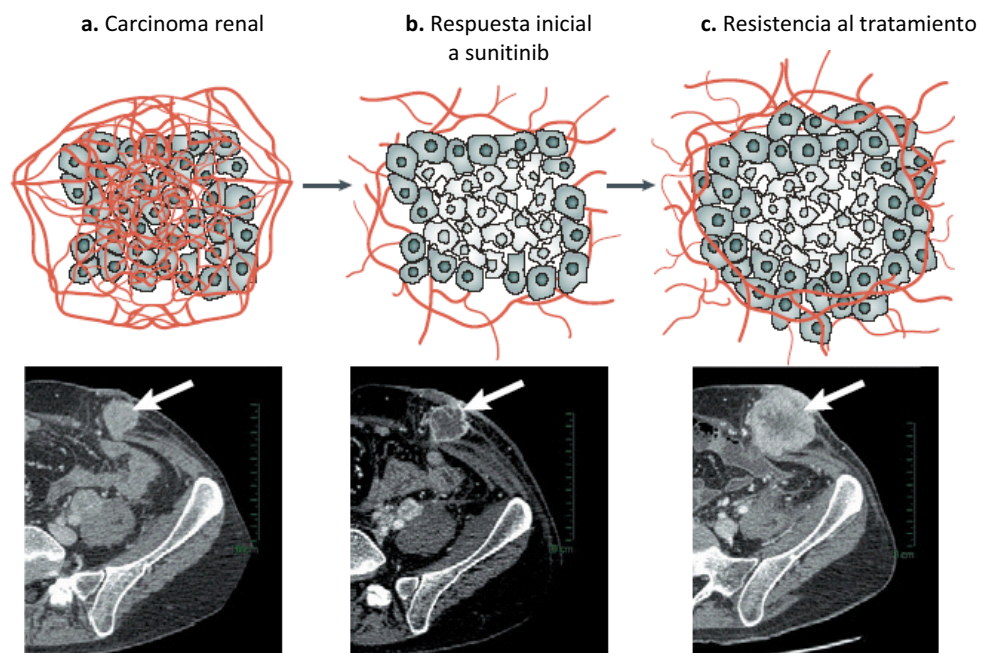


Figura 10. Resistencia a sunitinib. a. Antes del tratamiento con sunitinib se observa una metástasis subcutánea de un carcinoma renal altamente vascularizado. b. Sunitinib induce la necrosis de la parte central del tumor, pero la parte periférica se mantiene viable y bien vascularizada. c. La resistencia al tratamiento con sunitinib se podría iniciar desde la periferia del tumor, mediante el recrecimiento de las células tumorales viables.

Figura modificada de Faivre et al, Nat Rev Drug Discov, 2007.

Evasión a la terapia antiangiogénica: En contraposición a la resistencia tradicional a determinadas drogas, adquirida por mutaciones que afectan la diana de los fármacos o por alteraciones en los mecanismos de entrada del compuesto (Gorre and Sawyers, 2002; O'Connor et al., 2007), la resistencia evasiva es mucho más indirecta: se crean mecanismos alternativos que promueven la activación de la angiogénesis aún cuando la diana de la droga sigue estando inhibida (figura 10) (Casanovas et al., 2005; Fernando et al., 2008; Kerbel, 2005). Se cree que hay al menos cuatro tipos diferentes de mecanismos que manifiestan una resistencia evasiva a la terapia antiangiogénica:

- **Sobreexpresión de factores proangiogénicos alternativos**: Se describió inicialmente en ensayos preclínicos con un modelo de ratón transgénico de tumores neuroendocrinos (RIP-Tag2). Tras recibir terapia anti-VEGFR2 hay una reducción tumoral inicial seguida por un recrecimiento provocado por la reinducción de la angiogénesis. Esta reinducción está promovida por una sobreexpresión de factores proangiogénicos independientes de VEGF, como FGF1, FGF2, Efrina A1 (Efna1) y Efna2 y Angpt1 (Casanovas et al., 2005).

- **Reclutamiento de células progenitoras vasculares y monocitos proangiogénicos**: Las condiciones de hipoxia que crea el tratamiento antiangiogénico promueve el reclutamiento de un gran número de células derivadas de la médula ósea (BMDCs) en los márgenes del tumor, que tienen la capacidad de promover la revascularización del tumor (Shaked et al., 2006).

- **El recubrimiento de pericitos protege a los vasos de la terapia antiangiogénica**: Aquellos vasos tumorales preexistentes que tienen un elevado número de pericitos recubriendo su superficie se mantienen funcionales y no presentan regresión (Bergers et al., 2003; Jain and Booth, 2003; Mancuso et al., 2006). Estas observaciones parecen indicar que las células endoteliales tienen la

habilidad de reclutar pericitos, capaces de secretar VEGF y otros factores que favorezcan su supervivencia (Benjamin et al., 1998; Bergers et al., 2003; Darland et al., 2003).

Resistencia intrínseca al tratamiento antiangiogénico: En este tipo de resistencia encontramos una indiferencia por parte del tumor hacia la terapia antiangiogénica, no existiendo ningún tipo de respuesta al tratamiento. Se ha detectado este tipo de resistencia en pacientes bajo tratamiento con bevacizumab, sorafenib y sunitinib: los tumores tratados no dejan de crecer, ni si quieren frenan su ritmo de crecimiento con la terapia (Batchelor et al., 2007; Kindler et al.).

En estos casos se ha observado que hay tumores que expresan, desde un principio, múltiples factores proangiogénicos, con lo que la terapia que bloquea VEGF les afecta parcialmente (Relf et al., 1997). Otros están infiltrados de células inflamatorias, que también expresan gran cantidad de factores proangiogénicos alternativos a la vía de VEGF (Shojaei et al., 2007). Además, existen también tipos tumorales hipovascularizados, que muestran indiferencia al tratamiento antiangiogénico (Sofuni et al., 2005).

MODELO RIP-Tag2

Los modelos animales de cáncer han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación. Sin embargo, en los últimos años y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre las bases moleculares del cáncer, ha surgido la necesidad de disponer de modelos genéticamente definidos, donde las mutaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad pueden ser controladas. Esta necesidad, combinada con el vertiginoso avance en tecnología para la manipulación genética en mamíferos ha conducido al desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, en su mayoría de origen murino, cada vez más sofisticados, que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología del cáncer en humanos. Estos modelos están proporcionando una visión más adecuada del proceso tumoral y permiten obtener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias (Adams and Cory, 1991; Berns, 2001; Van Dyke and Jacks, 2002). Una de las principales ventajas de los modelos transgénicos es que los tumores se originan a partir de células normales que se encuentran en su correspondiente microambiente tisular, y progresa hacia los diferentes estadios, tal y como ocurre en los tumores humanos (Adams and Cory, 1991; Hanahan et al., 1996). Estos modelos órgano-específicos también presentan oportunidades para el desarrollo, no solo de nuevas terapias contra el cáncer, si no también de estrategias preventivas que bloquean la progresión de lesiones pre-malignas en tumores.

En 1985 Douglas Hanahan desarrolló un nuevo modelo de ratón transgénico: el modelo RIP-Tag2. Este modelo se creó gracias a la fusión génica del promotor de la insulina de rata (RIP) y el antígeno T grande y T pequeño del virus de simio 40 (SV40) (figura 10) (Hanahan, 1985).

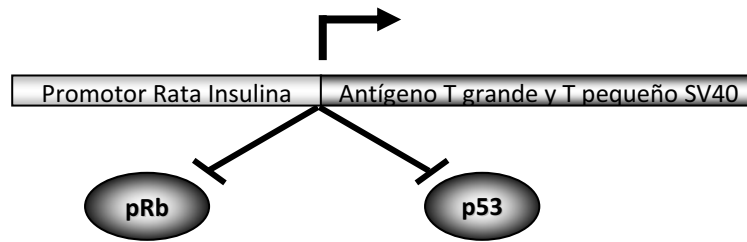


Figura 11. Construcción génica que origina los tumores RIP-Tag2. Se realizó una fusión del promotor de la insulina de rata (RIP) con el gen del antígeno T grande y T pequeño del virus de simio 40 (SV40), lo que provoca la perturbación de las vías de p53 y pRb, favoreciendo la aparición de tumores en los islotes pancreáticos. Figura modificada de Hanahan, Nature, 1985.

El antígeno T (Tag) es capaz de transformar una gran variedad de tipos celulares. La actividad transformadora de Tag se debe a su capacidad de unirse a diferentes factores celulares, como co-activadores transcripcionales o proteínas supresoras de tumores, pero principalmente a la perturbación que produce en los supresores tumorales retinoblastona (pRb) y p53 (Ali and DeCaprio, 2001). Una de las principales funciones de pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas. p53 resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, activando los enzimas de reparación del DNA y deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Además también desempeña un papel importante en la activación de la apoptosis y en la entrada de la célula en senescencia (Levine et al., 2004).

La tumorigénesis que se produce en el modelo RIP-Tag2 está dividida en diferentes ciclos muy bien definidos, por lo que sirve como prototipo general de las vías, parámetros y mecanismos moleculares de distintos tipos tumorales multietapas (figura 11). El 100% de los islotes pancreáticos (unos 400 islotes por páncreas) expresan el oncogen Tag ya en su etapa embrionaria, y son

morfológicamente asintomáticos hasta la semana 3-4. En este momento es cuando empiezan a aparecer los islotes hiperplásicos. Aproximadamente la mitad de los islotes presentarán esta hiperproliferación celular de las células β , mostrando displasia y características de carcinoma *in situ*. El 8-12% de los islotes realizarán el *switch* angiogénico, gracias a la secreción excesiva de factores proangiogénicos, aproximadamente a las 7 -10 semanas de edad. Este *switch* se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales, dilatación vascular y microhemorragia, lo que crea islas de sangre en el interior de las lesiones, dándoles una apariencia altamente hemorrágica.

Aproximadamente a las 10 semanas de edad de los animales emergen los tumores sólidos, que representan el 3% del total de islotes del páncreas. Inicialmente estos tumores son pequeños adenomas encapsulados que a las 12-13 semanas progresan hacia adenomas de mayor tamaño o carcinomas invasivos, todos ellos presentando una intensa vascularización mediada por vasos hemorrágicos y muy dilatados (Hanahan and Folkman, 1996).

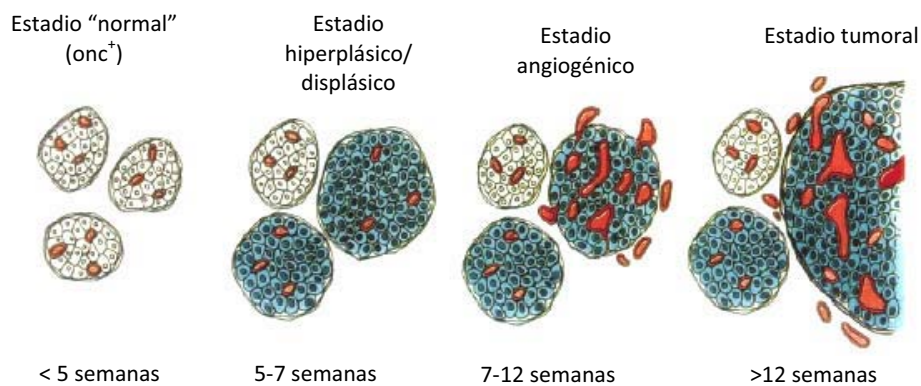


Figura 12. Progresión tumoral del modelo RIP-Tag2. Esquema de la progresión tumoral del modelo RIP-Tag2, donde se muestra el estadiaje del proceso tumoral por semanas.

Figura modificada de Hanahan & Folkman, Cell, 1996.

Los tumores RIP-Tag2 se generan a partir de células β del páncreas, lo que comporta que se secrete una gran cantidad de insulina a medida que va creciendo el tumor. Éste fenómeno comporta que en estadios avanzados de la enfermedad, a las 14-15 semanas, se produzca una hiperinsulinemia que provoca una hipoglicemia severa que aboca en la muerte del animal.

El modelo RIP-Tag2, al tener tumores altamente hemorrágicos, nos permite observar de manera sencilla y rápida los efectos de los fármacos antiangiogénicos, por eso, se ha convertido en un modelo ideal para llevar a cabo estudios preclínicos de drogas antiangiogénicas. Gracias al hecho que la progresión tumoral de ratones RIP-Tag2 esté tan bien definida, se pueden diseñar diferentes tipos de ensayos con él, dependiendo del estadio tumoral que se quiera estudiar (Bergers et al., 1999) (figura 12):

Ensayo de prevención: Se inicia con ratones RIP-Tag2 de cinco semanas de edad, que únicamente presentan islotes hiperplásicos no hemorrágicos. Generalmente el tratamiento dura hasta las 10 semanas, momento en el que aparecen los primeros tumores. A esta edad aproximadamente el 20-25% de los islotes se han transformado en islotes angiogénicos (unas 40 lesiones por páncreas). De esta manera se puede contabilizar la frecuencia de islotes que han llevado a cabo el *switch* angiogénico y conocer el poder antiangiogénico de un determinado fármaco.

Ensayo de intervención: El tratamiento de los ratones RIP-Tag2 empieza a las 10 semanas de edad, cuando los ratones tienen un número reducido de tumores que están altamente vascularizados. Con este tipo de ensayo se pueden valorar diferencias en distintos aspectos entre ratones controles y tratados, como son cambios en el volumen tumoral o en las características histológicas, como por ejemplo en el índice de células apoptóticas y en la microdensidad vascular.

Ensayo de regresión: Es el ensayo más parecido a lo que ocurre en la clínica. Se tratan ratones RIP-Tag2 de 12 semanas con tumores ya formados, que si no reciben ningún tratamiento, tienen una esperanza de vida de 2-3 semanas. Con este tipo de ensayo se pretenden observar diferencias en la supervivencia y en el volumen tumoral de los animales tratados respecto a los controles.

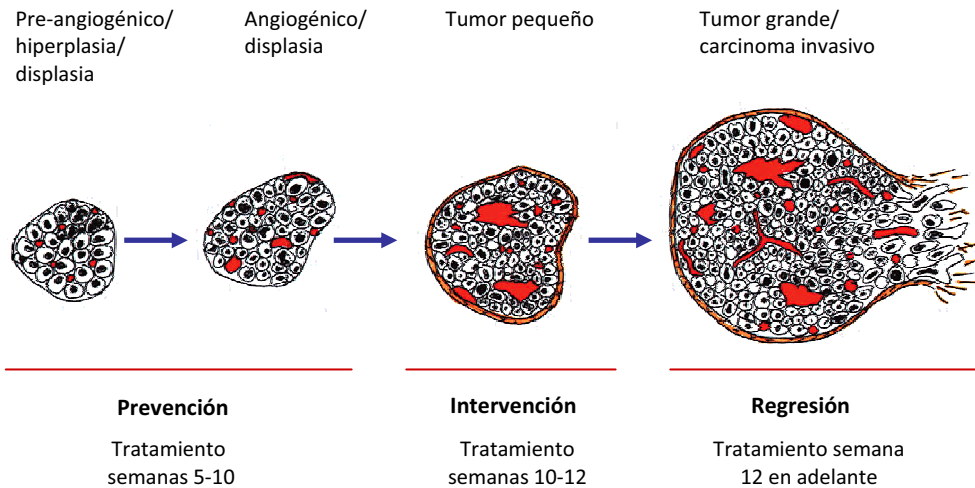


Figura 13. Posibles ensayos a realizar con el modelo RIP-Tag2 para tratar determinados estadios tumorales. Gracias a que la progresión tumoral del modelo RIP-Tag2 está tan bien definida, se pueden realizar diferentes tipos de ensayos dependiendo de la etapa que se desee estudiar: De prevención, para determinar el poder antiangiogénico de un fármaco; de intervención, para observar cambios en el volumen tumoral; o de regresión, para apreciar diferencias en supervivencia y volumen tumoral.

Figura modificada de Bergers et al, Science, 1999.

A partir de las diez semanas de edad, los ratones RIP-Tag2 pueden presentar diferentes tipos de lesiones, las que se pueden clasificar en distintas categorías, descritas todas ellas en la tabla 1 y representadas en la figura 13 (Lopez and Hanahan, 2002).

Tabla 1. Características de las lesiones presentes en el modelo RIP-Tag2				
Estadio	Ratio núcleo/citoplasma	Tamaño de lesión (comparado con islotes normales)	Morfología vascular	Márgenes tumorales
“Normal” Tag+	Similar a células β normales	Similar (<0,2mm)	Similar a los capilares de los islotes normales	Bien definidos Similar a islotes normales
Hiperplásico/dislásico	Incrementado respecto cél β normales	Agrandados (0,2 – 0,5 mm)	Similar a los capilares de los islotes normales	Bien definidos Similar a islotes normales
Islotes angiogénicos	Incrementado respecto cél β normales	Agrandados (<1 mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Bien definidos Similar a islotes normales
Tumor encapsulado	Incrementado respecto cél β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Bien definidos. Se puede observar una cápsula de colágeno
Tumor microinvasivo	Incrementado respecto cél β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Regiones focales de invasión. Márgenes interrumpidos por zonas invasivas
Tumor altamente invasivo	Incrementado respecto cél β normales	Mucho más grandes (1-10mm)	Vasculatura dilatada y tortuosa: aparición de islas de sangre	Invasión generalizada. Sin rastro de márgenes tumorales

Tabla 1. Descripción de los diferentes estadios tumorales. En la tabla se enumeran las diferentes características que presentan los tumores RIP-Tag2 en sus distintos estadios, como el tamaño, la morfología de los vasos o el grado de invasión.

Tabla modificada de Lopez & Hanahan, Cancer Cell, 2002

En un mismo páncreas se observan islotes morfológicamente normales; hiperplásicos, en los que la densidad celular se ve incrementada; y angiogénicos, en los que ya se ha producido el *switch* angiogénico y se observan islas de sangre en su interior. Estas lesiones se consideran pre-neoplásicas. Además también se pueden encontrar tumores clasificables como: tumores encapsulados, cuando tiene sus márgenes muy bien definidos y existe una cápsula de colágeno que los rodea completamente, la cual puede ser o no visible; tumores microinvasivos, que tienen

regiones focales de invasión, en las que se observan un grupo de células tumorales adentrándose en el tejido acinar adyacente, pero que mantienen la mayor parte de los márgenes intactos; tumores altamente invasivos, en ellos no se pueden definir márgenes a los tumores, ya que por todo su perímetro encontramos células tumorales invadiendo el páncreas exocrino de alrededor.

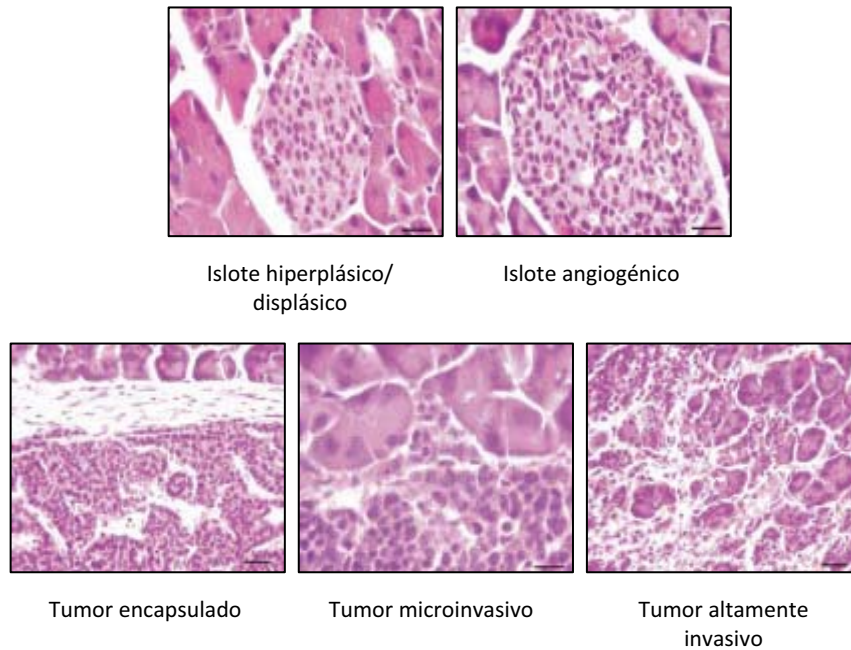
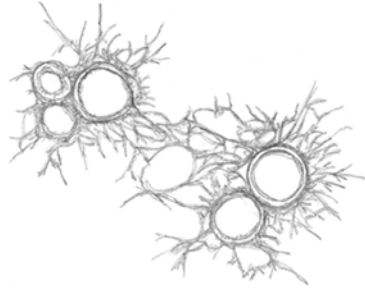


Figura 14. Morfología de las lesiones pre-neoplásicas y de los tumores RIP-Tag2.

En las imágenes se puede apreciar la morfología de los diferentes tipos de lesiones que se pueden encontrar en un ratón RIP-Tag2 a partir de la décima semana de edad de los animales.

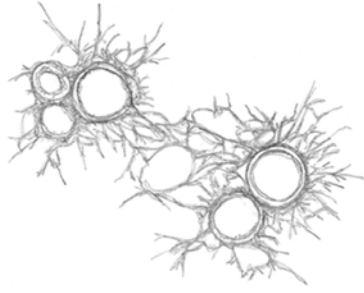
Fotografías extraídas de Lopez & Hanahan, Cancer Cell, 2002



Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

1. Caracterización de la resistencia a la inhibición farmacológica de la angiogénesis:
 - a. Caracterización de la resistencia a la inhibición selectiva de la vía VEGF/VEGFR2.
 - b. Caracterización de la resistencia al tratamiento antiangiogénico con un inhibidor multidiario de receptores tirosina quinasa.
2. Caracterización del efecto antiangiogénico y sus consecuencias tras el tratamiento con un inhibidor de vías angiogénicas independientes de VEGF.
3. Estudio de las causas de la invasión tras recibir tratamiento antiangiogénico.



Material y métodos

Animales y estabulación

Los ratones utilizados en este trabajo fueron ratones RIP-Tag2, RIP-Tag2 Rag^{KO/KO} y β -VEGF-KO de la cepa C57/Bl6J. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20-22°C, en condiciones SPF (del inglés Specific Pathogen Free) para evitar el contacto con patógenos, estabulados en jaulas autoclavables y manipulados en cabinas de flujo laminar vertical. Se les proporcionó comida y bebida *ad libitum*.

Debido a que los tumores de células β del páncreas secretan gran cantidad de insulina, los ratones RIP-Tag2 a partir de las 12 semanas de edad pueden presentar cuadros de hipoglucemia severa dependiendo del volumen tumoral acumulado. Para intentar paliar este efecto se les añadió sacarosa en el agua de bebida a partir de las 12 semanas de edad.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical o por sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico, Dolethal, Vétoquinol) en el caso en que se necesitara realizar perfusión con suero fisiológico.

Todos los procedimientos a los que fueron sometidos los ratones fueron evaluados y aprobados por el comité ético especialista en experimentación animal.

Modificaciones del modelo RIP-Tag2

A lo largo de los años el modelo RIP-Tag2 ha sido ampliamente utilizado para varios estudios relacionados con la angiogénesis, la progresión tumoral y para valorar el efecto que ejercen distintos fármacos sobre las diferentes etapas que se dan en éste modelo (Bergers et al., 1999; Casanovas et al., 2005; Lopez and Hanahan, 2002; Pietras and Hanahan, 2005).

Para la realización de los experimentos llevados a cabo en este estudio, hemos utilizado, a parte del modelo RIP-Tag2 original, tres modelos más con diferentes modificaciones:

RIP-Tag2;Rag1 knockout (RIP-Tag2 Rag^{KO/KO})(Casanovas et al., 2005): Los ratones deficientes para el gen Rag1 (Rag1 knockout) se caracterizan por la ausencia de linfocitos T y B maduros. Son los denominados ratones SCID (del inglés *Severe Combined Immuno Deficient*). El modelo RIP-Tag2 Rag^{KO/KO} se obtuvo a partir del cruce de ratones RIP-Tag2 (Hanahan, 1985) con ratones Rag1 knockout (Mombaerts et al., 1992).

RIP-Tag2/Cre;Vegf-A^{fl/fl} (β -VEGF-KO) (Inoue et al., 2002): De especial interés debido a su deficiencia en la expresión de VEGF-A en las células β del páncreas. Para obtenerlo, se utilizó un modelo de ratón transgénico en el que la recombinasa Cre estaba bajo el control transcripcional del promotor de rata de la insulina (RIP-Cre) (Postic et al., 1999), en combinación con una línea de ratones VEGF-A/loxP (Gerber et al., 1999), donde el exón 3 del gen del VEGF-A estaba flanqueado por dos sitios de recombinación loxP.

Genotipado de los animales

Los ratones RIP-Tag2 se obtuvieron tras cruzar hembras no transgénicas (WT) con machos RIP-Tag2. A las 3 semanas de edad de las crías se realizó el destete, momento en que se sexaron y se marcaron los ratones para su posterior identificación. Se recuperaron los fragmentos sobrantes tras el marcado de las orejas para realizar el genotipado.

Dichos fragmentos se sumergieron en solución de digestión (50mM Tris-HCl, pH 8; 20mM NaCl; 1mM EDTA, pH 8; 1% SDS; 2 mg/ml proteinasa K (Sigma) y se mantuvieron a 65°C 4-12 horas. A continuación se les añadió 300 μ l de agua y se incubaron a 95°C durante 10 minutos con tal de inactivar la proteinasa K.

Para el genotipado se realizó una PCR con dos pares de oligos diferentes: Un par de oligos para el antígeno T (Tag), y un control endógeno, la β 2-globulina, con tal de asegurar que la reacción había funcionado de manera óptima.

Secuencia de los oligos utilizados para el genotipado:

Tag: 5' GCTCAAAGTTCAGCCTGTCC
5' GGTGGGTAAAGGAGCATGA

β 2-globulina: 5'ATTCACCCCCACTGAGACTG
5' TGGAGGAAGCTCAGGAAAGA

Reactivos utilizados para la reacción de PCR

10X PCR buffer
100 mM Tris-HCl
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
2mM dNTPs
Oligos (Tag y β 2-globulina) 2.5 pmol/ μ l
Taq polimerasa

Tratamiento antiangiogénico

Se llevaron a cabo experimentos con tres tipos diferentes de fármacos antiangiogénicos: DC101 (anti-VEGFR2), sunitinib y anti-Sema4D.

El DC101, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el VEGFR2 de ratón, se obtuvo a partir de un cultivo de hibridoma proveniente de la *American Type Culture Collection* (ATCC). El anticuerpo fue administrado dos veces por semana mediante inyección intraperitoneal (i.p.) a dosis de 4mg por inyección. Se llevaron a cabo diferentes esquemas de tratamiento a corto y largo plazo.

El sunitinib fue proporcionado por Pfizer y disuelto en una solución de carboximetilcelulosa (CMC): 0,5% CMC, 1,8% NaCl, 0,4% Tween 80 y 0,9% alcohol bencílico. El pH fue ajustado a 6.

El sunitinib se administró de manera oral y diaria a dosis de 40 mg/kg/día.

El anticuerpo monoclonal anti-Sema4D fue proporcionado por Vaccinex en solución lista para ser inyectada y fue administrado mediante inyección intraperitoneal una vez por semana a dosis de 1 mg.

Obtención de DC101

El DC101 se obtuvo a partir de un cultivo de células de hibridoma de rata sembradas en biorreactores (CELLine CL 1000, IBS Integra Biosciences) con medio libre de suero Hybridoma-SFM (Gibco) suplementado con glutamina 2mM, 50U/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomina, 1% de aminoácidos no esenciales y 0,8% de glucosa al 50%. Una vez por semana se procedía a la extracción del medio que contenía el anticuerpo. A continuación se centrifugaba a 3000 rpm durante 15 minutos y se filtraba con filtros de 0,22 µm. Después se realizaba la cuantificación proteica mediante al *kit* BCA protein assay kit (Pierce).

Con el objetivo de valorar la calidad del anticuerpo extraído se realizaba un gel de poli-acrilamida.

Electroforesis en gel de poli-acrilamida

La técnica SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis) permite separar las proteínas de una muestra en función de su tamaño. Para ello se utilizan geles de acrilamida/bisacrilamida (29:1), que constan de dos partes: un gel empaquetador y un gel separador.

En primer lugar se prepara el gel separador, que en este caso, tiene un 6% de acrilamida, debido a que nuestro anticuerpo tiene un peso molecular elevado (145 kDa). Además de la acrilamida, este gel consta de 9,4 M Tris base pH 8,8, 0,1% SDS, 1% APS y 0,1 TEMED. Una vez polimerizado el gel separador, se añade el gel empaquetador compuesto por un 4% de acrilamida, 125 mM de Tris base pH 6,8, 0,1% SDS, 1% APS y 0,1% TEMED.

Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió tampón de muestra 5X (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) sin

añadirles β -mercaptoetanol ni incubarlas a 95°C, para evitar así que se rompan los puentes disulfuro. En cada carril se cargó una concentración conocida de anticuerpo para comprobar si nuestra proteína estaba degradada y comparar la calidad del mismo con una muestra de DC101 de referencia (DC101 comercial proporcionado por ImClone) (figura 15).

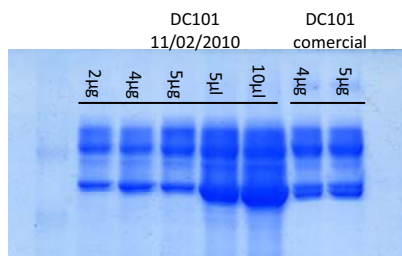


Figura 15. Gel de poli-acrilamida. En el gel se puede comprobar la calidad del anticuerpo y hacer la comparativa con el anticuerpo comercial de ImClone

Administración de Hypoxyprobe™ y perfusión con PBS

Con tal de poder determinar los niveles de hipoxia en el interior de los tumores, se inyectó Hypoxyprobe™ (NPI Inc.) a los animales, también denominado hidrocloreuro de pimonidazol. Hypoxyprobe™ es un sustituto del 2-nitroimidazole cuyo único componente es hidrocloreuro de 1-[(2-hidroxi-3-piperdinil)propil]-2-nitroimidazol.

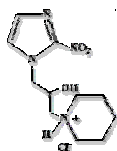


Figura 16. Fórmula química del Hypoxyprobe™. (hidrocloreuro de pimonidazol).

Se ha descrito la formación de aductos mediante los grupos tiol en proteínas, péptidos y aminoácidos en condiciones de hipoxia ($pO_2 < 10\text{mmHg}$), en

los cuales los átomos del anillo y de la cadena lateral del 2-nitroimidazol son retenidos. Así, el HypoxyprobeTM se distribuye en todos los tejidos y se une a aquellas células que tengan concentraciones de oxígeno inferiores a 14 micromolar ($pO_2 < 10\text{mmHg}$ a 37°C).

Se inyectó intraperitonealmente HypoxyprobeTM a una concentración de 60 mg/kg disuelto en suero fisiológico, se dejó actuar durante una hora y a continuación se sacrificó a los ratones mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Vétoquinol). Cuando los ratones estaban totalmente anestesiados y antes de que se produjera la parada cardiaca debida a la sobredosis de anestésico, se les realizó una perfusión con suero fisiológico para evitar una acumulación excesiva e inespecífica de HypoxyprobeTM en los tejidos.

Determinación del tiempo de supervivencia

Para la determinación del tiempo de supervivencia, los ratones de la colonia RIP-Tag2 se fueron distribuyendo de manera aleatoria en los diferentes grupos de tratamiento a medida que cumplían la edad requerida para entrar en el estudio. Cada ratón fue sacrificado cuando presentaba signos de malestar general, como hipotermia e hipomovilidad severa.

Con los datos obtenidos se realizaron gráficas de supervivencia Kaplan-Meier y se aplicaron los test estadísticos pertinentes.

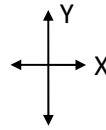
Determinación del volumen tumoral

Una vez que el páncreas se ha retirado quirúrgicamente los tumores pueden ser separados del tejido acinar adyacente mediante disección. Para llevar a cabo estudios histológicos posteriormente, el tejido acinar se mantuvo alrededor de los tumores con tal de determinar el grado de invasión tumoral.

El volumen tumoral (en mm^3) acumulado en un ratón se calculó sumando los volúmenes de los tumores independientes diseccionados anteriormente,

aplicando la fórmula de un esferoide. Se midieron los ejes X e Y y a continuación se aplicó la siguiente fórmula:

$$\Sigma (X^2 \times Y \times 0.52)$$



Determinación de los efectos antiangiogénicos de un fármaco

Con la finalidad de determinar el grado de potencia de un fármaco antiangiogénico administrado en ratones RIP-Tag2, tras el sacrificio, y con el páncreas aún fresco, se realiza el recuento de lesiones en las que se ha producido el *switch* angiogénico. De esta manera se contabilizan todas aquellas lesiones (ya sean tumores o islotes pancreáticos) con un aspecto altamente hemorrágico. Para llevar a cabo dicha tarea se utiliza una lupa binocular para facilitar el recuento de las lesiones más pequeñas.

Obtención y procesado de muestras

Una vez sacrificados los ratones se procesaron los distintos tejidos para su posterior estudio histológico. Una parte de los tejidos obtenidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante 24 horas, a continuación se lavó el tejido con agua durante 30 minutos y se deshidrató (etanol 70%, etanol 96%, etanol absoluto y xilol) y se incluyó en parafina líquida a 60°C; otra parte de los tejidos fue congelada en medio preservante OCT (<11% alcohol polivinílico, <5% cera carbónica y <85% ingredientes no reactivos) y conservada a -80°C.

Algunos tumores provenientes de distintos animales fueron cuidadosamente separados del tejido acinar adyacente, intentando siempre que la contaminación de páncreas exocrino fuera la menor posible. Inmediatamente después de dicha extracción se congelaron a -80°C para, posteriormente, realizar la extracción de RNA o de proteínas.

Estudios histológicos

Las muestras incluidas en parafina fueron utilizadas para realizar tinciones de hematoxilina-eosina (H&E) para realizar así la cuantificación de la invasión, o realizar inmunotinciones específicas. Las muestras congeladas en OCT se utilizaron para la realización de inmunofluorescencias con distintos anticuerpos.

Cuantificación de la invasión

Los tejidos fijados con formol y parafinados conservan su morfología y permiten el estudio minucioso de la arquitectura tisular, por este motivo la cuantificación de la invasión se realizó únicamente sobre las secciones de parafina.

Con tal de realizar la cuantificación de la invasión se clasificaron los tumores RIP-Tag2 según las tres categorías descritas en estudios anteriores: Tumores encapsulados, carcinomas con regiones focales de invasión (microinvasivos) o carcinomas altamente invasivos (Lopez and Hanahan, 2002). Cada recuento se realizó a partir de secciones teñidas con H&E, con un mínimo de cinco animales por grupo de tratamiento.

Determinación de metástasis

Para este estudio se determinó la presencia o ausencia de metástasis en nódulo linfático peripancreático y en hígado.

La presencia de metástasis en nódulo linfático se determinó en el momento de la extracción del páncreas del animal. Cuando la apariencia del nódulo linfático peripancreático estaba alterada y éste se presentaba como una masa agrandada y hemorrágica se contabilizaba como un caso de metástasis en el nódulo linfático. Posteriormente, con tal de confirmar dicha metástasis se realizaba una tinción específica para el antígeno T.

La incidencia de micrometástasis en hígado fue determinada mediante el análisis de un mínimo de 10 animales por grupo de tratamiento, analizando 5 secciones por cada animal y confirmando la presencia del antígeno T mediante inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia

Para la realización de las inmunofluorescencias se obtuvieron secciones de 3-5 μm de tejido congelado en OCT, que fueron fijadas con formol tamponado al 4% durante 10 minutos y lavadas con agua destilada y 0,1% tritón X-100 en PBS 1X (PBS 10X: 1,5 M NaCl, 90 mM Na_2HPO_4 y 10 mM KH_2PO_4). A continuación se realizó el bloqueo en PBS + 20% de serum de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente en la cámara húmeda. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las concentraciones de los anticuerpos primarios se detallan en la tabla 2. Tras el tiempo de incubación las secciones fueron lavadas con 0,1% tritón X-100 en PBS 1X. A continuación se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario pertinente durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad, dentro de la cámara húmeda. Las concentraciones de los anticuerpos secundarios se detallan en la tabla 3. Después se realizaron varios lavados con 0,1% tritón X-100 en PBS 1X. El marcaje de los núcleos varió dependiendo de si la visualización se llevaba a cabo en el microscopio de epifluorescencia o en el microscopio confocal. Para el primero tras los lavados se montaron las muestras directamente con medio de montaje + DAPI (Vectashield; Vector). Para la visualización en microscopio confocal el marcaje de los núcleos se realizó mediante la incubación con una dilución 1:1000 de TO-PRO3 (Molecular Probes) durante 10 minutos en el interior de la cámara húmeda y protegidos de la luz. Las secciones fueron de nuevo lavadas con 0,1% Tritón X-100 en PBS 1X y montadas con medio de montaje acuoso (Vectashield; Vector).

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución utilizada
Antígeno T	Del laboratorio de D. Hanahan	Policlonal de conejo	1:10000
CD31/PECAM	BD Pharmingen	Monoclonal de rata	1:50
Sema4D	Sigma	Monoclonal de conejo	1:150
Hypoxyprobe MAb	NPI Inc.	Monoclonal de ratón	1:50
E-cadherina	Invitrogen	Monoclonal de rata	1:200
β -Catenina	Transduction Laboratories	Monoclonal de ratón	1:100
NCAM	BD Pharmingen	Monoclonal de ratón	2 μ g/ml

Tabla 2. Relación de anticuerpos y concentraciones utilizados en este estudio para la realización de las inmunofluorescencias.

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución utilizada
Alexa Fluor 488 anti-ratón	Molecular Probes	Cabra	1:200
Alexa Fluor 488 anti-rata	Molecular Probes	Cabra	1:200
Alexa Fluor 546 anti-rata	Molecular probes	Cabra	1:200
Alexa Fluor 488 anti-conejo	Molecular Probes	Cabra	1:200
Alexa Fuor 546 anti-conejo	Molecular Probes	Cabra	1:200

Tabla 3. Listado de anticuerpos secundarios utilizados en las inmunofluorescencias.

Inmunohistoquímica

Con tal que los tejidos no se separaran del portaobjetos durante la realización de la técnica se utilizaron portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Inmunohistoquímica de antígeno T:

El desparafinado se realizó a través de una batería de xiloles y etanoles: 4 x xilol, 3 x etanol absoluto, 3 x etanol 96%, 1 etanol 70% y 1 etanol 50%. Se dejaron las secciones durante 10 minutos en los xiloles y 5 en los alcoholes. Después de un lavado con agua destilada, se realizó el desenmascaramiento antigénico mediante un choque térmico de dos minutos en una olla a presión con solución de citrato sódico (18mM ácido cítrico, 82mM citrato sódico). Las muestras se dejaron enfriar dentro del mismo tampón durante un mínimo de 20 minutos. A continuación se realizó la inactivación de las peroxidasas endógenas con la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución de agua oxigenada al 3%. Se lavaron con agua destilada las secciones y se procedió a la incubación con la solución de bloqueo: suero de cabra al 20% durante 30 minutos a temperatura ambiente en el interior de la cámara húmeda. Pasado dicho tiempo se incubaron las secciones con el anticuerpo primario anti-antígeno T policlonal de conejo (dilución 1:10000; del laboratorio de D. Hanahan) durante toda la noche a 4°C en la cámara húmeda.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con 0,1% tritón X-100 en PBS 1X y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario: Envision anti-conejo (Dako) en la cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con DAB Plus (Dako). Finalmente se realizó la contratinción con hematoxilina de Harris y se deshidrataron las secciones para proceder a su montaje con DPX.

Inmunohistoquímica con Hypoxyprobe MAb1

Desparafinado de las secciones a través de una batería de xiloles y etanoles: 4 x xilol, 3 x etanol absoluto, 3 x etanol 96%, 1 etanol 70% y 1 etanol 50%. Se dejaron las secciones durante 10 minutos en los xiloles y 5 en los alcoholes. Se lavaron las secciones con agua y se realizó la desactivación de las peroxidasas endógenas con una solución al 3% de agua oxigenada. Tras un nuevo lavado con

agua destilada se añadió la solución de bloqueo: 20% de serum de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente en el interior de la cámara húmeda. Después se realizó la incubación con el anticuerpo primario: Hypoxyprobe MAb1 de ratón (dilución 1:100, NPI Inc.) durante una hora a temperatura ambiente en el interior de una cámara húmeda. Después de realizar 3 lavados con 0,1% tritón X-100 en PBS 1X se hizo la incubación con el anticuerpo secundario: Envision anti-ratón (Dako) durante una hora a temperatura ambiente en el interior de la cámara húmeda. El revelado se realizó con DAB Plus (Dako). La contratinción de las secciones se realizó con hematoxilina de Harris y posteriormente se deshidrataron para su posterior montaje con DPX.

Cuantificación de la microdensidad vascular

Para determinar la microdensidad vascular (MDV) en las muestras tumorales se realizó una inmunofluorescencia de CD31 sobre las secciones congeladas, que se observó en el microscopio de epifluorescencia donde se seleccionaron un mínimo de 5 campos a un aumento de 400X por sección. La cuantificación del marcaje se realizó mediante el software Image J, donde se realizó el recuento de las estructuras vasculares por cada campo y se normalizó por el área que ocupaba dicho tumor.

Separación de células endoteliales mediante citometría de flujo

Con tal de poder separar las células endoteliales del resto de tipos celulares presentes en el tumor utilizamos un citómetro Cell Sorter, que nos permite recoger la muestra tras su separación.

Para realizar este experimento se utilizaron ratones RIP-Tag2 de 14 semanas de edad que no habían recibido ningún tratamiento.

Soluciones utilizadas:

Tampón FACS:

PBS Dulbecco's CMF

5% Suero bovino fetal (FBS)

Solución colagenasa:

0.05g colagenasa tipo II (Gibco)

0.05g colagenasa tipo IV (Gibco)

0.01g DNasa (Sigma)

20 ml tampon FACS

- Sacrificio de los ratones por dislocación cervical.
- Separación de los tumores del tejido acinar adyacente. Sumergirlos en PBS a 4°C.
- Con la ayuda de un bisturí trocear los tumores en fragmentos lo más pequeños posibles.
- Sumergir los fragmentos de los tumores en 20ml de solución colagenasa y colocar la mezcla en un baño a 37°C en agitación con una barita magnética durante 13 minutos.
- Parar la reacción con 30ml de DMEM (Lonza) + 10% FBS a 4°C.
- Mezclar bien la muestra con la pipeta intentado deshacer los agregados que hayan podido quedar tras la digestión.
- Pasar la solución por un filtro de 70 µm.
- Centrifugar la mezcla a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender el pelet con 1ml de tampón de lisis ACK (Lonza) durante 10-15 segundos.
- Añadir 49ml de DMEM + 10% FBS a 4°C.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 10 ml de DMEM + 5% FBS.

- Recuento de las células en la cámara de Neubauer.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Resuspender en tampón FACs con el volumen adecuado para tener una concentración final de 10^6 células/ml.
- Añadir la solución de bloqueo FC Block a razón de 10 μ l / 100 μ l de células, durante 10 minutos en hielo.
- Incubar el disgregado de células con el anticuerpo monoclonal anti-CD31 conjugado con PE/Cy7 (PharMingen) a concentración 1:30 durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Realizar lavados con abundante tampón FACs.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Repetir el lavado con abundante tampón FACs.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Resuspender en tampón FACs con el volumen adecuado para tener una concentración final de $5 \cdot 10^6$ células/ml.
- Pasar las células por el citómetro de flujo Cell Sorter (MoFlo) y recuperar aquellas que estén marcadas con GFP.
- Centrifugar a revoluciones máximas, aspirar el sobrenadante y congelar el pelet a -80°C.

Extracción proteica de las muestras tumorales

Para la extracción de proteínas de las muestras tumorales obtenidas de los experimentos *in vivo*, utilizamos el tampón de lisis RIPA (0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% sodio deoxicolato, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 40 mM β -glicerofosfato, 200 μ M ortovanadato sódico, 100 μ M PMSF, 1 μ M pepstatina A, 1 μ g/ml leupeptina, 4 μ g/ml aprotinina).

Los tejidos se disgregaron manualmente o con ayuda de un politrón, y se incubaron en el tampón de lisis durante 2 horas a 4°C en agitación. Pasado este

tiempo, centrifugamos las muestras durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Los sobrenadantes fueron conservados a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación proteica de las muestras se realizó mediante el kit "BCA protein assay kit" (Pierce).

Transferencia proteica

Tras realizar la separación de proteínas mediante un gel de poli-acrilamida (explicado anteriormente) se realiza la transferencia de proteínas a membranas de PVDF (polivinilideno fluoride; Immobilon Millipore) a través de un campo eléctrico.

Se realiza un montaje en el que el gel y la membrana están en contacto para que pueda producirse la transferencia de las proteínas. El gel se coloca sobre un papel whatman que a la vez está colocado sobre un filtro esponjoso. Encima del gel se coloca la membrana, previamente activada con metanol. Por encima de la membrana se vuelve a colocar un papel whatman y por último un filtro esponjoso.

Todo este montaje, sujeto por un soporte plástico se coloca en la cubeta de transferencia de manera que la membrana quede en contacto con el polo positivo.

Se llena la cubeta con tampón de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina y 20 % metanol) y se conecta el sistema a la corriente eléctrica a 100V durante 1 hora y media.

Western blotting

Una vez finalizada la transferencia proteica, se procede al bloqueo de la membrana con 5% de leche en polvo en TBS 1X (TBS 10X: 99 mM tris base y 1,49 M NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Esto evita las uniones inespecíficas del anticuerpo que después será utilizado. Pasado este tiempo, se incuba con el anticuerpo primario, en nuestro caso con anti-NCAM (anticuerpo monoclonal de ratón de BD PharMingen) a concentración de 2 µg/ml durante toda la noche a 4°C en agitación. .

Tras lavar las membranas con 0,1% de Tritón X-100 en TBS 1X, se procede a la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (Amersham Biosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Finalmente, la membrana fue lavada con 0,1% de Tritón X-100 en TBS 1X, y la detección de la señal se realizó utilizando un método quimioluminiscente de revelado basado en la oxidación del luminol por parte de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences).

Extracción de RNA de muestras tumorales

Para la obtención de RNA se utilizaron tumores enteros a los que se les había extraído todo el tejido acinar adyacente posible, para evitar así posibles contaminaciones. Los tumores de, aproximadamente, 30-100 μg fueron homogenizados manualmente y la extracción se realizó mediante la utilización del *kit* RNeasy Plus (Qiagen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

El RNA fue tratado con DNasa usando un *kit* libre de RNasas (también de Qiagen) que nos permitió hacer la digestión del DNA en la misma columna de elución durante la purificación del RNA. La digestión con DNasa se hizo básicamente para evitar interferencias producidas por DNA genómico contaminante. La elución del RNA se realizó en dos pasos y se utilizaron 60 ml totales de H₂O destilada.

El RNA obtenido fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific), y la calidad del RNA fue validada mediante un gel de agarosa al 1%.

Obtención de cDNA a partir de mRNA

A partir del RNA obtenido de las muestras tumorales o de células, se procedió a la obtención de cDNA utilizando el *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) y siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Se partió de una muestra de 2 μg de RNA en cada caso.

PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Los estudios de RT-PCR de este trabajo fueron realizados a partir del cDNA de los distintos tumores mediante la tecnología Taqman (Applied Biosystems), utilizando las placas LDA (Low Density Arrays). Dichas placas contienen en el interior de cada uno de sus 384 pocillos los oligos específicos para cada gen a detectar y las sondas marcadas con los fluorocromos. La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó con el sistema ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems).

La PCR a tiempo real permite medir la cantidad de producto de PCR en cualquier momento de la reacción. Es una técnica que se basa en la utilización de una pareja de oligos específicos para un gen a confirmar y una sonda Taqman, una secuencia de DNA de unos 30 pares de bases que se anilla con el fragmento amplificado y que está marcada con dos fluorocromos. En el extremo 5' de la sonda está unido el fluorocromo informativo o *reporter* y en el extremo 3' se encuentra una molécula inhibidora de la fluorescencia o *quencher*. La fluorescencia del *reporter* no se detecta hasta que la polimerasa, con su actividad exonucleasa 5'→3' libera el *reporter* de la influencia del *quencher*, por tanto, la fluorescencia presente en cada pocillo de la placa depende en todo momento de la cantidad de producto final (Figura 17).

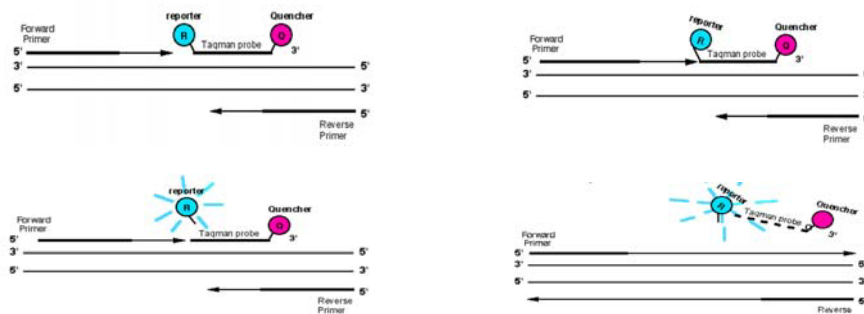


Figura 17. Esquema de PCR cuantitativa a tiempo real con tecnología Taqman.

Esta técnica permite marcar un umbral de fluorescencia en aquel punto de la amplificación donde todas las muestras están en fase exponencial y donde las pendientes para la amplificación de diferentes genes son paralelas (figura 18). El aparato indica cual es el ciclo en el que cada una de las diferentes muestras supera este umbral de fluorescencia (C_t = Threshold Cycle). Siguiendo el método del $\Delta\Delta C_t$ (extraído del boletín nº2 de Applied Biosystems), que se basa en el resultado de la diferencia del C_t obtenido por cada una de las muestras para el gen específico y del C_t obtenido por los genes controles (media de los C_t obtenidos por los genes Ppia, Mrpl19, Hprt1 y Gusb), y aplicando las fórmulas adecuadas, se pudieron calcular las diferencias de expresión entre tumores tratados con antiangiogénicos y controles no tratados.

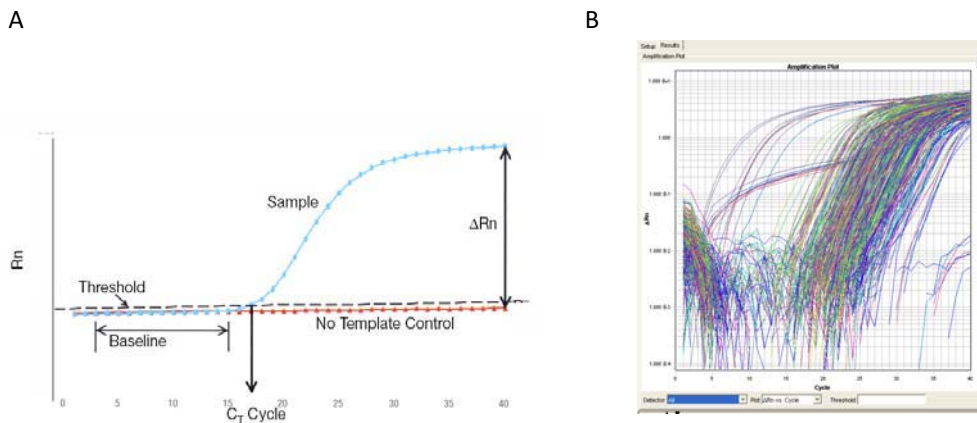


Figura 18. Curvas de amplificación A. Modelo de amplificación de una sola muestra, en el que se muestran los términos más utilizados en un estudio cuantitativo. Extraído del manual *Real Time PCR Systems Guide* (Applied Biosystems). **B.** Representación gráfica de la PCR a tiempo real usando el software MDS 2.2.2.

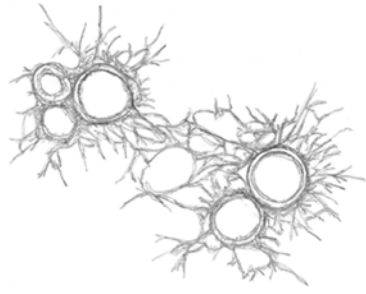
Mediante esta técnica, y utilizando oligos específicos para cada uno de los genes expresados diferencialmente, se analizaron 4 muestras tumorales por cada grupo de tratamiento. Tras aplicar las fórmulas adecuadas para seguir el método

$\Delta\Delta Ct$ se obtuvieron los niveles de expresión relativa para cada gen y se pudieron comparar los niveles de expresión entre tumores tratados (con las diferentes terapias) y los controles.

Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos en los distintos experimentos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS. Debido al pequeño tamaño muestral y a que no todos los datos seguían una distribución normal se realizaron los test no paramétricos más adecuados para cada ocasión: Kruskal-Wallis, Mann-Whitney o Chi-Cuadrado.

Para las gráficas de supervivencia Kaplan-Meier se realizó el Log Rank test como evaluador estadístico.



Resultados

Parte I

Caracterización de la resistencia a anti-VEGFR2

Como aproximación inicial a la terapia antiangiogénica buscamos un fármaco que produjese una inhibición exclusiva de la vía angiogénica más importante, la vía del VEGF. Se escogió el DC101, un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce y se une al VEGFR2 de ratón, impidiendo así, de manera selectiva, su activación y cuya eficacia había sido demostrada anteriormente (Casanovas et al., 2005). El DC101 actúa de un modo similar a uno de los primeros antiangiogénicos utilizados en la clínica, el Bevacizumab. Éste, al tratarse de un anticuerpo monoclonal humanizado, únicamente reconoce el VEGF circulante humano, por esa razón fue rechazado como posible fármaco para nuestros experimentos.

Realizamos diferentes pautas de tratamiento para estudiar diferentes aspectos que pudieran verse modificados tras la terapia.

Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2

Con el objetivo inicial de confirmar los efectos beneficiosos del DC101 como fármaco antiangiogénico realizamos un experimento de supervivencia, en el que se comparó la media de vida de ratones RIP-Tag2 Rag^{KO/KO} tratados con anti-VEGFR2 durante cuatro semanas con la de ratones controles no tratados.

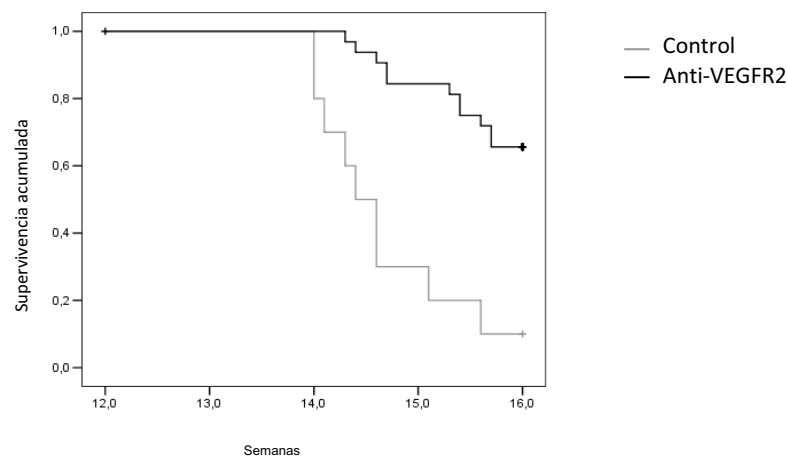


Figura 19. Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2. El 50% de los ratones control no llegó a las 14,3 semanas de edad, mientras que el 65% de los ratones RIP-Tag2 Rag^{ko/ko} tratados con DC101 llegaron a cumplir las 16 semanas de edad. Log Rank test $P < 0,000$.

Como se había descrito en estudios previos, pudimos comprobar que existía un aumento en la supervivencia de los ratones RIP-Tag2 Rag^{KO/KO} después de recibir tratamiento continuado con el antiangiogénico (figura 19). Todos los animales que llegaron hasta las 16 semanas fueron sacrificados en este punto del experimento.

Efectos en el volumen tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2

Para definir los efectos del tratamiento a corto y largo plazo y establecer diferencias entre ellos y con respecto a los animales controles no tratados, iniciamos un ensayo de regresión tratando a los ratones RIP-Tag2 Rag^{KO/KO} de 12 semanas de edad con DC101 durante una o cuatro semanas (figura 20).

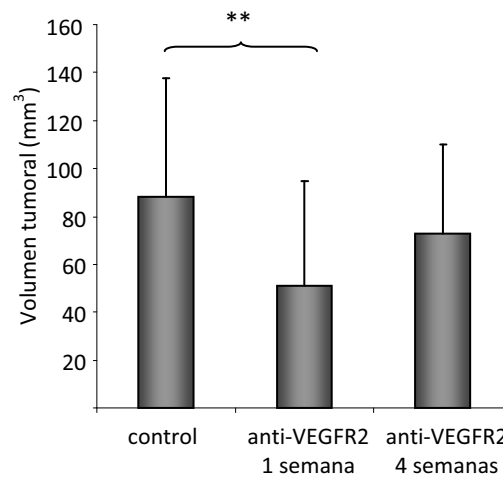


Figura 20. Disminución del volumen tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2 a corto plazo. Cuantificación del volumen tumoral donde se muestra su reducción tras el tratamiento durante una semana con DC101. Después de tratar a los ratones durante 4 semanas se observa un volumen tumoral similar al encontrado en los controles. **: $p < 0.01$ Test de Mann-Whitney. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Tras una semana de tratamiento se observó una disminución del volumen tumoral respecto a los ratones controles no tratados, lo que indicaba un efecto antitumoral del tratamiento. Cuando se analizó el volumen tumoral de los ratones

tratados durante 4 semanas consecutivas, pudimos observar un recrecimiento tumoral que provocó que el volumen tumoral por animal fuera comparable al encontrado en los controles no tratados. Esta progresión tumoral, que ya se había descrito en estudios previos, es debida a una reinducción de la angiogénesis y a un reestablecimiento de la vasculatura tumoral (Casanovas et al., 2005).

Efectos en el fenotipo tumoral tras el tratamiento con anti-VEGFR2

Tras observar los efectos en el volumen tumoral después de la terapia con anti-VEGFR2, realizamos una detenida observación a nivel histológico para poder detectar posibles cambios en el fenotipo tumoral.

Así, como primera aproximación, observamos los efectos del tratamiento sobre la vasculatura tumoral. Como se había descrito en estudios anteriores pudimos observar una disminución en el número de vasos tras una semana de tratamiento con DC101 (Figura 21).

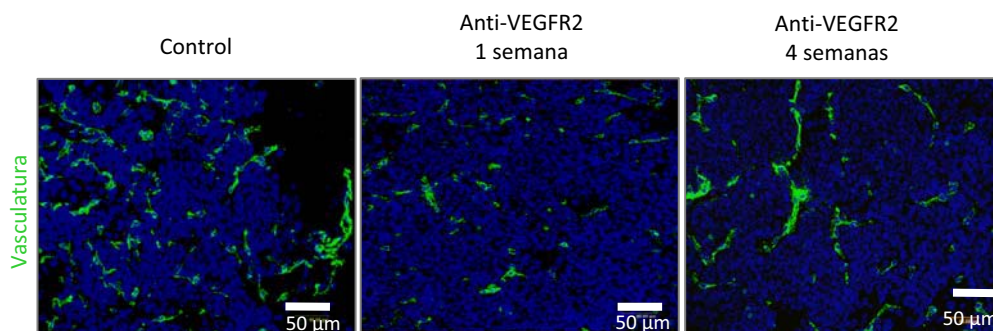


Figura 21. Efectos de la terapia anti-VEGFR2 en la vasculatura tumoral. Se puede observar una disminución en el número de vasos tumorales (marcados con CD31 en verde) tras una semana de tratamiento con DC101. Después del tratamiento de 4 semanas se observa un recrecimiento de la vasculatura en el interior del tumor.

Pero tras cuatro semanas de tratamiento con anti-VEGFR2 se percibió un recrecimiento de la vasculatura debido a una reinducción de la angiogénesis. Esta reinducción se ha descrito que es debida a la secreción de factores angiogénicos alternativos, como los de la familia del FGF (en particular FGF1, FGF2 y FGF7), angiopoyetina 1 o las efrinas, y es la que promueve el recrecimiento de la masa tumoral (Casanovas et al., 2005).

En estudios previos del grupo se describió que tras el tratamiento con DC101 se producía una resistencia que consistía no sólo en un recrecimiento de la vasculatura y, como consecuencia, del volumen tumoral, si no que también se daba un cambio en los tumores que promovía un fenotipo más agresivo (Casanovas et al., 2005).

En el presente estudio quisimos examinar detenidamente este cambio de fenotipo y realizar su cuantificación. Con esta finalidad, utilizamos las secciones de parafina, que conservan muy bien la morfología y permiten estudiar de manera detallada la estructura de los tejidos. A estas secciones se les realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

Basándonos en la clasificación realizada por Lopez y Hanahan (2002) clasificamos los tumores en tres categorías: Tumores encapsulados o no invasivos: cuando tenían los márgenes bien definidos y estaban envueltos por la cápsula de colágeno; tumores microinvasivos: cuando por una zona definida del margen se rompía la cápsula de colágeno y las células tumorales se introducían en forma de digitaciones en el tejido acinar adyacente; y tumores altamente invasivos: cuando ya no se podía definir el margen del tumor debido a que todos los frentes tenían células tumorales invadiendo el páncreas exocrino.

Observamos que los tumores provenientes de ratones RIP-Tag2 tratados con anti-VEGFR2 tenían un fenotipo mucho más invasivo, como se puede observar en la figura 22. En la vista general del tejido se diferenciaron bien los márgenes de los tumores y se determinó si éstos eran o no invasivos, y si lo eran en qué grado. Al

observar más detalladamente los bordes de los tumores, pudimos ver un gran número de células invadiendo el tejido acinar colindante en forma de digitaciones. Este fenómeno lo observamos tanto en el tratamiento de una como en el de cuatro semanas con DC101.

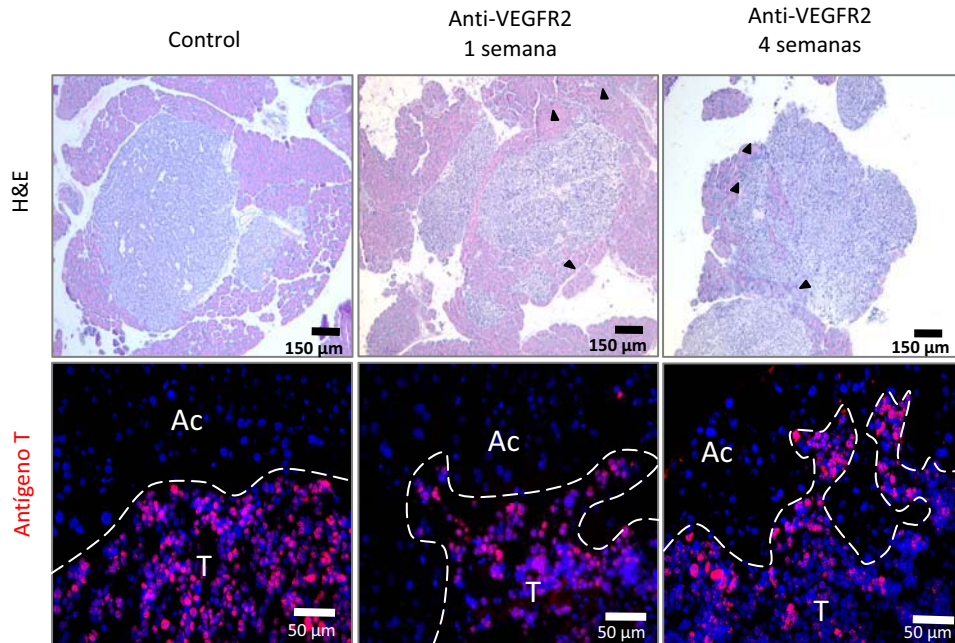


Figura 22. Incremento en la invasión después del tratamiento con DC101. En la fila superior se observan imágenes de H&E dónde se aprecia el incremento de invasión de los tumores después del tratamiento con anti-VEGFR2. Las flechas indican las áreas invasivas en forma de digitaciones. La fila inferior muestra imágenes de inmunofluorescencia a gran aumento (marcaje rojo: antígeno T; azul: núcleos). En los márgenes de los tumores se observan las células tumorales, marcadas en rojo, invadiendo el tejido acinar adyacente (T = Tumor; Ac = Tejido acinar).

Cuando cuantificamos la invasión y clasificamos los tumores en las tres posibles categorías, observamos que los tumores provenientes de ratones no tratados presentaban una media del 43% de tumores encapsulados o no invasivos, un 51% de tumores con áreas focales de invasión y un porcentaje muy bajo, un 6%,

de tumores altamente invasivos (Figura 23). Pero tras tratar con anti-VEGFR2, ya fuera durante una o cuatro semanas, los porcentajes medios de cada tipo de tumor cambiaron de manera sorprendente. Se observó una disminución del número de tumores encapsulados, que pasó a ser de menos del 5% en ambos grupos de tratamiento (4,9% en el tratamiento a corto plazo y 3,6% en el tratamiento largo), y un espectacular aumento en el porcentaje de tumores altamente invasivos, que pasó a tener frecuencias de más del 50% (54% en tratamiento con DC101 durante una semana y 62% en el tratamiento durante 4 semanas).

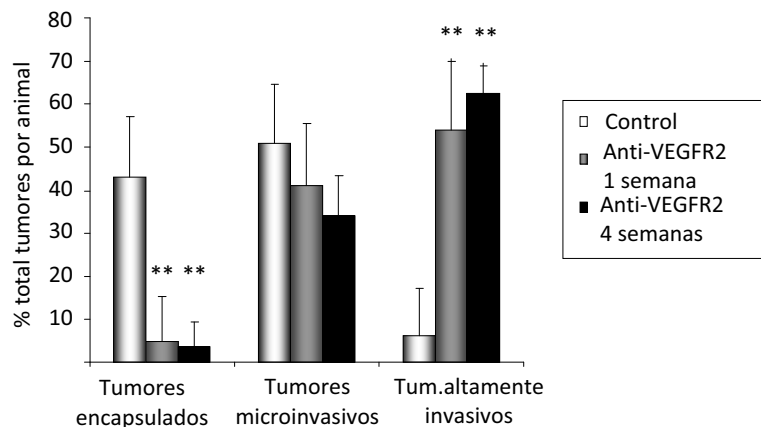


Figura 23. Incremento de la invasión local tras el tratamiento con anti-VEGFR2. El gráfico muestra una disminución del porcentaje de tumores encapsulados y un aumento del porcentaje de tumores altamente invasivos después del tratamiento durante 1 ó 4 semanas con DC101. ** $p < 0.01$ para el test de Kruskal-Wallis. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los cambios sufridos en ambas categorías fueron estadísticamente significativos para el test de Kruskal-Wallis. La incidencia de tumores microinvasivos no sufrió variaciones significativas tras el tratamiento con DC101 ni a corto, ni a largo plazo.

Así confirmamos los resultados previos, afirmando este cambio fenotípico hacia una forma más invasiva del tumor, que parecía ser promovida por el tratamiento con anti-VEGFR2.

Estudio de la reversibilidad del fenotipo invasivo

Con la finalidad de comprobar si existía una reversión en el fenotipo invasivo de los tumores tras parar el tratamiento antiangiogénico, tratamos ratones RIP-Tag2 Rag^{ko/ko} de 12 semanas de edad durante una semana con anti-VEGFR2 y a continuación les dejamos un periodo de reposo de 1, 2 ó 3 semanas tras el cual se procedió al sacrificio de los animales. Asimismo, para descartar que la invasión incrementara con la edad, también mantuvimos ratones controles no tratados hasta los mismos puntos de edad de sacrificio (Figura 24). Tras hacer el recuento de tumores y clasificarlos en las tres categorías anteriormente descritas, observamos que la invasión era independiente de la edad de los ratones, ya que no se observaron cambios significativos en la frecuencia de invasión entre ratones de diferentes grupos de edad.

También pudimos confirmar que la invasión después del tratamiento con anti-VEGFR2 es un fenómeno irreversible, ya que el bajo porcentaje de tumores no invasivos y el elevado porcentaje de tumores altamente invasivos se mantenía después de una semana de tratamiento aunque se hubieran llevado a cabo 1, 2 ó 3 semanas de reposo.

Esto nos hizo pensar que los cambios que promueven que los tumores adopten un fenotipo más agresivo se dan en estadios tempranos del tratamiento con DC101 y que una vez se ha producido dicho cambio, este se mantiene aunque se pare la terapia y se recupere la vasculatura y el crecimiento tumoral.

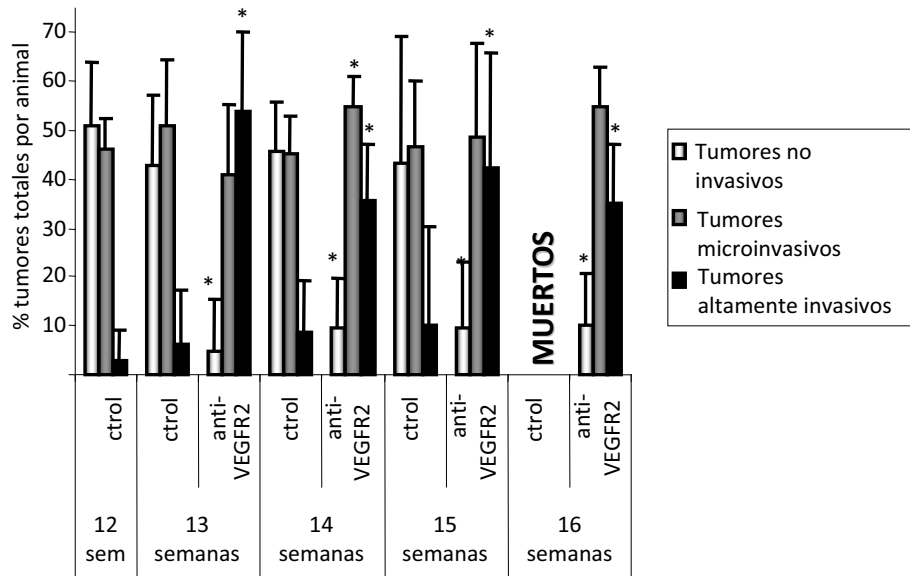


Figura 24. Irreversibilidad de la invasión. En la gráfica se muestra el porcentaje de tumores no invasivos (barras blancas), microinvasivos (barras grises) y altamente invasivos (barras negras) por cada tratamiento y punto de edad de los ratones. Todos los grupos de tratamiento mostraron diferencias significativas con respecto a los controles no tratados de la misma edad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Pero pese a la confirmación de la proinvasión y el incremento de malignidad por parte de los tumores después de la terapia con DC101, con este experimento también se hicieron patentes los efectos beneficiosos de la terapia anti-VEGFR2, ya que constatamos un incremento en la supervivencia después de tan sólo una semana de tratamiento con DC101.

Mientras ninguno de los ratones del grupo control llegó a las 16 semanas de edad, el 50% de los ratones que habían recibido tratamiento sí llegaron a dicha edad (Figura 25).

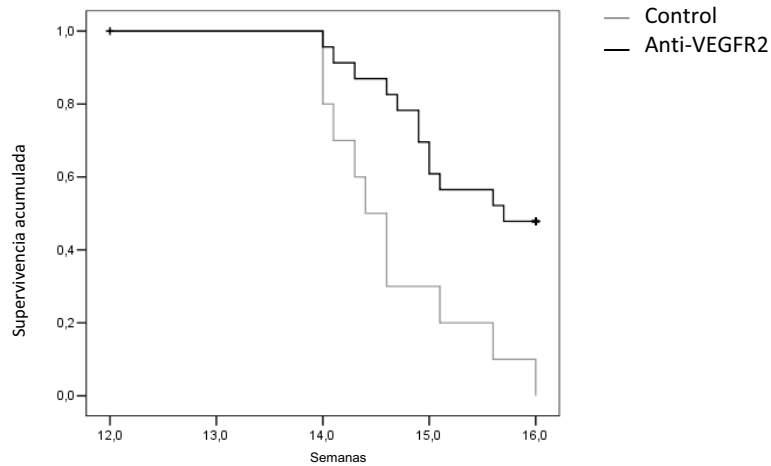


Figura 25. Incremento en la supervivencia tras una semana de tratamiento con anti-VEGFR2. El 50% de los ratones control no llegó a las 14,3 semanas de edad, mientras que el 50% de los ratones RIP-Tag2^{ko/ko} que habían recibido tratamiento con DC101 durante sólo una semana y después habían estado en periodo de reposo del tratamiento, llegaron a cumplir las 16 semanas de edad. Log Rank test $P < 0,007$

Incremento de la invasión en tumores portadores de una delección en el gen *Vegf-A*

Para corroborar la hipótesis que el aumento de invasión y el cambio de fenotipo por parte de los tumores tratados eran el resultado de la inhibición de la vía proangiogénica VEGF/VEGFR2, quisimos observar cual era el fenotipo y el grado de invasión en el caso de una disrupción génica de la vía del VEGF. Para alcanzar dicho objetivo, nos pusimos en contacto con el Dr. Masahiro Inoue del Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases (Osaka, Japón), cuyo grupo trabaja con ratones RIP-Tag2 con una delección específica para las células tumorales del gen *Vegf-A* mediante el sistema Cre-loxP. En estudios anteriores habían demostrado que los ratones RIP-Tag2/Cre;Vegf-A^{fl/fl} (β -VEGF-KO) mostraban una dramática supresión de la angiogénesis y una inhibición del desarrollo y el volumen tumoral (Inoue et al., 2002), como se ve reflejado en la fila inferior de la figura 26,

dónde se observa una reducción en el número de vasos en el interior de tumores provenientes de ratones β -VEGF-KO.

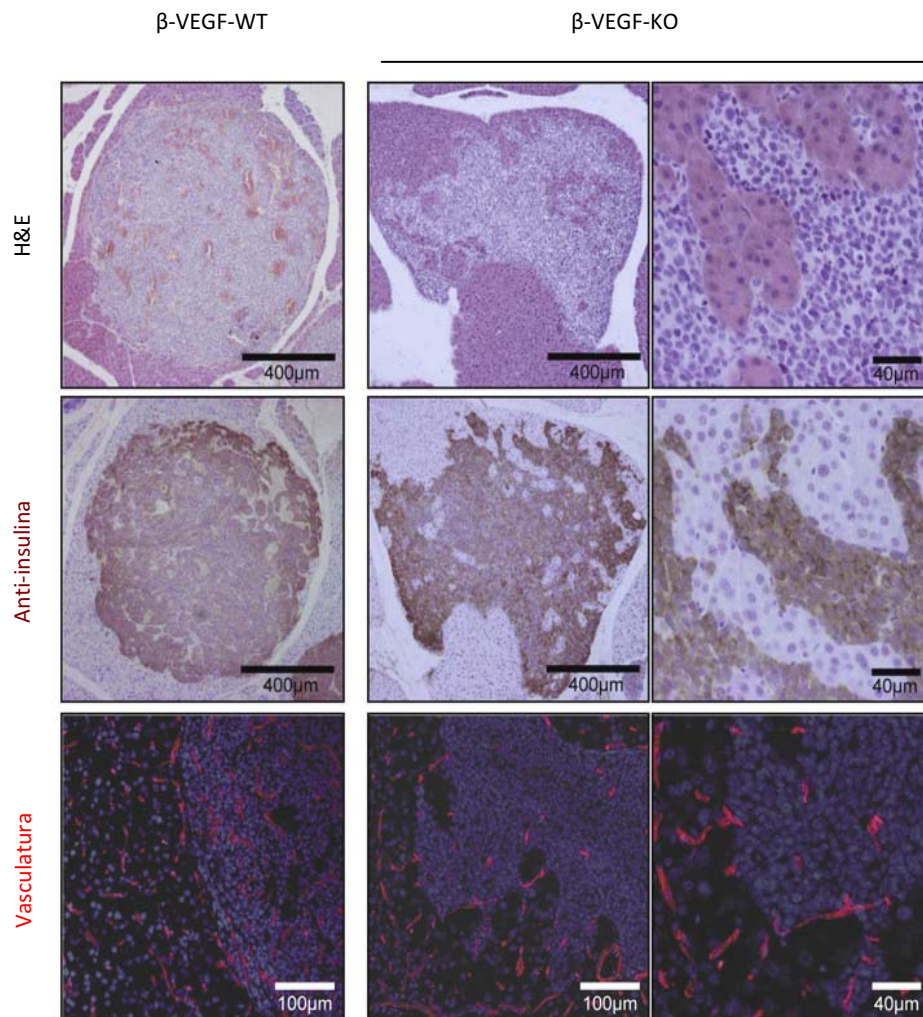


Figura 26. Incremento de la invasión tras la delección específica para tumor del gen *Vegf-A*. Fila superior: Imágenes de H&E en las que se muestran lesiones de ratones RIP-Tag2 β -VEGF-WT (panel izquierdo) y β -VEGF-KO (paneles central y derecho). Fila central: Inmunotinción para la insulina expresada por las células tumorales realizada en secciones seriadas de las imágenes de H&E. Fila inferior: Tinción de la vasculatura mediante anti-CD31 (rojo). Núcleos teñidos con DAPI (azul). Las imágenes de la columna derecha muestran magnificaciones de las imágenes de los paneles centrales.

Al realizar un estudio histológico detallado de las lesiones β -VEGF-KO pudimos observar que los tumores tenían bordes mucho más irregulares y eran más invasivos, en comparación con los tumores provenientes de ratones RIP-Tag2/Cre;Vegf-A^{+/+} (β -VEGF-WT) (Figura 26).

Cuando se cuantificó la invasión según las tres categorías tumorales, observamos que los tumores β -VEGF-WT que provenían del laboratorio del Dr. Inoue, tenían un porcentaje muy similar en los tres tipos tumorales que los tumores RIP-Tag2 no tratados de nuestro laboratorio (aproximadamente 40% de tumores encapsulados, 50% de tumores microinvasivos y 10% de tumores altamente invasivos).

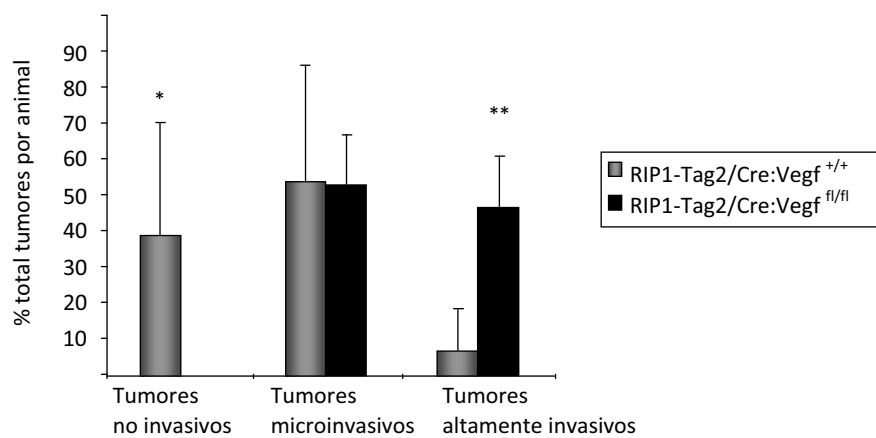


Figura 27. Incremento en el número de tumores altamente invasivos en el modelo RIP-Tag2 β -VEGF-KO. Cuantificación de la invasión representada por la frecuencia de cada categoría tumoral en ratones RIP-Tag2 β -VEGF-KO (barras negras) y β -VEGF-WT (barras grises) a las 13 semanas de edad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Cuando se analizó la invasión de los tumores provenientes de ratones RIP-Tag2 β -VEGF-KO no se observó ningún tumor encapsulado, todos los encontrados fueron en más o menos medida invasivos: el 53% fueron microinvasivos, y el 47%

altamente invasivos. Y esto ocurría también incluso en los tumores de menor tamaño (figura 27).

Con estos resultados procedentes del laboratorio de Osaka, pudimos confirmar nuestras sospechas de que la especificidad de la invasión viene dada por la interrupción específica de la vía VEGF/VEGFR.

Efectos de la terapia anti-VEGFR2 en la diseminación a órganos distantes

Generalmente, el incremento de invasión tumoral local está relacionado con una mayor incidencia de metástasis a otros órganos. Por ésta razón decidimos comprobar si la invasión por vía linfática y por vía hematógena también se había visto alterada e incrementada después del tratamiento con anti-VEGFR2.

Como primera aproximación diseñamos un experimento en el que utilizamos ratones RIP-Tag2 de 10 semanas de edad (ensayo de intervención), a los cuales tratamos con DC101 durante 10 días y a continuación les dejamos en periodo de reposo, sin tratamiento, hasta que cumplieron las 16 semanas de edad, momento en que fueron sacrificados por dislocación cervical junto con controles no tratados de la misma edad. Decidimos empezar más tempranamente la terapia debido a la corta vida de los ratones RIP-Tag2, así, alargábamos el tiempo tras haber recibido el tratamiento en más de un mes, y alargábamos el tiempo para poder observar una posible metástasis.

Ya en el momento de la necropsia de los ratones, el primer órgano afecto de metástasis que observamos fue el ganglio linfático peripancreático. Éste se encuentra situado en el punto de unión entre el páncreas y la red mesentérica, formada principalmente por tejido conjuntivo y rica en vasos sanguíneos y linfáticos. Dicha red une al estómago y al intestino con las paredes posteriores del abdomen, dando así un posicionamiento a éstos órganos digestivos. En ausencia de metástasis

se observan dos pequeños nódulos de aproximadamente 1 mm de diámetro de color blanco.

Los animales tratados durante 10 días con anti-VEGFR2, aunque hubieran estado durante más de cuatro semanas sin tratamiento, presentaban el ganglio linfático peripancreático hemorrágico y con un tamaño mucho más aumentado del habitual. La presencia de células tumorales en el interior del nódulo fue confirmada mediante inmunohistoquímica para el antígeno T (figura 28).

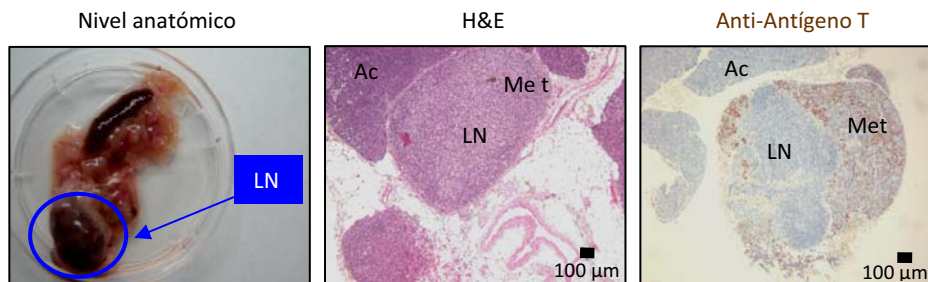


Figura 28. Incremento en la invasión a nódulo linfático. El nódulo linfático (marcado con un círculo) aparece agrandado a nivel anatómico. En la imagen de H&E se observa más masa ganglionar que se corresponde con zonas positivas para la tinción con antígeno T. (Ac: tejido acinar, LN: nódulo linfático, Met: metástasis).

Tras realizar la cuantificación de animales con presencia o ausencia de nódulo linfático infiltrado por células tumorales, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos animales tratados con DC101 durante 10 días y los controles, presentando los animales tratados 4 veces más metástasis en nódulo linfático que los controles, con un riesgo relativo de 4,3 [1,5-12,4] (95% de intervalo de confianza) (Figura 29).

En el caso de cáncer de páncreas humano, el lugar con mayor prevalencia para las metástasis es el hígado, razón por la cual decidimos realizar un detenido estudio de dicho órgano en animales tratados respecto a controles.

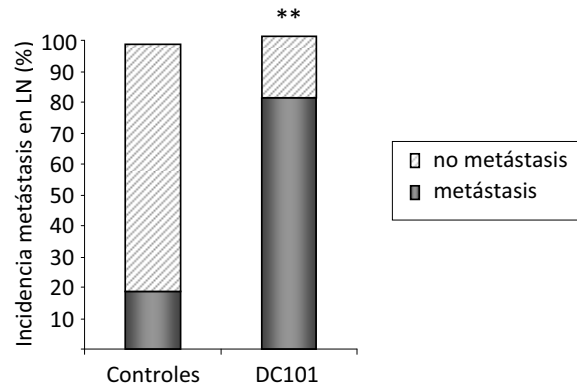


Figura 29. Invasión a nódulo linfático incrementada en tratados. Cuantificación de la invasión a nódulo linfático que indica un incremento de ocurrencia en animales tratados con anti-VEGFR2. ** $p < 0,01$ para el test de Chi cuadrado.

Se detectaron mediante tinción de H&E micrometástasis en el hígado, que posteriormente fueron confirmadas mediante tinción específica para el antígeno T (figura 30).

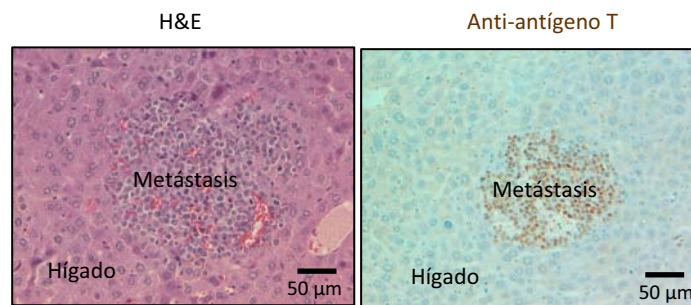


Figura 30. Incremento de invasión a hígado. Se observa un aumento de micrometástasis en el parénquima hepático en animales tratados con anti-VEGFR2. Imagen de una micrometástasis teñida con H&E, y confirmada mediante tinción específica para el antígeno T.

En este caso, tras realizar el recuento de micrometástasis en hígado en ratones tratados y controles, se observó que los animales tratados con anti-VEGFR2 presentaban un riesgo relativo de 2 [1,1-3,7] (95% intervalo de confianza), es decir, los tratados con DC101 presentaban el doble de casos de micrometástasis respecto a controles no tratados (figura 31). Asimismo el número de lesiones por hígado también se vio incrementado 2,7 veces.

Tras la obtención de estos resultados pudimos comprobar que el aumento de malignidad después del tratamiento con un inhibidor de la vía VEGF/VEGFR no afectaba únicamente de manera local a los tumores, si no que

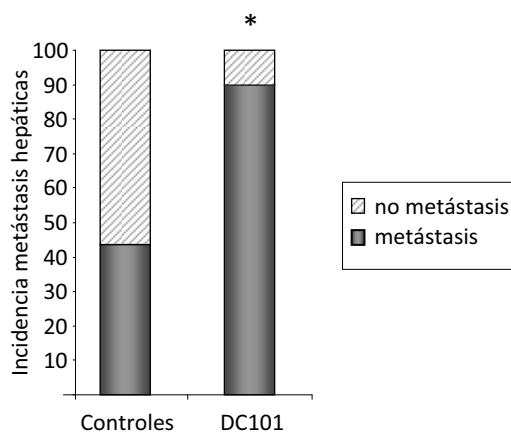


Figura 31. Aumento de metástasis hepáticas en ratones tratados con DC101. Cuantificación de micrometástasis en hígado, que se ve incrementada en animales tratados con el anticuerpo DC101. * $p < 0,05$ para el test de Chi cuadrado.

también se veía incrementado el número de metástasis a órganos distantes. Otra interesante observación vino dada por el hecho que el 43% de los ratones controles presentaran microlesiones en el hígado, esto nos hizo suponer que el tratamiento antiangiogénico no promueve la metástasis en sí en este modelo en particular, si no que la acelera, facilitando su más temprana aparición en ratones que han recibido tratamiento.

Fenómeno de la vasoinvasión

Una cuestión interesante acerca en la invasión y la metástasis es saber como llegan las células desde el tumor primario hasta el órgano donde se producirá la metástasis. Durante el estudio de las secciones parafinadas pudimos observar que en algunas de ellas se producía vasoinvasión: un grupo reducido de células se encontraba en el interior de los vasos junto a la lámina de células endoteliales (figura 32).

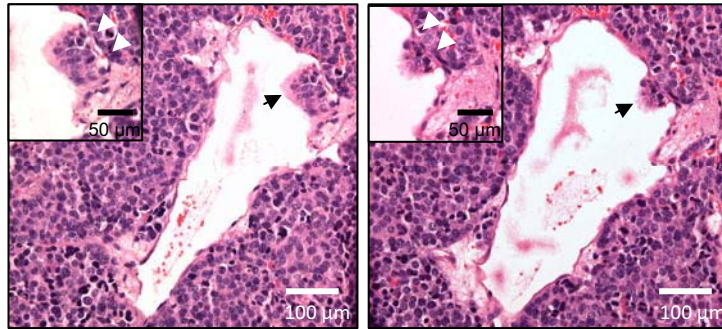


Figura 32. Vasoinvasión de un pequeño grupo de células. Tinción de H&E de un tumor tratado con anti-VEGFR2 mostrando un vaso dilatado en el interior del parénquima tumoral con un pequeño grupo de células tumorales (flechas negras) en su interior (vasoinvasión). Los paneles muestran secciones seriadas de un mismo tumor. En el recuadro interior se observa una imagen magnificada de las células invasoras.

La observación de las secciones de los hígados nos permitió descubrir que este fenómeno de extravasación también lo podíamos encontrar en los vasos presentes en el parénquima hepático, donde se apreciaban claramente grupos de células tumorales (algunos de ellos con un número considerable de células) en el interior de los vasos o incluso invadiendo el parénquima hepático (figura 33).

Este hecho parecía indicarnos que la invasión a órganos distantes tenía lugar de manera preferente mediante grupos de células, que mantenían fuertemente sus uniones célula-célula.

Estos grupos celulares, que parecían producir un embolismo en los vasos del parénquima hepático, los encontramos tanto en animales tratados como en controles. La observación de este fenómeno parecía mostrarnos que este tipo de invasión no venía dado por el tratamiento, si no que éste únicamente lo aceleraba.

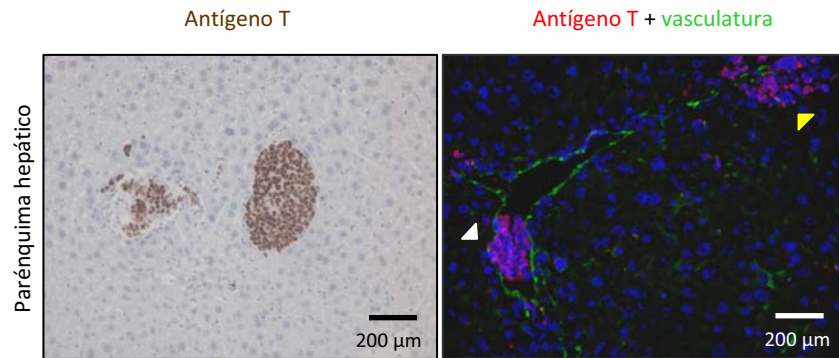


Figura 33. Presencia de células tumorales en vasos del hígado. Panel izquierdo: Immunohistoquímica para el antígeno T que muestra grupos de células positivas para el oncogen en el interior de los vasos del parénquima hepático. Panel derecho: La flecha blanca señala células tumorales (marcadas en rojo) en el interior de un vaso (marcaje verde para CD31). La flecha amarilla muestra un grupo de células que han iniciado la extravasación hacia el interior del tejido desde el vaso.

Parte II

Relevancia clínica de los efectos producidos por la inhibición de la angiogénesis: utilización de sunitinib

Tras la obtención de los sorprendentes resultados en la inhibición específica para el VEGFR2 con un anticuerpo monoclonal (DC101), decidimos cambiar el fármaco antiangiogénico utilizado y comprobar si esta respuesta adaptativa continuaba ocurriendo. Escogimos un potente inhibidor de la angiogénesis, el sunitinib (Pfizer Inc.), fármaco actualmente utilizado en la clínica para el tratamiento de diversas neoplasias. Sunitinib bloquea de manera eficaz la señalización de los receptores VEGFR y PDGFR, entre otros receptores tirosina quinasa, una combinación que había sido estudiada anteriormente, y que había demostrado ser más efectiva que la inhibición individual de la vía de VEGFR, debido a que la diana de dicha terapia no son únicamente las células endoteliales, sino también los pericitos que las acompañan (Bergers et al., 2003; Pietras and Hanahan, 2005).

Reversión tras el tratamiento interrumpido con sunitinib

Nuestro primer objetivo fue comprobar si una inhibición mucho más potente de la angiogénesis durante un corto plazo de tiempo y un posterior periodo de descanso, también producía incrementos en la invasión y metástasis como habíamos descrito en el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR2. Para realizar dicho cometido tratamos ratones RIP-Tag2 de diez semanas de edad durante catorce días consecutivos con sunitinib y a continuación les dejamos cuatro semanas de descanso. Transcurrido dicho tiempo sacrificamos los ratones por dislocación cervical juntamente con controles a los que se les había administrado placebo. El sunitinib se administró a dosis de 40 mg/kg/día.

Cuando realizamos el estudio histológico pudimos observar que los tumores provenientes de ratones tratados presentaban importantes digitaciones que invadían el tejido acinar adyacente de una manera muy similar a la observada anteriormente en el estudio con DC101 (figura 34 A). Tras realizar el recuento de tumores por animal y clasificarlos en las tres categorías descritas, pudimos

comprobar que se daba el mismo comportamiento general, el porcentaje de tumores no invasivos se reducía de manera drástica, y el de tumores altamente invasivos se veía aumentado a más del 60% (figura 34 B).

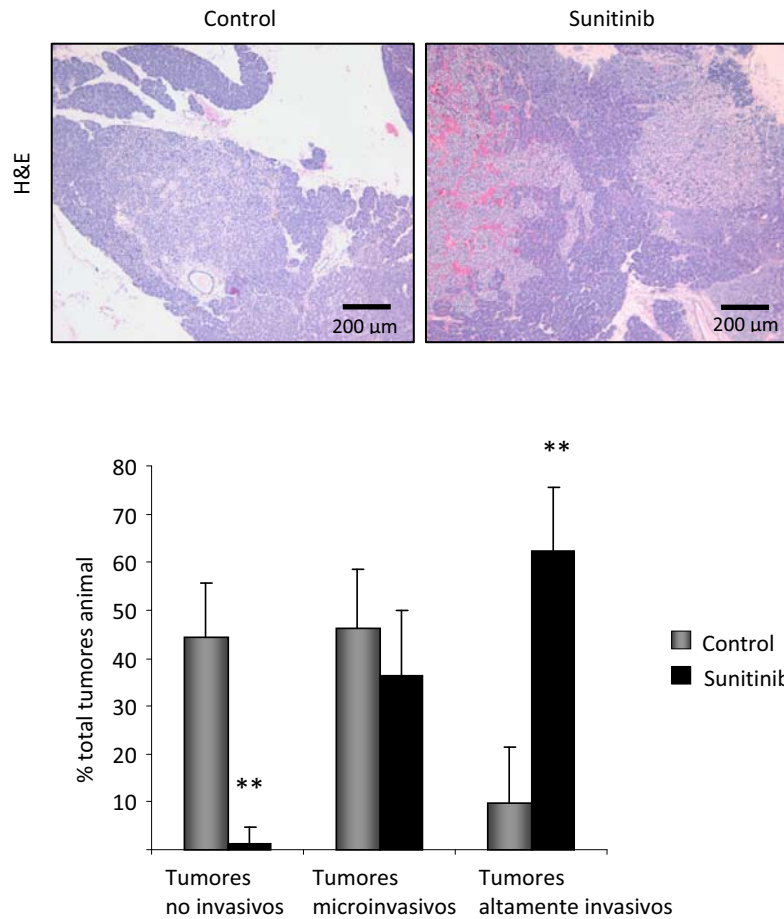


Figura 34. Incremento en la invasión tumoral después del tratamiento a tiempo corto con sunitinib. A. Imágenes de H&E dónde se aprecia la mayor agresividad de los tumores tratados. **B.** El gráfico muestra una disminución del porcentaje de tumores encapsulados por animal y un aumento del porcentaje de tumores altamente invasivos después de haber realizado tratamiento durante catorce días con sunitinib y haber estado durante un mes de descanso. $**p < 0.01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Cuando centramos nuestra atención en la invasión a órganos distantes (nódulo linfático peripancreático e hígado) pudimos observar que ésta también se veía incrementada en ambos casos tras el nuevo tratamiento de 2 semanas con sunitinib seguido de un periodo de cuatro semanas de descanso. Aunque esta vez las diferencias no fueron estadísticamente significativas, si demostraron una interesante tendencia (figura 35).

Todos estos resultados nos demostraron que la inhibición durante 2 semanas de la angiogénesis con sunitinib promovía el mismo comportamiento proinvasivo que la terapia con DC101.

Así, nos formulamos la pregunta de si éste comportamiento podría deberse a un efecto rebote producido por la interrupción del tratamiento, y quisimos estudiar si estos resultados se producirían también tras una inhibición constante de la angiogénesis. Una terapia que no cesa tiene mucha más relevancia clínica, ya que es de manera continua como se administra el sunitinib en pacientes, por tal razón decidimos tratar ratones RIP-Tag2 de manera ininterrumpida durante cinco semanas.

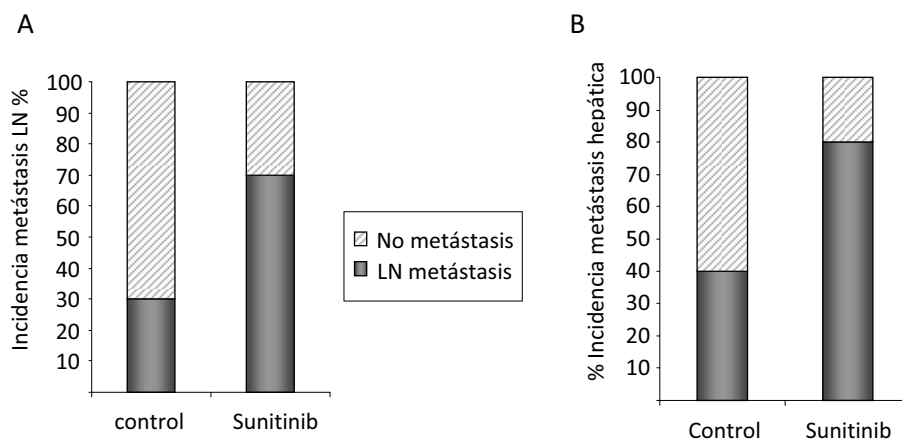


Figura 35. Invasión a órganos distantes incrementada tras el tratamiento interrumpido con sunitinib. Tras catorce días de tratamiento con sunitinib y un mes de periodo de descanso, vemos que la tasa de animales con metástasis a nódulo linfático (A) y el número de micrometástasis en hígado (B) se ven incrementados.

Incremento en la supervivencia tras el tratamiento continuo con sunitinib

Con la finalidad de probar los efectos beneficiosos del sunitinib en el tratamiento de tumores, se administró sunitinib de manera continuada a ratones RIP-Tag2 de diez semanas de edad (momento en que aparecen los tumores sólidos), de un modo similar a como se efectúan los tratamientos en la clínica. El tratamiento continuado con sunitinib fue realizado por el laboratorio del Dr Douglas Hanahan en la University of California San Francisco (UCSF).

Con dicho experimento, pudimos observar un marcado beneficio en lo referido a supervivencia en los animales tratados con sunitinib de manera continua respecto a los ratones a los que se les administró placebo (figura 36).

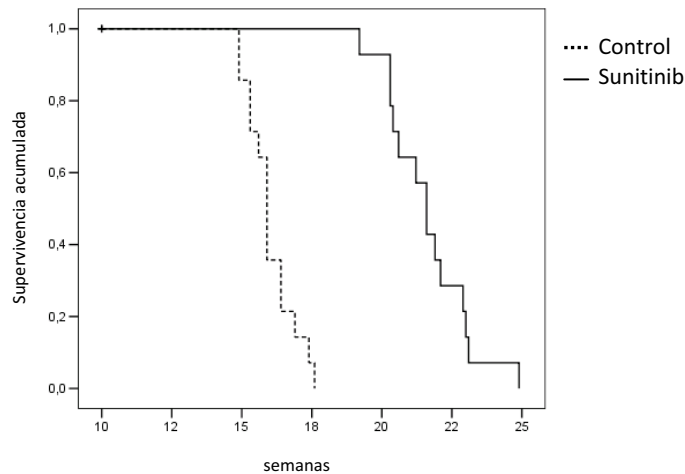


Figura 36. Incremento en la supervivencia tras el tratamiento continuo con sunitinib. El 50% de los ratones RIP-Tag2 tratados de manera continua con sunitinib llegaron a las 21 semanas de edad, frente a las 15,5 semanas de edad media de supervivencia de los ratones a los que les fue administrado placebo. Log Rank test $P < 0,000$.

Efectos en el volumen tumoral tras el tratamiento con sunitinib

Para poder definir mejor la eficacia del sunitinib como fármaco antitumoral se diseñó un experimento en el que se trataron con sunitinib ratones RIP-Tag2 de 10 semanas de edad durante 5 semanas consecutivas a dosis de 40mg/kg/día. Este tratamiento fue realizado por el equipo del Dr Douglas Hanahan.

A las 15 semanas de edad se procedió al sacrificio de los ratones y se realizó la medición del volumen tumoral. Pudimos comprobar una reducción del 65% en el volumen tumoral tras el tratamiento con sunitinib en comparación con los ratones a los que se les había administrado placebo (figura 37) mostrando un efecto antitumoral mucho más marcado que el obtenido con la terapia con anti-VEGFR2 (comparativa figuras 37 (sunitinib) y 20 (DC101)).

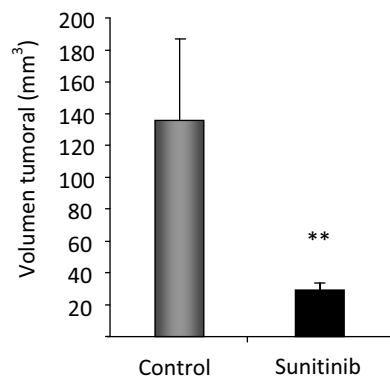


Figura 37. Disminución del volumen tumoral tras el tratamiento con sunitinib. Cuantificación del volumen tumoral donde se muestra una reducción de éste tras el tratamiento durante cinco semanas consecutivas con sunitinib. **: $p < 0.01$ Test de Mann-Whitney. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Efectos en el fenotipo tumoral tras el tratamiento con sunitinib

A continuación quisimos comprobar si en el tratamiento con un fármaco antiangiogénico multidiana inhibidor de quinasas se observaban resultados similares, en lo que respecta a evolución de la vasculatura e invasión, a los

obtenidos en el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR2 DC101. Para ello se realizó una detenida observación histológica de las muestras provenientes de ratones RIP-Tag2 tratados durante 5 semanas consecutivas con sunitinib, con el objetivo de detectar posibles cambios en su fenotipo.

Cuando estudiamos la vasculatura, pudimos observar una espectacular disminución del número de vasos presentes en el interior del tumor (figura 38). Éstos resultados, que ya habían sido descritos en estudios anteriores (Pietras and Hanahan, 2005), presentaban al sunitinib como un antiangiogénico mucho más eficaz que el anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2 (DC101), ya que tenía un efecto sobre la vasculatura mucho más marcado, que promovía a su vez un mejor y más potente efecto antitumoral y una mayor supervivencia.

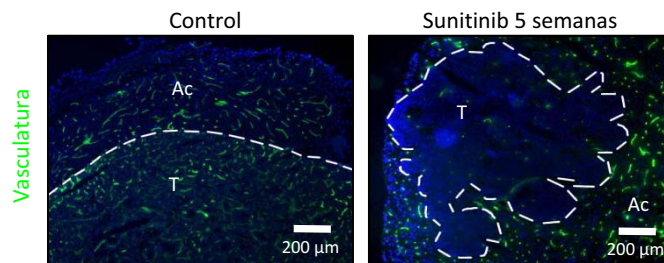


Figura 38. Efectos del tratamiento con sunitinib en la vasculatura tumoral. Se puede observar una drástica disminución en el número de vasos (marcados con CD31 en verde) tras cinco semanas de tratamiento con sunitinib. (T = Tumor; Ac = Tejido acinar).

Esto nos hizo pensar que tal vez al producirse una inhibición mucho más potente de la angiogénesis, no se llevarían a cabo los incrementos de invasión local y metástasis, ya que tras cinco semanas de tratamiento aún podíamos observar un enérgico efecto antitumoral y antivascular; a diferencia de lo que ocurría con el tratamiento con anti-VEGFR2, que tras cuatro semanas de tratamiento consecutivo, ya se apreciaban reversiones en el volumen tumoral y en la

vasculatura presente en los tumores (comparativa de figuras 37 y 38 (sunitinib) vs. 20 y 21 (DC101))

Pero estas esperanzas de ausencia de resistencia adaptativa al nuevo tratamiento, se vieron truncadas tras el estudio de las secciones parafinadas, dónde comprobamos que, como habíamos visto anteriormente con el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR2, el nuevo antiangiogénico multidiana también promovía un incremento de la invasión local (figura 39).

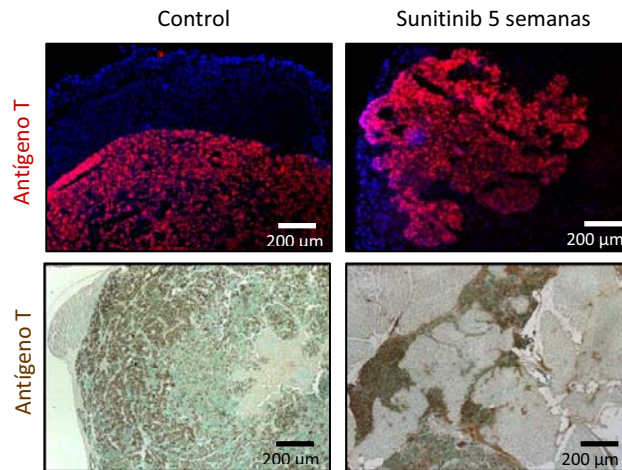


Figura 39. Incremento en la invasión después del tratamiento continuado con sunitinib. En la fila superior se observan imágenes de inmunofluorescencia (marcaje rojo: Antígeno T; azul: núcleos). En los márgenes de los tumores se observan las células tumorales, marcadas en rojo, invadiendo el tejido acinar adyacente. La fila inferior muestra imágenes de una inmunohistoquímica para el antígeno T (marcaje marrón) dónde se aprecia el elevado grado de invasión en forma de digitaciones después del tratamiento.

Los tumores, después de haber recibido tratamiento con sunitinib durante 5 semanas consecutivas, formaban grandes frentes de invasión en forma de digitaciones, que se adentraban en el tejido acinar colindante.

Tras realizar el recuento de tumores y clasificarlos en las tres categorías, pudimos comprobar que, de nuevo, se daba un cambio a un fenotipo más agresivo, aumentando el porcentaje de tumores altamente invasivos por animal y disminuyendo el de tumores encapsulados (figura 40).

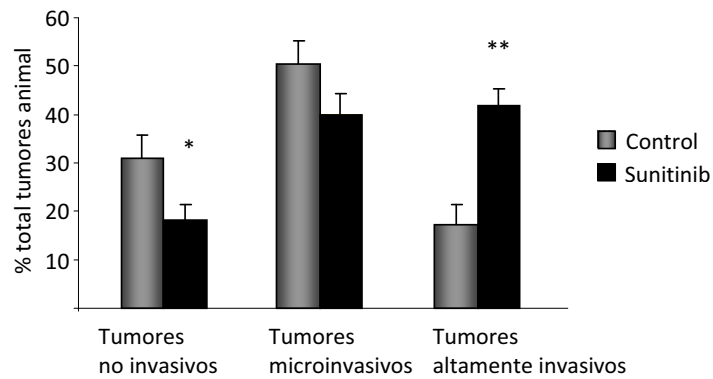


Figura 40. Incremento de la invasión local tras el tratamiento continuado con sunitinib. El gráfico muestra una disminución del porcentaje de tumores encapsulados y un aumento del porcentaje de tumores altamente invasivos después del tratamiento durante 5 semanas con sunitinib. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Con los resultados obtenidos con el inhibidor multidiana sunitinib, pudimos comprobar que pese a que la inhibición de la angiogénesis era mucho más potente y se mantenían los efectos antivascuales y antitumorales, la resistencia adaptativa en forma de incremento de invasión por parte de los tumores se continuaba produciendo de la misma manera que habíamos observado anteriormente, indicándonos un cambio en el fenotipo tumoral aunque la potencia de la inhibición de la angiogénesis aún siguiera vigente.

Efectos de la terapia con sunitinib en la metástasis a hígado y nódulo linfático

Con tal de continuar con nuestro estudio acerca de la respuesta adaptativa a una inhibición de la angiogénesis por parte de un inhibidor de receptores tirosina

quinasa, estudiamos también en este caso la invasión y diseminación linfática a nódulo linfático peripancreático, y hematógena a hígado (figura 41).

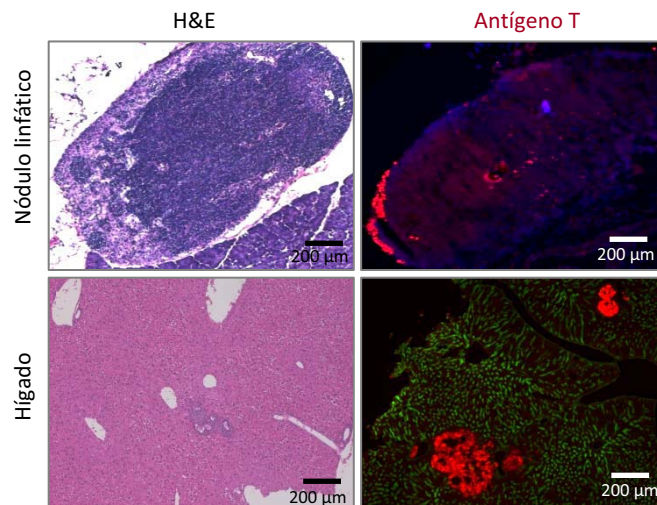


Figura 41. Invasión a nódulo linfático e hígado. En la columna de la izquierda se observa una tinción H&E de un nódulo linfático infiltrado por células tumorales y un hígado con micrometástasis. En la columna de la derecha se muestran inmunofluorescencias que confirman las metástasis mediante la tinción específica para el antígeno T (en rojo). Marcaje rojo: Antígeno T; azul: núcleos; verde: vasculatura.

El análisis cuantitativo reveló una incidencia similar en metástasis a nódulo linfático en animales controles y tratados con sunitinib a tiempo continuo durante cinco semanas (figura 42 A). Este dato difería al observado en el tratamiento con DC101 y con sunitinib a corto plazo (figuras 29 [DC101] y 35 A [sunitinib a corto plazo]).

El recuento de micrometástasis fue realizado mediante tinciones de H&E, que más tarde fueron confirmadas por inmunotinciones para el oncogen antígeno T (figura 41). Contrariamente a la falta de efecto sobre los niveles de metástasis linfática, sí observamos un incremento en el número de ratones que presentaban metástasis hematógena a hígado tras el tratamiento.

El número de animales con micrometástasis hepáticas experimentó un incremento estadísticamente significativo en el grupo de ratones tratados respecto al de controles a los que les fue administrado placebo, con un riesgo relativo de 3,5 [0,8-14.3] (95% de intervalo de confianza) (figura 42 B).

Cuando se cuantificó el número de microlesiones por animal, se observó que éstas incrementan 3,7 veces en animales tratados respecto a controles.

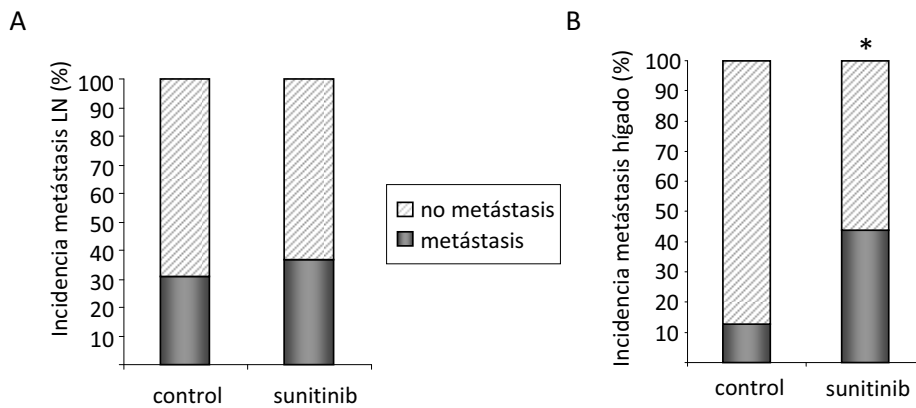


Figura 42. Cambios en la invasión a órganos distantes tras el tratamiento con sunitinib. Tras cinco semanas de tratamiento con sunitinib vemos que la tasa de animales con metástasis a nódulo linfático no varía (A), mientras que el número de micrometástasis en hígado se ve aumentado más del doble (B). * $p < 0,05$ para el test Chi-cuadrado.

Parte III

Efectos de la inhibición de vías angiogénicas independientes de VEGF: Estudio de la inhibición de Semaforina 4D

Tras realizar los experimentos con los inhibidores de la vía de VEGF optamos por comprobar cual era el efecto de una inhibición de la angiogénesis por otras vías VEGF-independientes. Pensamos que tal vez de esta manera, aunque se produjera una inhibición mucho menor de la angiogénesis, no se darían los efectos negativos referentes a invasión local y metástasis que habíamos observado en los experimentos anteriores ya que no se vería afectada la vía VEGF/VEGFR. Para llevar a cabo dicho objetivo escogimos una proteína de la que se ha descrito su presencia en la vasculatura como molécula que sirve de guía a las células endoteliales en división, aunque su presencia es bastante reducida: semaforina 4D (Sema4D).

Nuestro primer objetivo fue comprobar la existencia de Sema4D en nuestro modelo de ratón transgénico. Como primera aproximación, en colaboración con el grupo del Dr. Kristian Pietras del Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia) cuantificamos los niveles de expresión de Sema4D y su receptor, Plexina B1, en las células tumorales y en la vasculatura tumoral. Para realizar dicho cometido, tras el sacrificio de ratones RIP-Tag2 los tumores fueron separados del tejido acinar adyacente, disgregados y digeridos. A continuación, la solución celular obtenida se incubó con CD31 para su posterior separación mediante el citómetro de flujo Cell Sorter. Una vez separadas las células endoteliales del resto (donde se incluyen las células tumorales, que representan la mayoría, las células del sistema inmunitario, las células murales y los fibroblastos presentes en el estroma tumoral) se realizó la extracción de RNA de los dos grupos celulares, la retrotranscripción de dicho RNA en cDNA, y finalmente, una PCR a tiempo real (RT-PCR), mediante la tecnología Taqman. De esta manera pudimos comprobar cuales eran los niveles de expresión de Sema4D y su receptor Plexina B1.

Como se puede observar en el gráfico de la figura 43 ambas proteínas se encuentran expresadas en los tumores procedentes de ratones RIP-Tag2. Además,

podimos comprobar que las células endoteliales, nuestro objetivo para realizar el nuevo tratamiento, también expresan Sema4D y, en menor medida, Plexina B1.

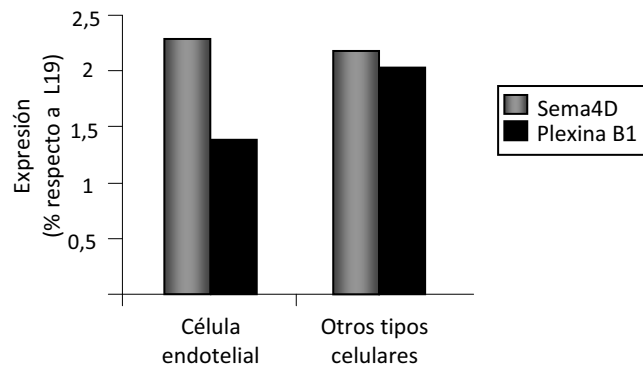


Figura 43. Expresión de Sema4D y Plexina B1 en los tumores RIP-Tag2. El gráfico muestra los niveles de expresión de Sema4D y Plexina B1 en célula endotelial y en el resto de tipos celulares presentes en los tumores RIP-Tag2. Los niveles de expresión mostrados en el gráfico se han calculado respecto al gen de la proteína ribosomal L19 (Mrpl19), un gen frecuentemente utilizado como control endógeno, el cual se encuentra altamente expresado.

A continuación realizamos inmunofluorescencias sobre tejido congelado para Sema4D y el marcador endotelial CD31, con tal de verificar la presencia de nuestra proteína en los tumores RIP-Tag2 y además saber cual era su distribución en éstos. Observamos que Sema4D no se distribuía de la misma manera en todos los tumores analizados. Encontramos tres distribuciones básicas de Sema4D:

- Sema4D asociada a vasos (figura 44A): Presente en la gran mayoría de tumores analizados en un número muy limitado de estructuras vasculares. Colocalización con el marcador de célula endotelial CD31.
- Sema4D asociada a posibles macrófagos (figura 44B): Esta distribución la pudimos observar en aproximadamente el 30% de los tumores RIP-Tag2. Observamos marcaje para Sema4D asociado a un tipo de células de gran tamaño, posiblemente macrófagos.

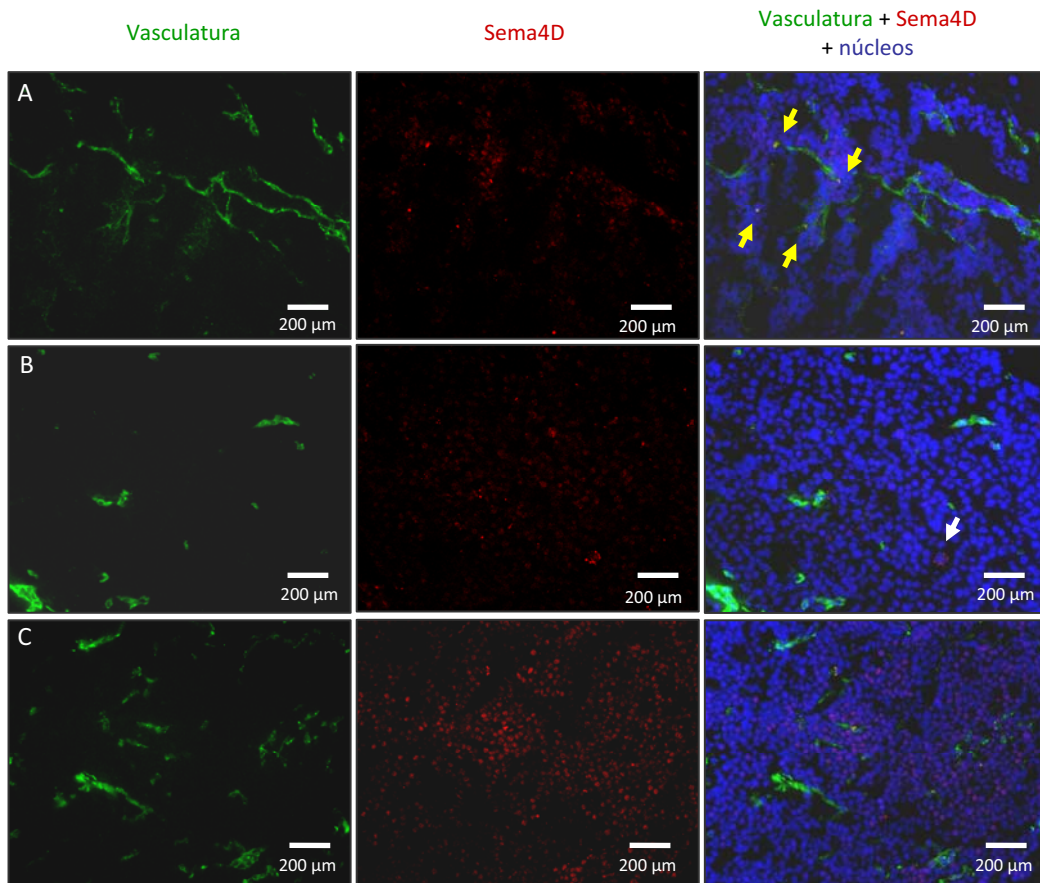


Figura 44. Localización de Sema4D en los tumores RIP-Tag2. Inmunofluorescencias para Sema4D (rojo) y CD31 (verde). A. Observamos colocalización de las dos proteínas, indicándonos la presencia de Sema4D en vasculatura (flechas amarillas). B. La flecha blanca muestra como Sema4D se encuentra localizada en el citoplasma de una célula de gran tamaño, posiblemente un macrófago. C. Distribución de Sema4D en las células tumorales. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

- Sema4D asociada a célula tumoral (figura 44C): La distribución más minoritaria. Se observa tinción específica de Sema4D asociada a las células tumorales.

Con éstos resultados tuvimos la certeza de que Sema4D realmente se encontraba expresada en la vasculatura de los tumores RIP-Tag2, aunque de forma muy minoritaria, ya que sólo un número reducido de vasos presentaba señal específica, de manera muy localizada, para Sema4D. Asimismo también comprobamos que otros tipos celulares presentan expresión de Sema4D, como había sido descrito en otros tumores (Basile et al., 2006).

Tratamiento con anticuerpo anti-Sema4D en ratones RIP-Tag2

Para llevar a cabo los experimentos in vivo, utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-semaforina 4D que nos fue administrado por Vaccinex Inc. (Rochester, NY). Dicho anticuerpo fue administrado según las indicaciones de Vaccinex a dosis de 1 mg/semana, mediante inyección peritoneal.

Con la finalidad de comprobar los efectos sobre los tumores RIP-Tag2, en lo que respecta a inhibición angiogénica e invasión, se llevaron a cabo dos periodos de tratamiento: tratamiento a corto plazo, durante dos semanas, en el que se trataron a los ratones RIP-Tag2 de la semana 12 a la 14; y tratamiento a largo plazo, en el que se trataron a los ratones durante 4 semanas consecutivas, de la 12 a la 16. Tras realizar dichos periodos de tratamiento se procedió al sacrificio de los animales.

Con la finalidad de comparar los resultados con los obtenidos con el anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2, se llevaron a cabo tratamientos durante los mismos periodos con DC101 y con la combinación de ambas drogas, para comprobar si existía una sinergia de ambos anticuerpos. Asimismo, también se mantuvieron ratones controles sin tratar hasta los mismos puntos de edad.

Efecto antiangiogénico del tratamiento con anti-Sema4D

Para comprobar que realmente el anticuerpo monoclonal contra Sema4D tenía un efecto sobre la vasculatura tumoral realizamos diversos experimentos

basados en la observación de la hemorragia y la vasculatura tras las diferentes terapias.

Nuestra primera aproximación fue analizar si existía una disminución del número de lesiones hemorrágicas en el páncreas de los ratones después de recibir los diferentes tratamientos durante 2 semanas (de las 12 a las 14). Tras contabilizar los islotes pancreáticos que habían llevado a cabo el *switch* angiogénico y los tumores que tenían un fenotipo hemorrágico observamos que todos los tratamientos habían reducido la hemorragia, aunque en los ratones que habían recibido tratamiento únicamente con el anticuerpo anti-

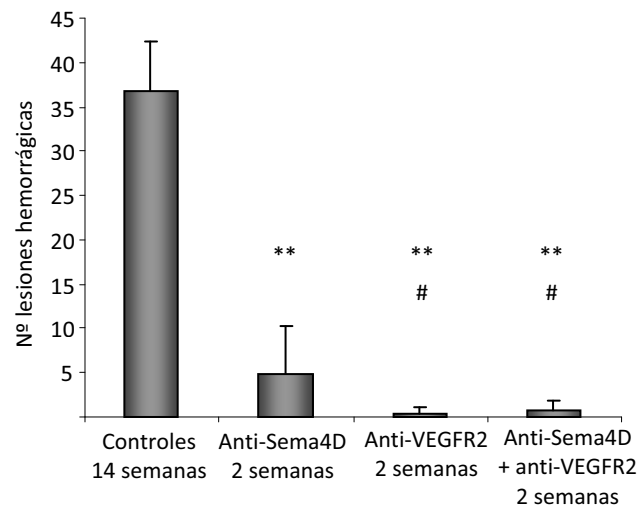


Figura 45. Disminución del número de lesiones hemorrágicas tras los tratamientos durante 2 semanas. Existe una disminución en el número de lesiones hemorrágicas por animal después de recibir cada tipo de tratamiento, aunque la disminución tras la terapia con anti-Sema4D es parcial comparada con las terapias anti-VEGFR2 y la combinación de ambas drogas. ** Indica diferencias significativas con respecto a los controles y # indica diferencias significativas con respecto al tratamiento con anti-Sema4D. $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican desviación estándar.

Sema4D había una inhibición parcial en comparación con aquellos animales que habían sido tratados con anti-VEGFR2 (ya fuera solo o combinado con anti-

Sema4D) (figura 45). Estos resultados nos hicieron pensar que tal vez si alargáramos el tratamiento hasta las 16 semanas, podríamos ver más efecto antiangiogénico en el tratamiento anti-Sema4D. Al tratarse de una droga que afecta a vías angiogénicas VEGF independientes, y por consiguiente, de menor relevancia, tal vez se producía un efecto antiangiogénico acumulativo, por tal razón era necesario un tiempo más largo de tratamiento.

Tras tratar a los ratones RIP-Tag2 durante 4 semanas consecutivas, observamos que el número de lesiones angiogénicas por páncreas no solamente no disminuía, si no que se veía incrementado respecto a la terapia durante 2 semanas con anti-Sema4D (figura 46).

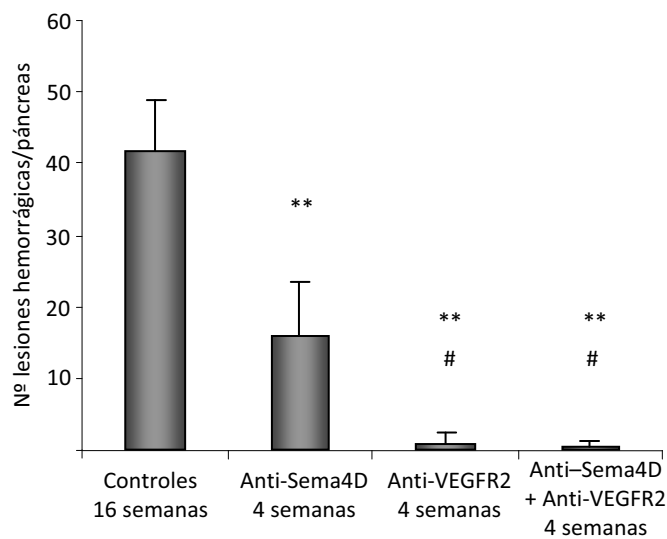


Figura 46. Disminución del número de lesiones hemorrágicas tras los tratamientos durante 4 semanas. La disminución en el número de lesiones angiogénicas por animal es similar a la encontrada en el tratamiento durante 2 semanas. No se observa un efecto antiangiogénico acumulativo tras 4 semanas de tratamiento. ** Indica diferencias significativas con respecto a los controles y # indica diferencias significativas con respecto al tratamiento con anti-Sema4D. $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican desviación estándar.

De hecho, el número de lesiones hemorrágicas provenientes de ratones tratados durante 2 semanas con anti-Sema4D presentaba diferencias estadísticamente significativas si se comparaba con la cantidad de lesiones hemorrágicas pertenecientes a ratones que habían recibido el mismo tratamiento pero durante 4 semanas (según el test Mann-Whitney $p=0,033$). Esto parecía indicarnos que una prolongación del tratamiento no sólo no tenía un efecto acumulativo en lo referido a la potencia antiangiogénica, si no que nos informaba sobre la existencia de una posible resistencia al tratamiento.

A continuación centramos nuestra atención en la hemorragia presente en los tumores, clasificándolos como no hemorrágicos cuando éstos, recién extraídos del páncreas tenían una apariencia totalmente blanca; parcialmente hemorrágicos cuando o bien presentaban una coloración rosada o el tumor se dividía en dos partes fenotípicamente diferenciadas: una totalmente blanca y la otra muy hemorrágica; y hemorrágicos cuando tenían una coloración roja intensa o granate.

Tras la clasificación de cada tumor dependiendo de su fenotipo hemorrágico, pudimos observar de nuevo que todos los tratamientos tenían un efecto sobre la hemorragia en comparación con lo que ocurría en los tumores procedentes de ratones no tratados, pero, como habíamos observado en el caso anterior con el recuento de las lesiones hemorrágicas, el tratamiento con anti-Sema4D tenía un efecto parcial, mostrando diferencias significativas con respecto a los otros dos tipos de tratamiento (terapia anti-VEGFR2 y terapia combinada anti-VEGFR2 y anti-Sema4D) (figura 47 A).

Los grupos de tratamiento en los que se había administrado el anticuerpo anti-VEGFR2 mostraron el mismo patrón en el tratamiento a corto y a largo plazo, pero, como habíamos observado con el recuento de lesiones hemorrágicas, tras cuatro semanas de tratamiento, incrementaba el porcentaje de tumores hemorrágicos, tanto de los totalmente como de los parcialmente hemorrágicos,

aunque este aumento en la hemorragia tras el tratamiento anti-Sema4D no era estadísticamente significativo (figura 47 B).

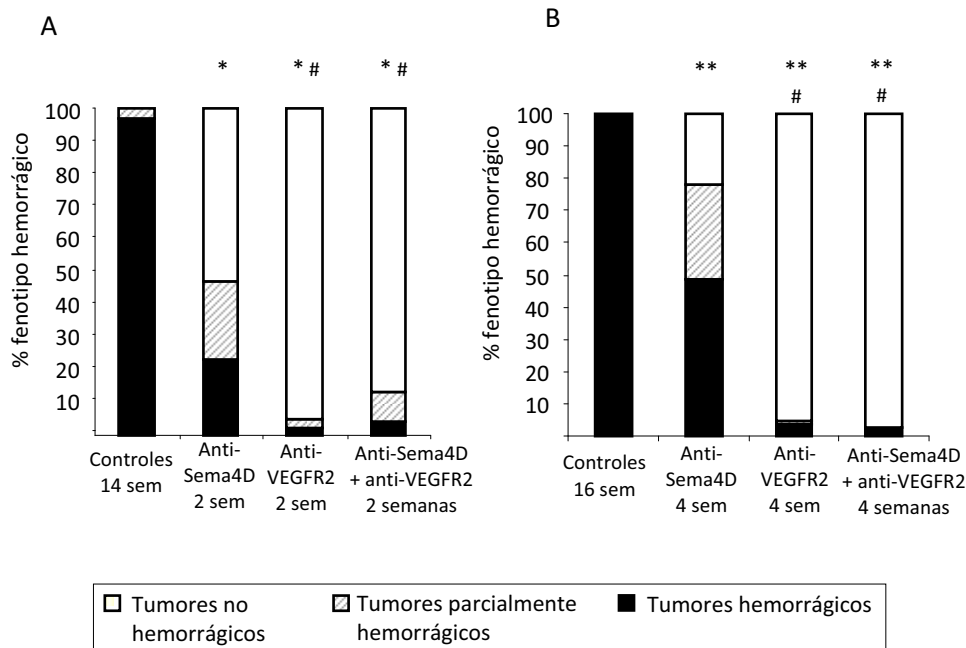


Figura 47. Cambio en el fenotipo hemorrágico tumoral tras los tratamientos. Cuantificación de la hemorragia en los diferentes grupos de tratamiento tras 2 semanas (A) o cuatro semanas (B) de terapia antiangiogénica. En todos los casos existe una disminución de la hemorragia en comparación con los controles no tratados * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Asimismo también observamos diferencias significativas entre el tratamiento anti-Sema4D y las terapias anti-VEGFR2 y combinada en ambos periodos de tratamiento. # $p < 0,05$ Test Mann-Whitney.

Después de estudiar los resultados obtenidos tras la clasificación de los tumores en función de su grado de hemorragia, realizamos el recuento de la microdensidad vascular. Para su ejecución escogimos un mínimo de cinco campos aleatorios por páncreas, en los cuales se realizó el recuento de estructuras vasculares (figura 48). Intentamos que todos los tumores presentes en cada sección de páncreas estuvieran incluidos en dicho recuento.

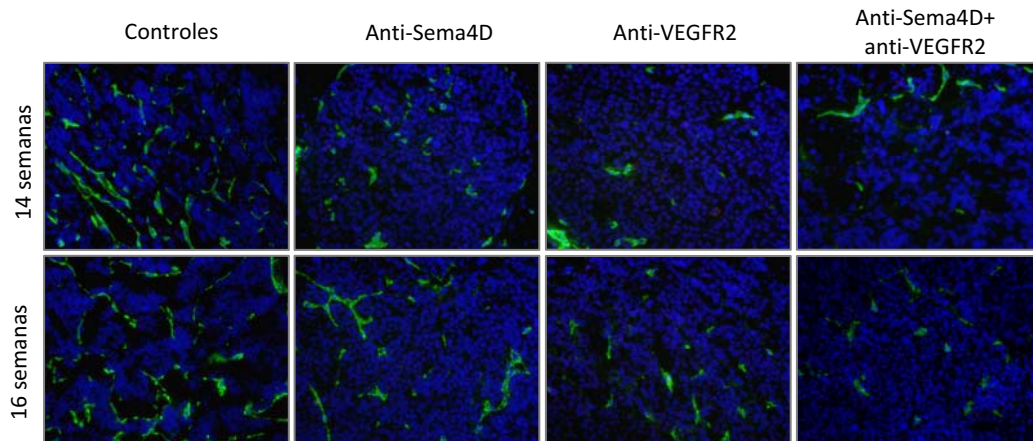


Figura 48. Efectos sobre la microdensidad vascular. Imágenes de inmunofluorescencia para el marcador endotelial CD31 (verde). Se observa una disminución en el número de estructuras vasculares tras 2 semanas de tratamiento con todas las terapias (fila superior). Tras 4 semanas de tratamiento, los tumores de animales tratados con anti-Sema4D en monoterapia se asemejan a los controles mientras que aún son observables las diferencias con las otras dos terapias (fila inferior).

Como se puede apreciar en la figura 48, tras realizar dos semanas de tratamiento observamos una disminución del número de estructuras vasculares, que es significativa en todos los casos con respecto a los controles (figura 49 A). Asimismo, como ya habíamos podido apreciar en la clasificación del fenotipo hemorrágico por parte de los tumores, observamos que la terapia anti-Sema4D no tiene un efecto tan potente como el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR2. Así comprobamos que también existen diferencias entre la monoterapia con anti-Sema4D y los tratamientos anti-VEGFR2 y la combinación de ambas drogas.

Cuando alargamos el tratamiento hasta cuatro semanas (figura 49 B), vimos una reducción en el número de vasos tras el tratamiento con DC101 y la combinación de DC101 + anti-Sema4D, pero ya no se observaron diferencias con respecto al control en el grupo de tratados únicamente con anti-Sema4D.

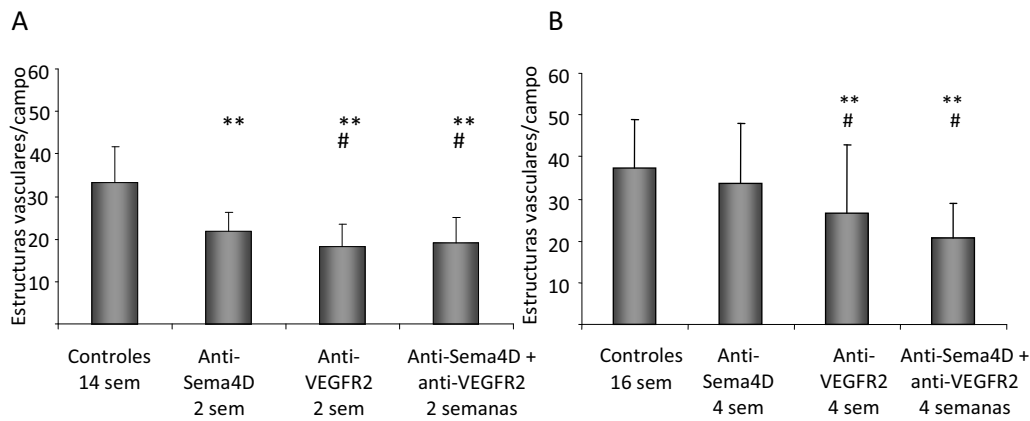


Figura 49. Recuento de microdensidad vascular. Se observa una disminución en el número de estructuras vasculares respecto a los controles después de los tres tipos de tratamiento a corto plazo. Tras 4 semanas de tratamiento sólo se observan diferencias con los grupos anti-VEGFR2 y anti-Sema4D + anti-VEGFR2. **: Diferencias significativas respecto a controles $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. #: Diferencias significativas respecto a tratados con anti-Sema4D $p < 0,05$ para el test de Mann-Whitney.

Este resultado parecía estar en concordancia con el observado en la figura 47, en el que se podía apreciar un aumento en la hemorragia de los tumores tratados con anti-Sema4D durante 4 semanas en comparación con los que habían recibido el mismo tratamiento pero sólo durante 2 semanas. Esta información parecía indicarnos que el efecto parcial de la nueva droga tenía también una reversión más temprana al fenotipo angiogénico inicial, lo que demostraba también una resistencia al tratamiento. Cabe comentar, que pese a que en los otros dos grupos de tratamiento (anti-VEGFR2 y anti-Sema4D + anti-VEGFR2) seguían habiendo diferencias significativas en lo referido al número de estructuras vasculares respecto al grupo control, sí que se pudo observar un aumento del número de vasos por campo a contabilizar, lo que es debido a la resistencia al tratamiento antiangiogénico que ya se había descrito en estudios anteriores con el tratamiento a largo plazo con DC101 (Casanovas et al., 2005). No se observó ningún

tipo de sinergia ni de ventaja en el tratamiento combinado respecto a la monoterapia con anti-VEGFR2.

Efecto en el volumen tumoral tras el tratamiento con anti-Sema4D

Para comprobar que el efecto antivascolar existente tenía repercusión sobre el tamaño tumoral total, realizamos la medición del volumen tumoral después de cada tratamiento.

Tras 2 semanas de tratamiento observamos que no existían diferencias estadísticamente significativas en el volumen tumoral en ninguno de los casos, aunque sí había una tendencia hacia una reducción del tamaño del tumor en las diferentes terapias (figura 50 A). Pero tras la prolongación del tratamiento hasta las 4 semanas, se pudo apreciar una reducción del volumen tumoral en todos los casos (figura 50 B).

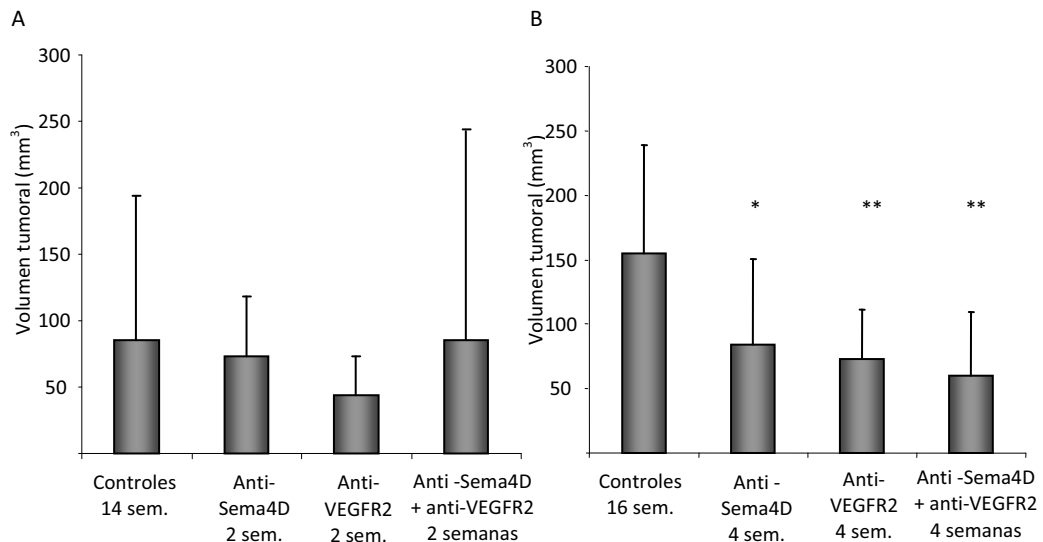


Figura 50. Disminución del volumen tumoral tras los tratamientos con anti-VEGFR2 y anti-Sema4D durante 4 semanas. A. La cuantificación del volumen tumoral no muestra diferencias estadísticamente significativas tras 2 semanas de tratamiento, aunque se observa una tendencia hacia una reducción en tratados. B. Cuantificación del volumen tumoral donde se aprecia una reducción de éste tras el tratamiento de 4 semanas con anti-Sema4D, anti-VEGFR2 y la combinación de ambos. *: p<0,05; **: p<0,01 Test de Mann-Whitney. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Estos resultados nos indicaron que el uso de los diferentes tratamientos antiangiogénicos tenía una clara repercusión sobre el volumen tumoral, ya que promovía una reducción respecto a los controles de la misma edad. Asimismo, parecía existir cierta correlación entre los resultados obtenidos en el estudio de la vasculatura con los obtenidos sobre el volumen tumoral, ya que observamos que mientras que a las dos semanas de tratamiento se apreciaba una reducción en la vasculatura tumoral, la reducción del volumen del tumor no era todavía completa; en cambio, a las 4 semanas de tratamiento, cuando ya empezábamos a detectar un recrecimiento vascular (sobre todo en los ratones tratados con anti-Sema4D en monoterapia) debido a una posible resistencia, la ventaja en lo referido a la reducción del volumen tumoral era entonces muy evidente.

Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-Sema4D

Asimismo, además de comprobar la existencia de una mejoría en lo referido a la inhibición del crecimiento tumoral, tras el tratamiento a largo plazo pudimos comprobar que existía un incremento en la supervivencia de los ratones que habían sido tratados con DC101 y con la combinación de DC101 + anti-Sema4D, y que había una tendencia, aunque no era estadísticamente significativa, en el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-Sema4D (figura 51).

Efectos en el fenotipo invasivo tras la terapia anti-Sema4D

Con la finalidad de comprobar si una inhibición parcial de la angiogénesis en los tumores RIP-Tag2 también promovía un incremento de la invasión local, y observar a su vez el efecto sobre el fenotipo tumoral en la terapia combinada, estudiamos las secciones de parafina a las que se les había realizado la tinción de H&E y realizamos la cuantificación de los tumores según la clasificación dependiente del grado de invasión.

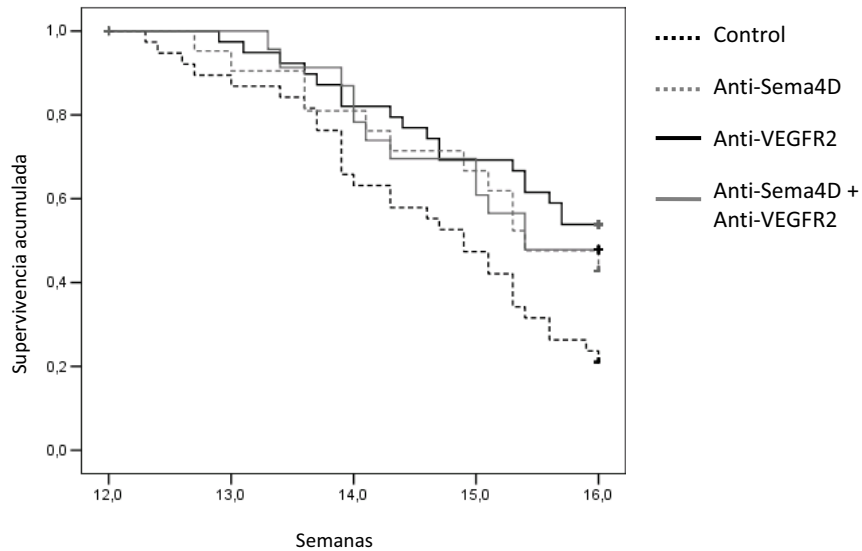


Figura 51. Incremento en la supervivencia tras el tratamiento con anti-VEGFR2 y anti-Sema4D. Se observa un incremento en la supervivencia tras el tratamiento con DC101 y la combinación de los anticuerpos anti-VEGFR2 y anti-Sema4D (Log Rank test $p < 0,05$). Tras el tratamiento con anti-Sema4D no vemos diferencias estadísticamente significativas en lo referente a supervivencia, aunque se observa cierta tendencia.

Como se muestra en la figura 52, después de haber recibido tratamiento durante dos semanas con DC101 y la combinación de anti-Sema4D + DC101, los tumores RIP-Tag2 muestran un incremento en la invasión local.

Por el contrario no se mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles tras el tratamiento a corto plazo de anti-Sema4D, aunque los números parecían revelar que sí existía cierto aumento de la invasión, aunque ésta fuera sólo de manera parcial.

Nuestra hipótesis de que estos resultados indicaban un efecto parcial del tratamiento anti-Sema4D, no sólo en cuanto a lo referido al fenotipo hemorrágico, si no también en referencia al fenotipo invasivo, fue invalidada cuando estudiamos los niveles de invasión local tras cuatro semanas de tratamiento (figura 53).

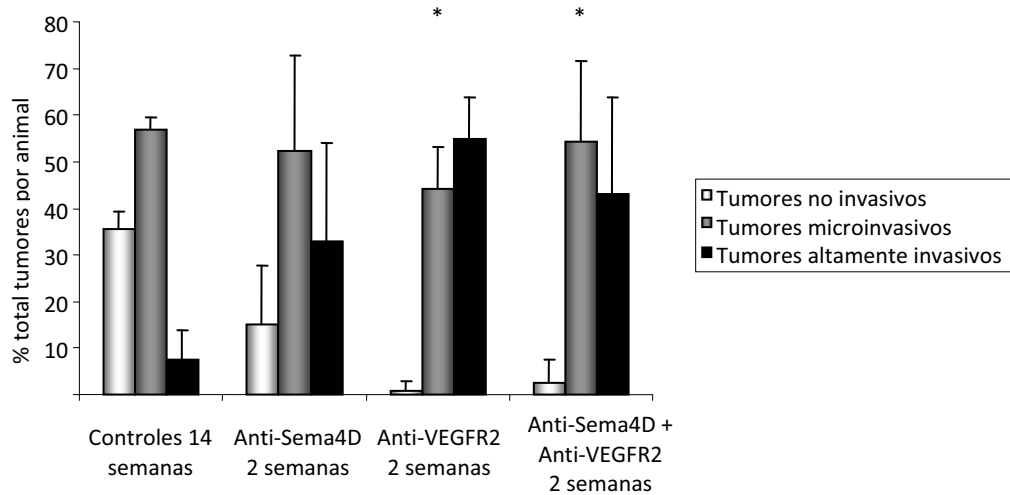


Figura 52. Cuantificación de la invasión local tras 2 semanas de tratamiento. El gráfico muestra un incremento de la invasión después de 2 semanas de tratamiento con anti-VEGFR2 y anti-Sema4D + anti-VEGFR2. En el caso de la terapia con anti-Sema4D parece existir cierto incremento en el fenotipo invasivo pero éste no es estadísticamente significativo. * $p < 0,05$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Las terapias con anti-VEGFR2 y la combinación de anti-Sema4D + anti-VEGFR2, igual que pasaba después del tratamiento a corto plazo durante 2 semanas, presentaban importantes incrementos en la invasión: veían reducido el número de tumores no invasivos por páncreas y aumentado el porcentaje de tumores altamente invasivos. De la misma manera, la monoterapia con anti-Sema4D también promovía un incremento de la invasión local de los tumores, asemejándose, en lo que se refiere a porcentajes de invasión, a los otros dos tratamientos.

Estos resultados parecían demostrar que aunque la terapia con el anticuerpo anti-Sema4D tenía un efecto parcial sobre la inhibición de la vasculatura, existía una acumulación de los efectos proinvasivos producidos por el tratamiento antiangiogénico aunque éste no fuera tan potente como el DC101 o sunitinib.

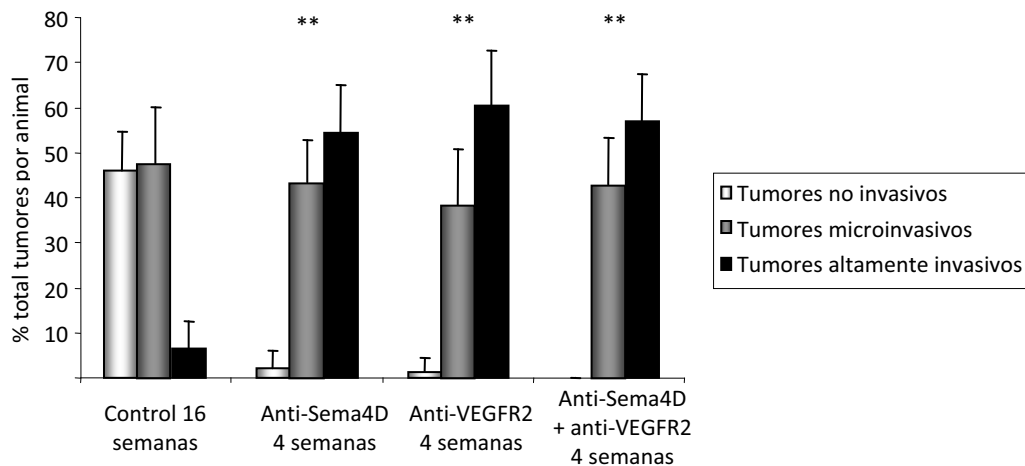


Figura 53. Cuantificación de la invasión local tras 4 semanas de tratamiento. En el gráfico se muestra un incremento de la invasión local en todos los grupos de tratamiento tras 4 semanas de terapia. ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Diseminación linfática y hematológica tras el tratamiento con anti-Sema4D

Nuestro siguiente paso fue estudiar con detenimiento si existía diseminación a otros órganos. Como habíamos realizado anteriormente nos centramos en la metástasis linfática a nódulo linfático peripancreático y la metástasis hematológica a hígado.

Mediante el estudio del nódulo linfático peripancreático en el momento de la extracción del páncreas y la posterior confirmación de la posible metástasis mediante la tinción específica del antígeno T, realizamos el recuento de animales que tenían el nódulo linfático infiltrado con células tumorales (figura 54).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de animales con metástasis a nódulo linfático entre los controles y todos los grupos de tratamiento. Esto nos indicaba que la inhibición Sema4D, al igual que pasa con la inhibición del VEGFR2, promueve un incremento de la diseminación de células

tumorales por vía linfática que comporta un aumento de los casos de metástasis a nódulo linfático peripancreático.

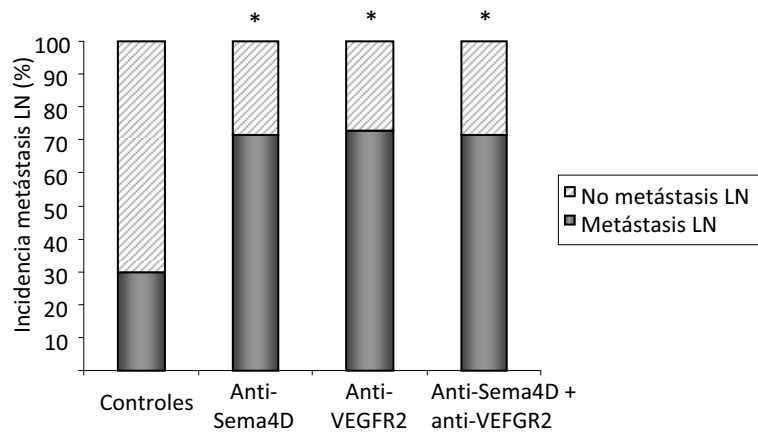


Figura 54. Invasión a nódulo linfático incrementada en tratados. Cuantificación de la invasión a nódulo linfático que indica un incremento de ocurrencia en animales que han recibido tratamiento. * $p < 0,05$ para el test de Chi cuadrado.

En lo que respecta a la incidencia de metástasis hepáticas, también observamos un incremento en el porcentaje de animales con metástasis tras haber recibido cualquier tipo de tratamiento, pese a que la terapia combinada no dio significancia estadística para el test de Chi-Cuadrado, aunque los números sí mostraron una tendencia (figura 55).

Así, todas las terapias que han producido una inhibición de la angiogénesis, aunque sea de un modo parcial, han promovido un incremento del número de grupos de células que, viajando por vía hematológica, promueven un embolismo en los vasos del parénquima hepático que acaba produciendo la aparición de lesiones en el hígado.

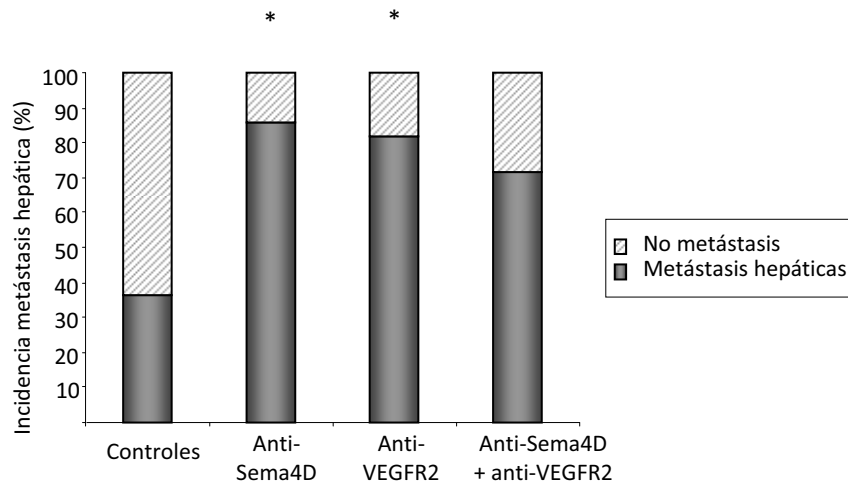


Figura 55. Invasión hematológica a hígado incrementada en tratados. Cuantificación de la invasión a hígado que indica un incremento en su incidencia en animales que han recibido tratamiento. * $p < 0,05$ para el test de Chi cuadrado. El tratamiento combinado anti-Sema4D + anti-VEGFR2 pese a no dar significancia estadística presenta una interesante tendencia.

Con todos estos resultados podemos afirmar que una inhibición de la angiogénesis, aunque parcial y sin afectar la vía de VEGF/VEGFR, también produce los efectos de una posible resistencia evasiva que se dan en una inhibición de la angiogénesis más completa y duradera, que comporta un incremento de la invasión local y un aumento de la incidencia de metástasis linfática y hematológica en el modelo murino de tumor pancreático RIP-Tag2. Además pudimos comprobar que al combinar las terapias anti-Sema4D y anti-VEGFR2 no se ejercía ningún tipo de mejora en los campos estudiados y los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos eran muy similares a los que se obtenían tras la monoterapia con anti-VEGFR2.

Parte IV

Estudio de las causas de la invasión

Incremento de hipoxia tras el tratamiento antiangiogénico

El tratamiento antiangiogénico se ha relacionado con un incremento de hipoxia en los tejidos. Al disminuir la densidad vascular en el interior de los tumores se crean zonas hipóxicas en las que se promueve la secreción de factores angiogénicos alternativos para restablecer de nuevo la vasculatura.

Asimismo, también se ha relacionado el incremento de hipoxia en el interior de tumores con un aumento en la invasión y un cambio en el fenotipo, volviéndose éste más agresivo y maligno tras haberse recuperado de la falta de oxígeno inicial (Du et al., 2008a; Pennacchietti et al., 2003).

Nuestro siguiente paso tras haber obtenido los resultados que mostraban un incremento en la invasión después de la terapia antiangiogénica, fue comprobar si éste aumento en la invasión estaba directamente relacionado con la hipoxia.

Como primer objetivo nos propusimos observar si existía hipoxia en tumores controles y si ésta se veía incrementada en los tumores provenientes de ratones RIP-Tag2 β -VEGF-KO (con una delección para el gen *Vegf-A*, provenientes del laboratorio del Dr. Inoue, en Osaka, Japón). Con tal de determinar los niveles de hipoxia en el interior de los tumores, se administró hidrocloreuro de pimonidazol (HypoxyprobeTM) a los ratones una hora antes de su sacrificio. Este compuesto fue posteriormente detectado gracias al anticuerpo monoclonal anti-Hypoxyprobe.

Tras realizar la inmunofluorescencia para detectar Hypoxyprobe y CD31 (marcador de célula endotelial), pudimos comprobar que los tumores provenientes de ratones controles, tenían niveles muy bajos de hipoxia mientras que los provenientes de ratones RIP-Tag2 β -VEGF-KO presentaban zonas de hipoxia que se correspondían con áreas con un bajo número de vasos (figura 56).

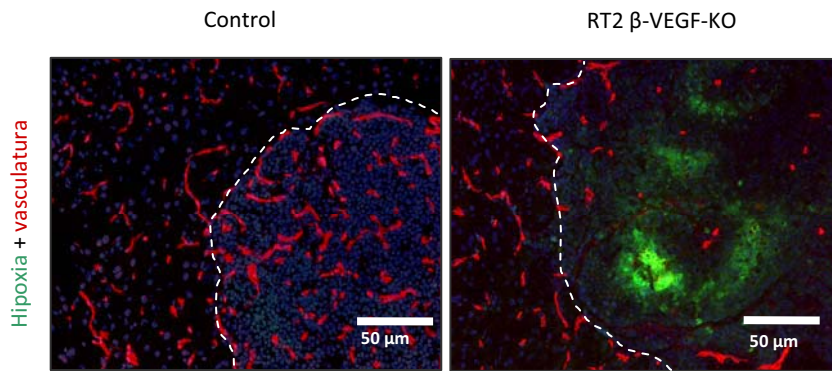


Figura 56. Detección de hipoxia en el interior de los tumores RIP-Tag2 y RIP-Tag2 β -VEGF-KO. Inmunofluorescencia para Hypoxyprobe. Los tumores controles no muestran niveles de hipoxia significativos, mientras que aquellos provenientes de ratones RIP-Tag2 β -VEGF-KO presentan claras zonas de hipoxia. Marcaje verde: hipoxia; rojo: vasculatura; azul: núcleos.

Al observar los niveles de hipoxia en los tumores procedentes de ratones tratados con anti-VEGFR2 y sunitinib observamos que había presencia de marcaje para Hypoxyprobe en distintas intensidades (figura 57).

Así comprobamos que los niveles de oxígeno tras el tratamiento de tan sólo una semana con anti-VEGFR2 ya habían disminuido en el interior de los tumores debido a la regresión de la vasculatura (panel B de la figura 57). Si la terapia antiangiogénica se prolongaba durante 4 semanas con DC101 o 5 semanas con sunitinib, las zonas positivas para el marcaje de hipoxia en el interior del tumor se veían incrementadas y la señal era mucho más intensa (paneles C y D de la figura 57).

De este modo pudimos comprobar que efectivamente la regresión vascular promovida por los antiangiogénicos utilizados (anti-VEGFR2 y sunitinib) provocaba un aumento de la hipoxia intratumoral que se mantenía, e incluso se veía incrementada, en el tratamiento a largo plazo.

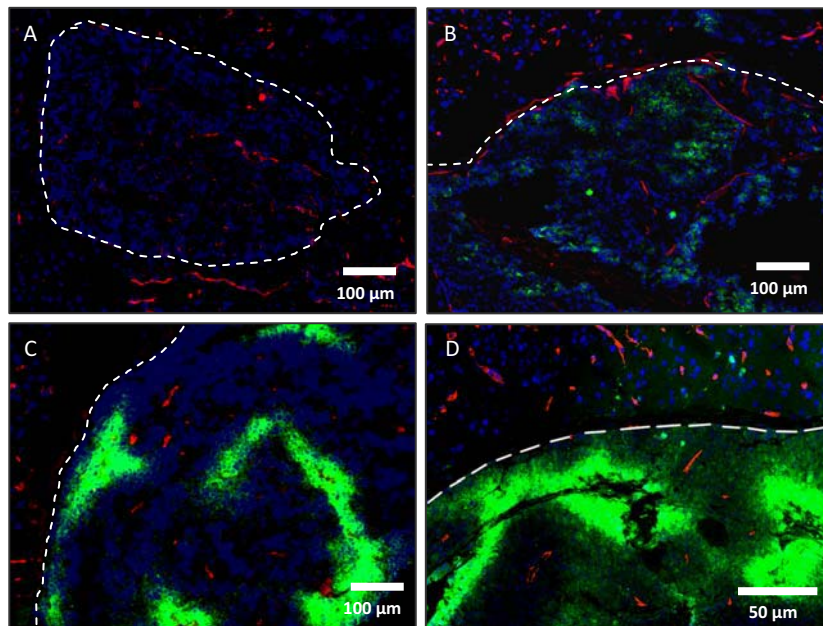


Figura 57. Detección de hipoxia en tumores tratados. Inmunofluorescencia para Hypoxyprobe. Los tumores controles (A) no muestran niveles de hipoxia significativos, mientras los tratados durante 1 semana con anti-VEGFR2 (B), 4 semanas con anti-VEGFR2 (C), o con sunitinib durante 5 semanas (D), presentan diferentes grados de marcaje en el interior de los tumores, coincidiendo con zonas pocas vascularizadas. Marcaje verde: hipoxia; rojo: vasculatura; azul: núcleos.

También quisimos estudiar si existía hipoxia en las metástasis hepáticas tras el tratamiento. Así realizamos también la inmunodetección de pimonidazol en secciones congeladas de hígados con metástasis de animales controles y tratados durante 5 semanas con sunitinib.

Como se muestra en la figura 58, las metástasis que provenían de ratones no tratados no presentaban hipoxia en su interior y se encontraban bien vascularizadas, mientras que las metástasis observadas provenientes de ratones tratados con sunitinib, aunque tuvieran un tamaño pequeño, mostraban zonas con baja concentración de oxígeno en su interior.

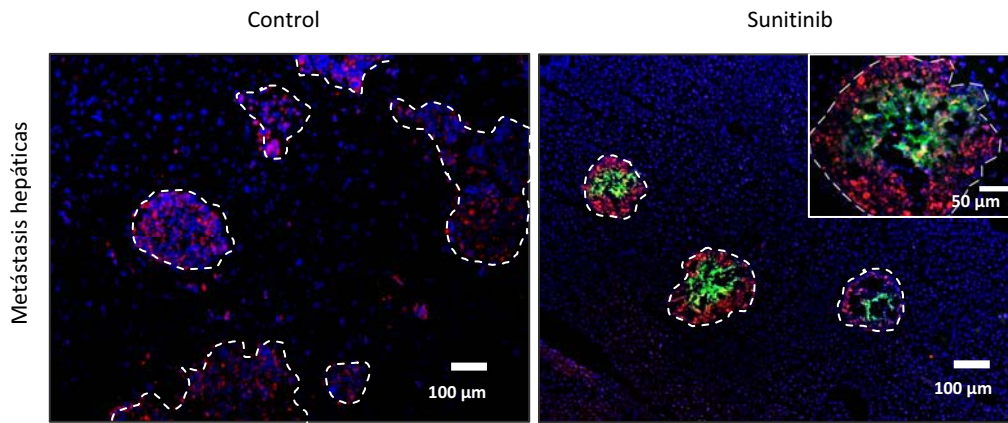


Figura 58. Detección de hipoxia en micrometástasis hepáticas. Inmunofluorescencia para Hypoxyprobe donde se muestra la hipoxia presente en el interior de las micrometástasis hepáticas de animales tratados con sunitinib, en contraposición con la ausencia de áreas hipóxicas en las metástasis de animales controles. Marcaje verde: hipoxia; rojo: antígeno T; azul: núcleos.

A continuación nos propusimos cuantificar la hipoxia presente en tumores tratados y controles. Para realizar este experimento escogimos secciones congeladas de animales controles, tratados durante 4 semanas con DC101 y durante 5 semanas con sunitinib, a las que se les realizó inmunofluorescencia para Hypoxyprobe, y a continuación se procedió a hacer el recuento de tumores que presentaban señal. Como se muestra en el gráfico de la figura 59, un porcentaje muy bajo de tumores no tratados presentan hipoxia en el interior. Tras recibir tratamiento continuado, aproximadamente el 45% de los tumores RIP-Tag2 presentaban zonas de hipoxia en su interior, mostrando la efectividad del tratamiento.

Con la finalidad de comprobar si los tumores que presentaban hipoxia eran los que tenían un fenotipo más invasivo, realizamos el recuento tumoral clasificando los tumores positivos para Hypoxyprobe presentes en cada sección como invasivos o no invasivos, dependiendo de si éstos estaban encapsulados o presentaban células tumorales adentrándose en el tejido acinar adyacente.

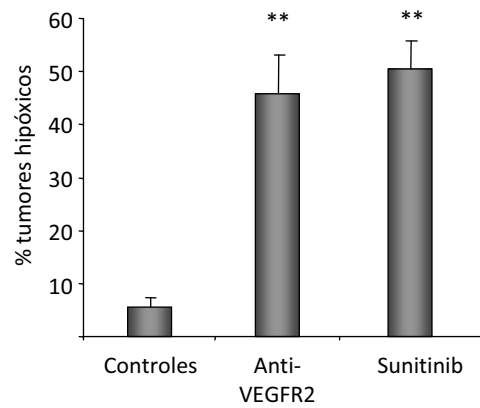


Figura 59. Cuantificación de la hipoxia. Recuento de los tumores con hipoxia tras el tratamiento a largo plazo con anti-VEGFR2 y sunitinib. Los gráficos muestran el porcentaje de tumores positivos para el marcaje de Hypoxyprobe por animal. ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican el error estándar.

Con tal de poder clasificar de manera correcta los tumores según las categorías de invasivo/ no invasivo, era necesario realizar el recuento en secciones parafinadas, lo que supuso una pérdida de la señal de Hypoxyprobe, que tiene mucha más sensibilidad sobre secciones congeladas.

Se realizó una inmunohistoquímica para Hypoxyprobe, donde se comprobó que del total de tumores, el 7,8% presentaban hipoxia y eran invasivos, mientras que menos del 1% eran hipóxicos no invasivos (figura 60). Esto se traduce en un 91% de tumores invasivos frente a un 9% de tumores no invasivos, si únicamente realizamos el recuento de los tumores que presentan hipoxia.

Este experimento nos confirmó que la hipoxia correlaciona con el incremento de invasión que se da en los tumores RIP-Tag2 tras el tratamiento con distintos fármacos antiangiogénicos.

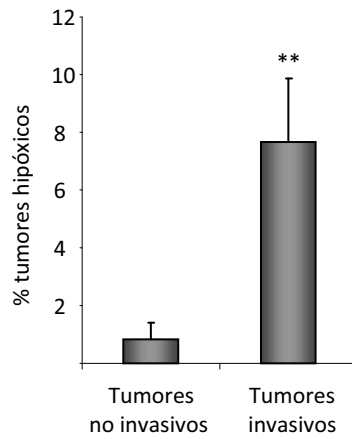


Figura 60. Cuantificación de la invasión en los tumores con hipoxia. Porcentaje de tumores hipóxicos respecto al total de tumores encontrados en ratones RIP-Tag2. ** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Estudio de los cambios moleculares tras el tratamiento antiangiogénico

Como siguiente paso nos propusimos estudiar qué efectos tenía dicha hipoxia y qué cambios estaba promoviendo en la expresión de las moléculas implicadas en angiogénesis e invasión.

Como primera aproximación decidimos estudiar posibles variaciones en la expresión de mRNA tras la terapia antiangiogénica. Para realizar este estudio se definieron diferentes grupos de tratamiento con ratones RIP-Tag2 Rag^{KO/KO}:

- Controles
- Tratados durante 1 semana con anti-VEGFR2
- Tratados durante 4 semanas con anti-VEGFR2
- Tratados 1 semana con anti-VEGFR2 + 3 semanas de descanso que habían realizado reversión al fenotipo hemorrágico

Se escogieron estos grupos de tratamiento para poder detectar posibles cambios en la expresión de diferentes moléculas en la primera fase de inhibición de

la angiogénesis, cuando los tumores responden al tratamiento; tras la inhibición continuada y dónde ya se observan claramente fenómenos de resistencia y recrecimiento de la vasculatura; y tumores que tras haber estado tratados a tiempo corto y después permanecer durante tres semanas de descanso, han llevado a cabo una reversión total del fenotipo hemorrágico, adquiriendo una apariencia similar a los tumores provenientes de ratones controles.

De dichos grupos de tratamiento se escogieron cuatro tumores independientes de los cuales se realizó una extracción de RNA, seguida de una reacción de la transcripción inversa. Con el cDNA obtenido se realizó una PCR a tiempo real (RT-PCR) mediante las placas LDA (Low Density Arrays) que utilizan tecnología Taqman, y se realizó el análisis de expresión de varias moléculas.

Analizamos la expresión de cuatro moléculas proangiogénicas solubles: VEGFA, VEGFB, PDGFA y PIGF. Las cuatro resultaron tener el mismo comportamiento tras el tratamiento con anti-VEGFR2, presentando niveles bastante superiores en tumores tratados respecto a controles mientras se mantenía la inhibición de la vía de VEGF, pero en aquellos tumores en los que se había restablecido el fenotipo altamente hemorrágico de los tumores RIP-Tag2 los niveles de expresión también se restablecían (figura 61).

Estos resultados nos indicaban que mientras el VEGFR2 está siendo bloqueado por el anticuerpo DC101 existe un incremento en la expresión del ligandos de VEGFR2, así como de otros miembros de la familia de VEGF o factores proangiogénicos alternativos, como es el caso de PDGFA, expresado principalmente en pericitos, que aseguran la integridad vascular.

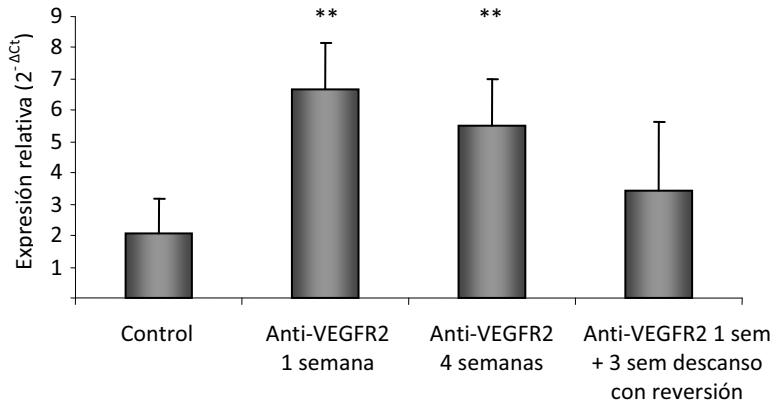


Figura 61. Expresión relativa de VEGFA en tumores controles y tratados. En la gráfica se muestran los niveles de expresión de VEGFA en los diferentes grupos de tratamiento. VEGFB, PIGF y PDGFA presentan el mismo patrón de expresión tras los distintos tratamientos.

**p<0,01 para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Existen varios modelos de invasión celular en cáncer. Uno de los más estudiados y extendidos es el modelo que sigue la transición epitelio mesénquima (EMT), el cual está caracterizado por la pérdida de E-cadherina, una de las moléculas de adhesión más importantes y marcador epitelial por excelencia. Una pérdida en su expresión está frecuentemente relacionada con un peor pronóstico y suele coincidir con un incremento de N-cadherina, una proteína mesenquimal implicada en motilidad celular e invasión (Cavallaro and Christofori, 2001; Perl et al., 1998).

Por esa razón decidimos examinar cuales eran sus niveles de expresión después del tratamiento con anti-VEGFR2. Sorprendentemente, observamos que ambas proteínas incrementaban su expresión después de haber recibido tratamiento con antiangiogénicos, presentando cambios estadísticamente significativos tras los tratamientos de 1 y 4 semanas (figura 62).

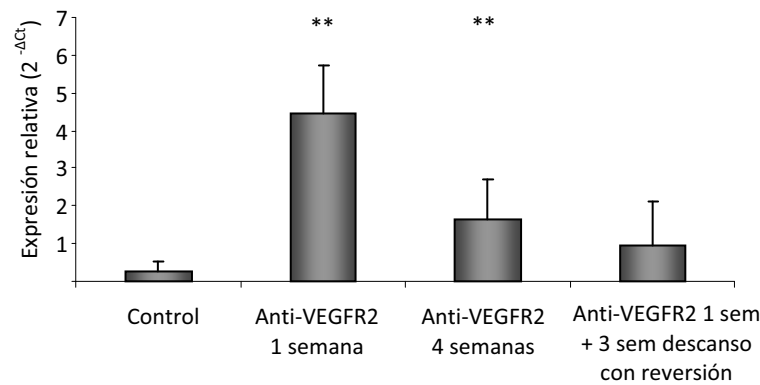


Figura 62. Expresión relativa de E-cadherina en tumores controles y tratados. En la gráfica se muestran los niveles de expresión de E-cadherina en los diferentes grupos de tratamiento. N-cadherina presenta el mismo patrón de expresión tras los distintos tratamientos.

** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Así pudimos comprobar que no existía el *switch* de cadherinas esperado, ya que ambas proteínas incrementaban su expresión. Además, también observamos que en aquellos tumores que se había llevado a cabo una reversión del fenotipo hemorrágico después de estar 3 semanas sin tratar, se habían restablecido los niveles de ambas moléculas, asemejándose así a lo encontrado en tumores controles.

Llegados a este punto nos preguntamos si este incremento podía deberse a una contaminación por parte del tejido acinar, que tiene una expresión muy elevada de E-cadherina. Tal vez, los tumores tratados que suelen ser los más invasivos, presentaban zonas de tejido acinar en su interior que nos estaban dando una información alterada acerca de los niveles de expresión de esta molécula de adhesión. Por eso realizamos una inmunofluorescencia sobre tejido congelado para E-cadherina y también para β -catenina. β -catenina se encuentra generalmente secuestrada en la membrana celular por E-cadherina, formando parte de las

uniones adherentes. En caso de pérdida de E-cadherina, β -catenina queda libre en el citoplasma, pudiendo ser translocada a núcleo y activando factores de transcripción que en última instancia favorecerán la transcripción de genes implicados en supervivencia, invasión y metástasis (Bienz and Clevers, 2000; Polakis, 2000).

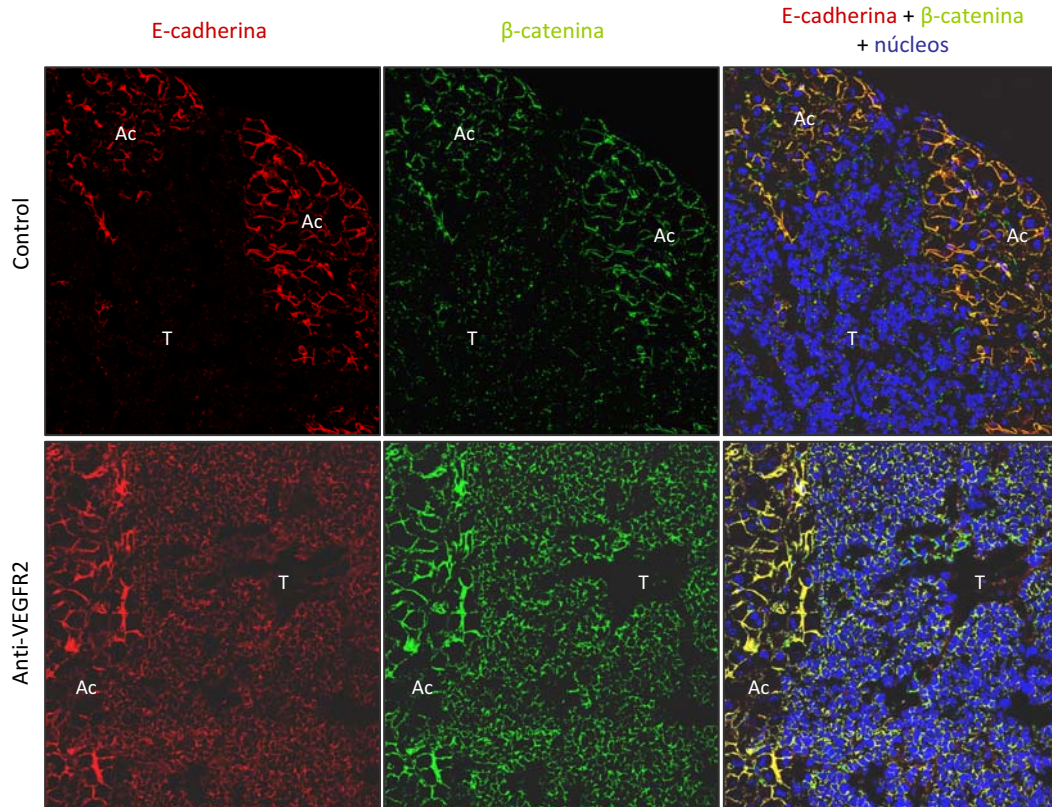


Figura 63. Incremento de E-cadherina y β -catenina en tumores tratados. Inmunofluorescencia que muestra un incremento de las proteínas E-cadherina y β -catenina en los tumores tratados con DC101 durante 4 semanas. Las zonas con el marcaje más intenso se corresponde con tejido acinar, control positivo de la inmunotinción. Ac= Tejido acinar; T= Tumor. Marcaje rojo: E-cadherina; verde: β -catenina; azul: núcleos

Como se puede observar en la figura 63 el incremento de E-cadherina (primera columna) era también apreciable a nivel de inmunofluorescencia, además se correspondía con un incremento de β -catenina (columna central).

El incremento de E-cadherina se producía tanto en los bordes como en la parte central de la lesión. A esto se debe sumar el hecho que en las zonas marginales no parecía haber diferencias en la cantidad de señal para E-cadherina ni para β -catenina en función de si se trataba de una zona encapsulada o muy invasiva.

Esto nos indicaba que las uniones intercelulares permanecían intactas, y que por lo tanto, no se estaba llevando a cabo una invasión mediada por EMT, ya que el principal marcador del fenotipo epitelial (E-cadherina) había experimentado un incremento en su expresión tras el tratamiento antiangiogénico.

Estos resultados nos indujeron a pensar que los tumores RIP-Tag2 tras ser tratados con anti-VEGFR2, presentaban un modelo de invasión colectiva, en la que no se perdían las uniones célula-célula.

Pero las cadherinas no son las únicas moléculas de adhesión celular (CAMs) que juegan un papel importante en la progresión tumoral. Otra molécula interesante involucrada también en el desarrollo de tumores es la neural-CAM (NCAM). En el modelo RIP-Tag2 se ha descrito que una inhibición en la expresión de NCAM en las células β del páncreas promueve un incremento en la incidencia de metástasis, preferentemente a nódulo linfático (Fogar et al., 1997; Perl et al., 1999).

Por tal razón también quisimos comprobar cuales eran los niveles de expresión de NCAM después del tratamiento con anti-VEGFR2. Como se muestra en la gráfica de la figura 64 observamos una dramática disminución en la expresión de NCAM después de haber recibido tratamiento. Además esta disminución parecía ser irreversible, ya que aunque se hubiera llevado a cabo una reversión en el

fenotipo hemorrágico los niveles de NCAM seguían estando disminuidos respecto a los controles no tratados.

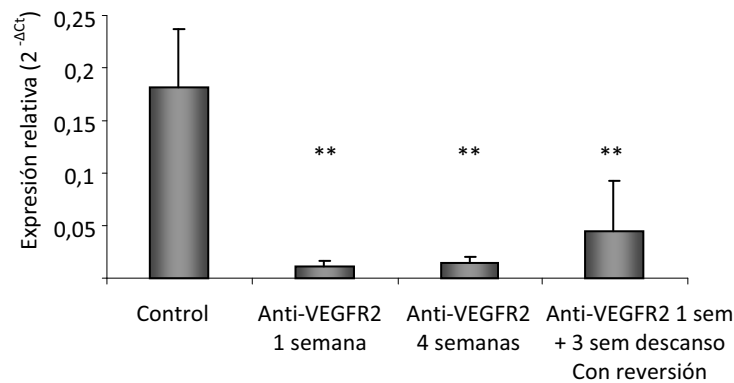


Figura 64. Expresión relativa de NCAM en tumores controles y tratados. En la gráfica se muestran los niveles de expresión de NCAM en los diferentes grupos de tratamiento. Se observa una disminución irreversible en su expresión tras el tratamiento con anti-VEGFR2.

** $p < 0,01$ para el test de Mann-Whitney. Las barras de error indican la desviación estándar.

Cuando realizamos una inmunofluorescencia sobre tejido congelado para detectar este decremento, observamos que la disminución que habíamos observado en el análisis de expresión no se hacía patente en la inmunotinción, ya que no parecían existir diferencias en los niveles de NCAM de tumores controles y tratados durante 4 semanas con anti-VEGFR2 (figura 65).

En varios tipos tumorales NCAM puede experimentar un cambio de isoforma: de la forma adulta de 120 kDa a las formas embrionarias de 140 ó 180 kDa. Aunque el significado biológico de este cambio y su papel en la progresión tumoral aun no se ha definido (Fogar et al., 1997; Johnson, 1991).

Con la finalidad de hallar un posible cambio de isoforma que no hubiera sido detectado por el anticuerpo mediante la inmunotinción específica, pero que sí hubiera sido cuantificado en el análisis de expresión, realizamos un western blot en

el que, efectivamente observamos que había un cambio de isoforma tras el tratamiento. Después de 4 semanas de administración de anti-VEGFR2, NCAM se presentaba como una proteína de mayor peso molecular (figura 66).

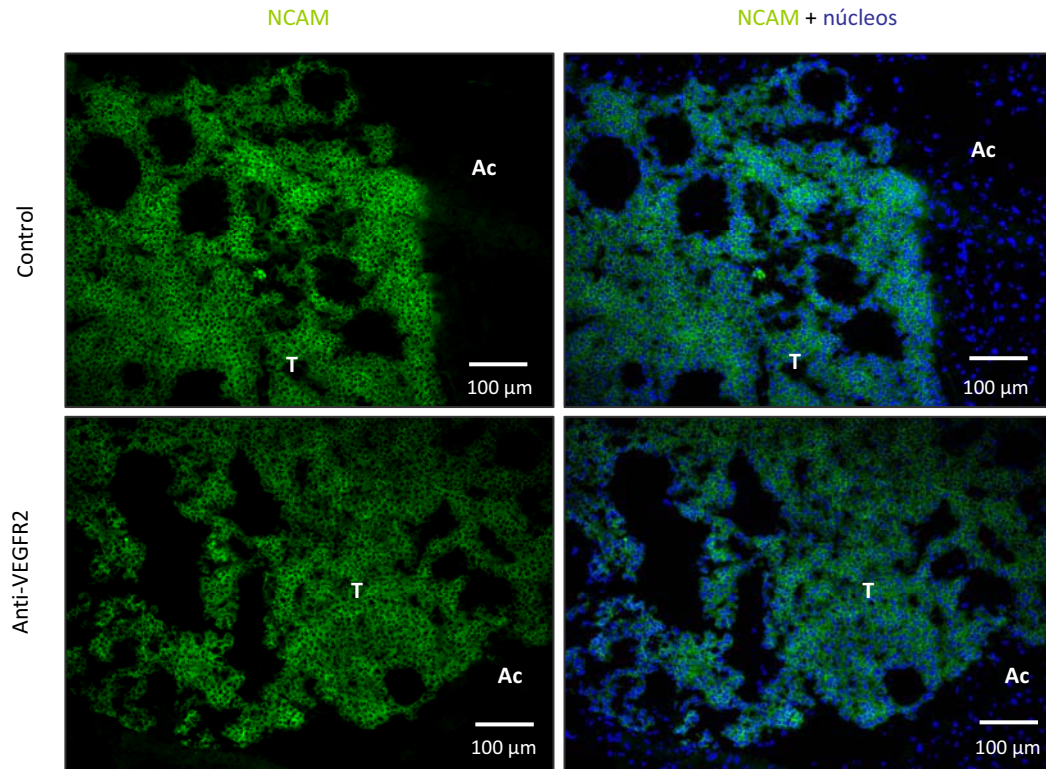


Figura 65. Los niveles de NCAM no presentan cambios tras el tratamiento anti-VEGFR2. Inmunofluorescencia que muestra una no disminución en los niveles de NCAM (marcaje verde) después de 4 semanas de tratamiento anti-VEGFR2. Ac= Tejido acinar; T= Tumor

Cabe destacar que tras una semana de tratamiento + 3 semanas de descanso, de todos los tumores recogidos y congelados para su posterior análisis, los únicos que presentaban una reversión al fenotipo hemorrágico

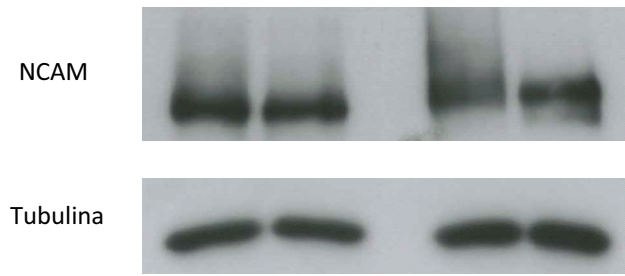


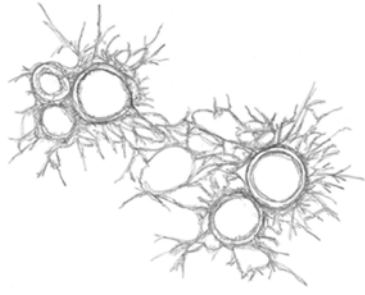
Figura 66. Cambio de isoforma de NCAM tras recibir 4 semanas de terapia anti-VEGFR2. Western blot de NCAM en el que se aprecia un cambio de isoforma de la proteína: de 120 kDa a 140 kDa.

fueron los seleccionados para realizar el análisis de expresión. El resto de tumores de este grupo de tratamiento, es decir, aquellos que tenían un fenotipo no hemorrágico y que resultaron ser la mayoría, se comportaban en lo referido a niveles de expresión de las moléculas anteriormente descritas, de igual manera que los tumores que habían recibido 4 semanas de tratamiento continuo con DC101.

Tras la obtención de los resultados que describían reversión en el patrón de expresión de las moléculas relacionadas con angiogénesis y con las cadherinas, y la irreversibilidad de NCAM, nos propusimos observar si también existían cambios en la expresión de estas mismas moléculas después de haber sido tratadas con sunitinib durante 2 semanas y después haber estado en periodo de reposo de tratamiento durante 4 semanas.

A diferencia de lo que ocurría con los tumores que provenían de ratones tratados con DC101, que presentaban la mayor parte de lesiones con un fenotipo no hemorrágico pese al periodo de reposo, los tumores tratados con sunitinib realizaban una reversión completa a un fenotipo altamente hemorrágico tras haber

permanecido durante 4 semanas sin tratamiento. Así pues, su comportamiento en lo referente a los niveles de expresión de las moléculas analizadas fue consistente con el presentado por los tumores que habían realizado una reversión de fenotipo tras la terapia con la anti-VEGFR2. Indicándonos que la inhibición de la angiogénesis, ya fuera mediante un inhibidor puro de la vía de VEGF, o mediante un inhibidor de receptores tirosina quinasa mucho más potente, pero con una vida media mucho más corta, comportaban los mismos cambios moleculares, al menos, tras haber una reversión en el fenotipo hemorrágico.



Discusión

Resistencia adaptativa a la terapia con anti-VEGFR2 y sunitinib

Desde el momento en que se describió que la acción de los factores de crecimiento inductores de la angiogénesis podía bloquearse a nivel de ligando, de receptor o ya a nivel de eslabones posteriores en la vía de transducción de señales de las células endoteliales, se abrió un amplio abanico de posibilidades que fue bien recibido tanto en la clínica como en la industria.

Sobre el papel la terapia antiangiogénica presentaba tres grandes ventajas frente a las terapias tradicionales:

- Eficacia, al ser la diana de la terapia antiangiogénica las células endoteliales, no transformadas y genéticamente estables.
- Baja toxicidad, ya que únicamente se ataca a aquellos vasos que tienen células endoteliales proliferando, que en el adulto son escasos.
- Ausencia de resistencia al tratamiento.

Pero poco a poco, tras poner en práctica los tratamientos antiangiogénicos, se ha observado que el hecho que las células endoteliales no sean células transformadas y sean estables genéticamente no garantiza ni la eficacia ni la ausencia de resistencia.

Utilizando el anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2 DC101 sobre el modelo RIP-Tag2, Casanovas y colaboradores describieron en 2005 que tras realizar un tratamiento continuado durante 4 semanas con este inhibidor de la vía de VEGF, se producía resistencia a la terapia en el interior de los tumores, observándose una reinducción y, finalmente, un reestablecimiento de la vasculatura, lo que acababa traduciéndose en un recrecimiento del tumor (Casanovas et al., 2005).

En este trabajo quisimos seguir estudiando esta resistencia, en el mismo modelo (RIP-Tag2) y utilizando el mismo fármaco. El DC101 se caracteriza por bloquear de una manera selectiva el VEGFR2, lo que podría equipararse con el

tratamiento con bevacizumab que, desde hace unos años, es el estándar para tratar ciertos tipos tumorales en la clínica en nuestro país.

Además del DC101, también quisimos estudiar los efectos de un inhibidor de múltiples receptores implicados en diferentes vías, utilizado en la actualidad en la clínica: sunitinib; una pequeña molécula inhibidora de receptores tirosina quinasa implicados tanto en proliferación celular como en angiogénesis, por lo que ejerce su efecto antitumoral a través de la combinación de un efecto antiproliferativo y antiangiogénico (Abrams et al., 2003b; Mendel et al., 2003; O'Farrell et al., 2003).

En nuestro estudio demostramos que el tratamiento antiangiogénico se traducía en un beneficio en lo referido a la supervivencia, ya que ésta se vio incrementada en los ratones que habían recibido cualquiera de los dos tratamientos.

En el caso del anticuerpo anti-VEGFR2 se demuestra que produce un potente efecto antiangiogénico y antitumoral, tal y como ya se había descrito en estudios anteriores (Casanovas et al., 2005; Klement et al., 2000), pero que tras el tratamiento continuado se produce una resistencia consistente en una reinducción de la angiogénesis que en última instancia se traduce en un recrecimiento del volumen tumoral. Éstos resultados están en concordancia con los observados en estudios previos del grupo en los que se describía recrecimiento del tumor en presencia del bloqueo de VEGFR2 mediante una restauración de la densidad vascular, que no era debida a un fallo en la terapia, ya que se continuaba observando una reducción en la microhemorragia tumoral y en la fosforilación del VEGFR2 (Casanovas et al., 2005). La causa de este recrecimiento es debida a una adaptación de la biología tumoral, que promueve la secreción de factores proangiogénicos alternativos, como FGFs y efrinas, que reestiman la angiogénesis tumoral de una manera VEGF independiente.

Cuando observamos los niveles de expresión de los factores proangiogénicos miembros de la familia de VEGF, así como otros factores alternativos, en respuesta al tratamiento con antiangiogénicos, comprobamos que

éstos habían experimentado un incremento. Esto coincide con lo descrito en estudios previos (Casanovas et al., 2005; Compagni et al., 2000; Cheng et al., 2003) donde se determinó que una terapia antiangiogénica sostenida acaba promoviendo una re-estimulación de la angiogénesis tumoral de una manera VEGF independiente. Asimismo también pudimos comprobar que tras la parada del tratamiento los niveles de expresión de estas moléculas volvían a los niveles iniciales, mostrando una reversión que nos indicaba que, de nuevo, la angiogénesis volvía a tener lugar a través de la vía de VEGF.

En el caso del tratamiento con sunitinib, pudimos comprobar que se trataba de un antiangiogénico mucho más potente que el anti-VEGFR2 DC101, ya que tras un tratamiento prolongado aun podíamos observar una potente inhibición de la vasculatura en el interior de los tumores. Este hecho se traducía en un beneficio en lo referido al volumen tumoral, que tras cinco semanas de terapia aún se veía significativamente reducido, y también en lo referido a la supervivencia, ya que ésta se vio incrementada en seis semanas de media en los ratones que habían recibido tratamiento. Todos estos resultados son consistentes con los publicados previamente por otros grupos y en distintos modelos. El efecto anti-tumoral de sunitinib se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, en varios modelos tumorales (Castillo-Avila et al., 2009; de Bouard et al., 2007; Mendel et al., 2003; O'Farrell et al., 2003). En todos ellos, sunitinib es capaz de inducir un bloqueo en el crecimiento del tumor. Además, el efecto terapéutico se ha observado en varios estudios clínicos en distintos tipos tumorales como cáncer renal, colorectal, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de pulmón de célula pequeña o sarcoma (Chow and Eckhardt, 2007; Faivre et al., 2006; Motzer and Bukowski, 2006; Preneen et al., 2006).

El minucioso estudio histológico de los tumores nos rebeló que tras recibir tratamiento los tumores neuroendocrinos de nuestro modelo ganaban un fenotipo mucho más invasivo y agresivo, con células tumorales adentrándose en el tejido

acinar adyacente. Así describimos que tras la terapia con DC101 o con sunitinib se daban cambios espectaculares: una drástica disminución del número de adenomas o tumores encapsulados y un gran incremento del porcentaje de tumores altamente invasivos, lo que nos indicaba una malignización de las lesiones tras el tratamiento con el antiangiogénico.

También comprobamos que este cambio hacia un fenotipo más agresivo y maligno era un fenómeno irreversible. Después de sólo una semana de tratamiento con anti-VEGFR2 o dos con sunitinib, el fenotipo invasivo de los tumores se mantenía en el tiempo aunque la terapia se interrumpiera y se mantuvieran los animales sin tratamiento en un periodo de hasta 4 semanas. Asimismo, también confirmamos que la invasión de los tumores es un fenómeno independiente de la edad, ya que los controles no tratados no presentaban un porcentaje de tumores invasivos más elevados en función de su edad.

El grupo de la Dra Gabriele Bergers trabaja con un modelo ortotópico de glioblastoma multiforme (GBM) que se caracteriza por desarrollar glioblastomas agresivos y localmente invasivos muy similares a los GBM humanos (Blouw et al., 2003; Du et al., 2008b). Recientemente han descrito que tras la interrupción de la vía de VEGF, ya sea mediante una disrupción génica o farmacológica, se producen alteraciones en el fenotipo invasivo de los GBM, donde se adoptan formas cualitativamente diferenciadas y más invasivas, con células tumorales dispersas alrededor de la totalidad de la masa cerebral, aproximándose especialmente a los vasos normales existentes, lo que han denominado invasión tumoral perivascular (Blouw et al., 2003; Paez-Ribes et al., 2009). Sus estudios con un modelo ortotópico de GBM que fenocopia las características de los glioblastomas humanos (Blouw et al., 2003), nos ayudaron a confirmar nuestros resultados: con dos modelos totalmente distintos en forma, y sin embargo, análogos en esencia, se repitieron los incrementos de invasión tras el bloqueo de la vía de VEGF, ya fuera por inhibición farmacológica o genética.

Estas consecuencias proinvasivas de los antiangiogénicos ya se habían descrito anteriormente como un elemento colateral a la respuesta antitumoral en un modelo de GBM, habiendo sido entonces atribuidos a una coopción vascular de las células tumorales (Kunkel et al., 2001; Rubenstein et al., 2000). Más recientemente se volvió a describir un incremento en la invasión tras el tratamiento antiangiogénico en otro modelo ortotópico de GBM (Gomez-Manzano et al., 2008), obteniéndose unos resultados consistentes con los estudios previos así como con nuestras observaciones.

Todas estas evidencias experimentales nos indicaron la existencia de puntos comunes existentes entre nuestros resultados y múltiples modelos animales de cáncer, más concretamente entre modelos de GBM y tumores neuroendocrinos.

Tras el tratamiento con anti-VEGFR2 y sunitinib, además de observarse la resistencia bimodal que comportaba una evidente revascularización y un incremento de la invasión local, se describió que existía también un aumento de la incidencia de metástasis. Después de la inhibición de la angiogénesis llevada a cabo por DC101 y sunitinib se incrementó la incidencia de metástasis por vía hematogena a hígado. Esto nos indicaba que el tratamiento antiangiogénico no solamente favorece la adquisición de un fenotipo más agresivo en los tumores, si no que también facilita y promueve que las células tumorales puedan colonizar otros órganos.

Un estudio paralelo al nuestro realizado por el grupo del Dr Robert Kerbel, también describió la aceleración del proceso metastásico tras el tratamiento a tiempo corto con inhibidores tirosina quinasa. Ebos y colaboradores mostraron como se aceleraba la formación de metástasis después de tratar durante 7 días con varios inhibidores de RTKs (sunitinib, sorafenib y SU10944) previamente a la inoculación intravenosa de células tumorales humanas, o justamente después de la resección del tumor primario (Ebos et al., 2009). Conjuntamente con estos resultados pudimos concluir que la terapia antiangiogénica promovía la adquisición

de un nuevo programa pro-invasivo y pro-metastásico, el cual era independiente del modelo animal utilizado y de si éste expresaba o no el oncogen antígeno T.

La incidencia de metástasis linfáticas hacia el nódulo linfático peripancreático también se vio incrementada, pero esta vez sí observamos diferencias en función del tratamiento.

En el tratamiento con DC101 y en el realizado durante 2 semanas con sunitinib + 4 semanas de descanso, sí existían diferencias respecto a los controles, que nos indicaban un incremento de la metástasis tanto a nódulo linfático como a hígado. Pero en la terapia continuada con sunitinib observamos que la incidencia de metástasis linfática no presentaba cambios respecto a los ratones controles que habían recibido placebo. Este fenómeno podría deberse a la diferente especificidad de inhibición existente entre sunitinib y DC101. Sunitinib no solamente bloquea el VEGFR2 y los PDGFRs, también produce la inhibición del receptor asociado a vasos linfáticos VEGFR3 (Faivre et al., 2007; Roskoski, 2007). Una hipótesis que podría explicar esta ausencia de metástasis a nódulo linfático es el bloqueo específico de la señalización de VEGFR3 llevada a cabo por sunitinib. Esta inhibición podría estar alterando la estructura y la permeabilidad de los vasos linfáticos, o incluso de los propios nódulos linfáticos, impidiendo así la formación de metástasis en el caso de su uso continuado (K. Alitalo, comunicación personal).

Por el contrario, el hecho de parar la terapia con sunitinib podría permitir que se normalizasen de nuevo las estructuras linfáticas y que, 4 semanas después de la parada del tratamiento, la situación estuviera totalmente reestablecida y las células tumorales ya hubieran tenido la oportunidad de colonizar el nódulo linfático; lo que podría explicar la diferencia existente en las incidencias de metástasis linfáticas en los dos tipos de tratamiento llevados a cabo en este trabajo con sunitinib.

El modelo RIP-Tag2 β -VEGF-KO, con una ablación genética en las células tumorales para el gen *Vegf-A*, nos confirmó que el incremento de invasión venía producido por la inhibición específica de la vía VEGF/VEGFR. Además, nos permitió observar un hecho interesante: este modelo presentaba lesiones pancreáticas de tamaño reducido altamente invasivas, pero no se observó un incremento de la incidencia de metástasis a otros órganos, en contraste con lo que ocurría tras la inhibición farmacológica del VEGFR2 con DC101. Esto nos indujo a sospechar que la inhibición de una vasculatura establecida en los tumores sólidos con gran contenido de células cancerosas hiperproliferativas, era la que fomentaba la difusión metastásica, en contraste con las pequeñas lesiones avasculares presentes en los tumores de células VEGF-KO, que no llegaron a adquirir las características necesarias para llevar a cabo la diseminación a otros órganos.

Tras comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los dos tratamientos antiangiogénicos podemos afirmar que la inhibición de la vía VEGF/VEGFR promueve una resistencia adaptativa que favorece una evasión a la terapia. Inicialmente los tumores responden al tratamiento con una regresión de la vasculatura y la pérdida de numerosos vasos que comporta la consecuente inhibición del crecimiento tumoral, pero a continuación se inducen mecanismos de resistencia evasiva o adaptativa que promueven la revascularización de los tumores por vías angiogénicas alternativas, un incremento de la invasión local y una promoción de la metástasis a otros órganos (figura 67).

Estudios anteriores realizados en otros modelos animales, concluyeron que la angiogénesis producida por la vía de VEGF se correlacionaba con un incremento de invasión (Skobe et al., 1997) o metástasis (Warren et al., 1995). Contrariamente nuestros resultados, sumados a los obtenidos por los grupos de la Dra Bergers y el Dr Kerbel, ratifican una conclusión totalmente opuesta, mostrándonos la posibilidad

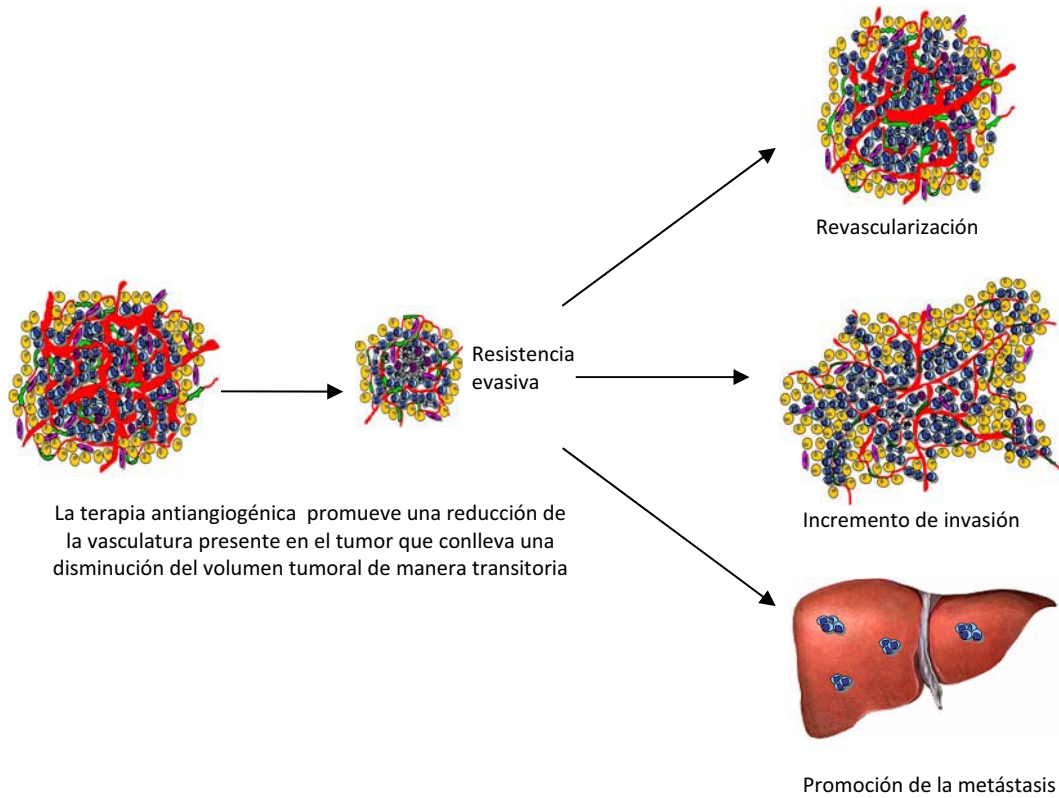


Figura 67. Resistencia adaptativa-evasiva de los tumores en respuesta a las terapias antiangiogénicas. Resumen esquemático de los efectos que tienen lugar tras la terapia antiangiogénica como consecuencia de la resistencia evasiva que se da en el interior de los tumores.

que tal vez tanto la inducción como la supresión de la angiogénesis pueden ejercer efectos proinvasivos y prometastásicos. Una posible explicación de estos resultados contrapuestos podría ser que los tumores que expresan altos niveles de VEGF (como es el caso de los utilizados en los estudios de Skobe et al. y Warren et al.) producen una vasculatura tumoral con un gran número de brotes vasculares y un recubrimiento muy pobre de pericitos, afectando de manera importante la integridad vascular.

Además, Xian y colaboradores demostraron que los tumores cuyos vasos estaban recubiertos por un bajo número de pericitos eran más propensos a producir metástasis, y que una sobreexpresión de VEGF favorece intensamente la formación de nuevos vasos, que tendrán un pobre recubrimiento de pericitos y en consecuencia, una mayor hiperpermeabilidad vascular, lo que puede traducirse en un ambiente más permisivo para que se produzca la extravasación de las células tumorales y su posterior diseminación a otros órganos (Xian et al., 2006).

Por otro lado, la terapia antiangiogénica provoca una disrupción de la vasculatura tumoral, y en algunos casos (como es el del tratamiento con sunitinib) también provoca una disrupción de la cobertura de pericitos. Estos fenómenos pueden estar afectando indirectamente a las células tumorales induciéndoles la adopción de un programa más invasivo.

Caracterización del efecto antiangiogénico y sus consecuencias tras el tratamiento con un inhibidor de una molécula implicada en la guía de nuevos vasos: Semaforina 4D.

Cuando nos propusimos bloquear Sema4D pensamos en estudiar las consecuencias que tendría a nivel de inhibición de la angiogénesis y como afectaría este bloqueo en la adquisición del nuevo programa pro-invasivo que tiene lugar en las células tumorales después del tratamiento con fármacos que inhiben la vía VEGF/VEGFR.

La unión de VEGF con VEGFR2 conduce a la activación de una cascada de múltiples vías de señalización (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006), entre las que están incluidas vías que promueven la sobreexpresión de genes involucrados en la proliferación y la migración de las células endoteliales, así como su supervivencia y que producen un aumento en la permeabilidad vascular (Kerbel, 2008). En cambio Sema4D es una molécula mucho menos relevante en angiogénesis, que está

implicada en guiar las células endoteliales durante su migración. Para que tenga lugar la estimulación de la angiogénesis por parte de Sema4D, es requisito indispensable que Plexina B1 se una a Met y lo active. Esta activación no es igual de potente que la que promueve la unión con HGF, que acaba promoviendo la sobreexpresión de VEGF (Prat et al., 1998). Es por esta razón por la que los efectos angiogénicos de Sema4D incluyen motilidad direccional de las células endoteliales y formación de nuevas estructuras tubulares, pero no la proliferación de las células endoteliales (Conrotto et al., 2005).

Estas diferencias en la potencia angiogénica entre VEGF y Sema4D, son las que nos podrían ayudar a entender el efecto parcial que observamos en nuestro estudio de hemorragia, microdensidad vascular, volumen tumoral y supervivencia tras la inhibición de Sema4D.

Uno de los aspectos más inquietantes que observamos en nuestros resultados, fue que pese a que el bloqueo de Sema4D produjera un efecto parcial en la inhibición angiogénica, se continuaban produciendo los mismos efectos pro-invasivos que habíamos observado tras la terapia con un inhibidor de la vía de VEGF. Llegados a este punto, pudimos hipotetizar que si la inhibición de la angiogénesis provocada por el tratamiento con el anticuerpo anti-Sema4D era parcial, el incremento de hipoxia en el interior de los tumores, no sería tan importante como el observado tras la terapia anti-VEGF, pero los efectos pro-invasivos continuaban estando presentes. Lo que nos indujo a pensar que la hipoxia promovida por la terapia anti-Sema4D, aunque fuera mucho menor que la que tenía lugar tras las terapias que afectaban a la vía de VEGF, era suficiente para promover la adquisición de un fenotipo más agresivo, afectando de igual manera a la célula tumoral.

Cabe recalcar que la adquisición del nuevo fenotipo invasivo tras el tratamiento anti-Sema4D, no se produjo de manera tan rápida como pudiera observarse con el tratamiento con anti-VEGFR2, si no que se produjo de una forma

más paulatina, con efectos parciales tras el tratamiento a corto plazo, pero que acabaron desembocando en porcentajes de invasión similares a los observados con la terapia anti-VEGFR2 cuando ésta era prolongada. Este fenómeno podría indicar que el efecto de la inhibición de sema4D no se producía en todos los tumores a la vez, y que tal vez tras dos semanas de terapia no todos los tumores han tenido incrementos de hipoxia, ya que mantienen la vía de VEGF, la vía angiogénica más importante intacta. Al no producirse en la mayoría de tumores hipoxia, éstos no adoptarían el fenotipo pro-invasivo descrito tras la terapia con DC101 y sunitinib.

El tratamiento concomitante de anti-VEGFR2 y anti-Sema4D no mostró tener ningún efecto añadido a la monoterapia con DC101. Esto podría deberse a que el anticuerpo anti-VEGFR2 actuaría desde el momento en que los nuevos vasos empiezan a brotar (fenómeno conocido como *sprouting*), y en cambio la terapia anti-Sema4D actuaría más tardíamente, en el momento de la ramificación de los nuevos vasos (fenómeno conocido como *branching*), dónde se encargaría de guiar a las células endoteliales y favorecer que éstas formasen nuevas estructuras tubulares. Si se produjera una inhibición en el momento del *sprouting*, no se obtendría proliferación de las células endoteliales, y como consecuencia no se llegaría a observar *branching*. Esto podría indicarnos la razón por la cual la combinación de ambas terapias no tuvo ningún efecto adicional sobre la monoterapia con anti-VEGFR2.

Estudio de las causas de la invasión tras recibir tratamiento antiangiogénico.

Tras el estudio de los resultados obtenidos en este trabajo surgió la pregunta: ¿Qué hace que los tumores sean más invasivos después de recibir terapia antiangiogénica?

Una posibilidad es que los tumores eleven la actividad de un nuevo programa proinvasivo que no era el que dirigía inicialmente el crecimiento tumoral en presencia de angiogénesis, que podría ser cualitativamente diferente a la vía utilizada normalmente en la progresión tumoral normal.

Los efectos pro-invasivos y pro-metastásicos tras la terapia antiangiogénica observados pueden ser explicados por diferentes mecanismos. Por ejemplo, la terapia puede a) provocar un aumento de la hipoxia, que produce un incremento en la expresión de c-met (Pennacchiotti et al., 2003; Steeg, 2003), un proto-oncogen implicado en invasión y metástasis; b) activar y sobreexpresar metaloproteinasas de matriz (Cairns et al., 2003) que pueden favorecer la diseminación de células tumorales a expensas de la degradación de la matriz extracelular; c) reclutar BMDC (células derivadas de la médula ósea) (Du et al., 2008a) que funcionan como moduladores vasculares y favorecen la supervivencia de las células tumorales; pudiendo así incrementar potencialmente la invasión y la metástasis.

En este trabajo correlacionamos la hipoxia con el incremento de invasión que tenía lugar tras el tratamiento con antiangiogénicos en nuestro modelo de tumores neuroendocrinos. Describimos como los tumores hipóxicos eran, generalmente, los más invasivos. En este sentido, existen estudios genéticos que implican la hipoxia/ la vía de HIF-1 α como instigadora de la invasión y de la metástasis (Du et al., 2008a; Pennacchiotti et al., 2003).

Todo parece indicar que la hipoxia induciría nuevos mecanismos que podrían contribuir en la adquisición de un fenotipo más invasivo, como por ejemplo en la activación o la sobreexpresión de proteasas extracelulares (como MMPs o catepsinas) u otros circuitos proinvasivos.

Higgins y colaboradores, describieron como la hipoxia en un modelo de cáncer renal promovía una transición epitelio mesénquima (EMT). La falta de oxígeno promovía que las células tumorales presentaran una pérdida de las

moléculas implicadas en adhesión, como E-cadherina, y un incremento en la expresión de moléculas mesenquimales que favorecían la invasión y la metástasis, como N-cadherina (Higgins et al., 2007). En otro estudio llevado a cabo por el grupo del Dr Gerhard Christofori, se describió un modelo de invasión mediante EMT en RIP-Tag2. Describieron como en la transición adenoma- carcinoma se perdía la expresión de E-cadherina, lo que favorecía que se perdieran las uniones célula-célula, aunque este fenómeno, si se daba de forma aislada, no era suficiente para inducir por sí solo, la invasión tumoral y la metástasis (Perl et al., 1998).

El estudio detallado de nuestras secciones de parafina también nos proporcionó evidencias sobre la manera en que se produce la invasión. Cuando los tumores neuroendocrinos adquirían el fenotipo invasivo tras la inhibición de la vía de VEGF, la invasión tenía lugar en forma de digitaciones. Observamos que las células se mantenían fuertemente unidas mientras invadían el tejido acinar adyacente, lo que parecía indicarnos que las células tumorales no perdían el fenotipo epitelial para llevar a cabo la invasión local, y que las uniones intercelulares se mantenían firmes tras la adquisición del nuevo fenotipo más agresivo. Además en el interior de algunos de los vasos de mayor calibre presentes en el páncreas pudimos observar grupos de células fuertemente unidas, sugiriendo que la invasión de órganos distantes se inicia mediante la vasoinvasión de un grupo de células, que mantiene fuertemente sus uniones célula-célula y que la colonización del parénquima hepático se inicia mediante un embolismo en los vasos del hígado producido por éstos grupos celulares. Estas observaciones demostraron que el tratamiento antiangiogénico promueve la creación de zonas hipóxicas en el interior de los tumores, y este fenómeno se traduce en un incremento en la invasión local y en la metástasis. Pero no observamos que esta hipoxia implicara pérdidas en los marcadores epiteliales como habían descrito Higgins y colaboradores. Al contrario, determinamos un incremento en la expresión de E-cadherina en aquellos tumores que habían sido tratados con terapia antiangiogénica, y que resultaron ser los más invasivos. Esto nos indicaba que las uniones intercelulares no sólo se mantenían, si

no que se veían aumentadas. Con estos resultados, pudimos desestimar la idea que tras el tratamiento antiangiogénico se incrementaba la invasión mediante EMT.

Wicki y colaboradores describieron que la invasión celular colectiva se daba gracias a la formación de filopodios y polarización celular; promovía la sobre-expresión de la β 1-integrina y la adhesión a la matriz extracelular; y que conducía a una forma de invasión dependiente de la acción de las MMPs (Wicki et al., 2006). Otros estudios habían descrito que la invasión celular colectiva mantenía los marcadores epiteliales, como la adhesión célula-célula causada por E-cadherina y la adhesión célula-matriz extracelular mediada por integrinas (Friedl et al., 2004; Friedl and Wolf, 2003). Estos estudios podrían explicar lo que nosotros observamos en nuestro modelo: la hipoxia favorecería que se desarrollara un programa pro-invasivo mediado por una invasión celular colectiva, que permitiría un cambio en el fenotipo del tumor.

Otra molécula importante en el desarrollo tumoral es NCAM. Se describió en varios tipos celulares como su expresión cambiaba de la forma adulta de 120 kDa a las formas embrionarias de 140 y 180 kDa, aunque el significado biológico de este cambio y su papel en la progresión tumoral aun no ha sido dilucidado (Fogar et al., 1997; Johnson, 1991). Pero además de este cambio en la isoforma, también se correlacionó la reducción en la expresión de NCAM con un peor pronóstico en varios tipos tumorales (Fogar et al., 1997; Perl et al., 1999). Un estudio realizado por el grupo del Dr Christofori describió en el modelo RIP-Tag2 que la ausencia forzada de la isoforma de 120kDa de NCAM, alteraba la habilidad de las células tumorales para adherirse a varios sustratos (Cavallaro and Christofori, 2001; Perl et al., 1999). Esta pérdida en la adhesión podría dar como resultado una dramática disgregación del tumor, con la consecuente formación de espacios hemorrágicos en su interior que podrían favorecer que se formaran grupos reducidos de células, capaces de mantener las uniones intercelulares, pero incapaces de mantenerse unidas a la

membrana basal, por lo que se verían arrastradas por la circulación sanguínea o linfática. Todo estos fenómenos podrían explicar como se promueve la invasión y como se inician las metástasis, tanto linfáticas como hematógenas que observamos tras la terapia antiangiogénica.

Relevancia clínica

Pese a la eficacia transitoria que hoy día se está observando en la clínica, los inhibidores de la angiogénesis presentan importantes opciones terapéuticas que constituyen mejoras no sólo en términos clínicos, si no también presentando una reducida toxicidad si se compara con las terapias tradicionales utilizadas para tratar las neoplasias.

Pero tras la obtención de los resultados presentados en este trabajo surge la pregunta: ¿Cual es su relevancia clínica?

Valdría la pena hacer especial hincapié en el elevadísimo número de tipos tumorales que están siendo diana de la terapia antiangiogénica en diversos ensayos clínicos, como se muestra en la figura 7 de la presente memoria (tabla publicada en 2007, (Folkman, 2007)). Los beneficios que han mostrado los inhibidores de la angiogénesis han sido bastante discretos (Faivre et al., 2007; Goodman et al., 2007; Hurwitz et al., 2004) pero todavía se siguen desarrollando nuevos inhibidores y se continúan realizando gran número de ensayos clínicos en diferentes tipos tumorales con los fármacos ya aceptados para el tratamiento de algunas neoplasias.

Tal vez valdría la pena hacer una reflexión acerca de este uso indiscriminado de los inhibidores de la angiogénesis, optando por una medicina más personalizada en la que se valorara su potencialidad en cada caso.

En lo referente al modelo tumoral que hemos utilizado en nuestro estudio, no existen suficientes datos obtenidos en la clínica sobre la respuesta de los

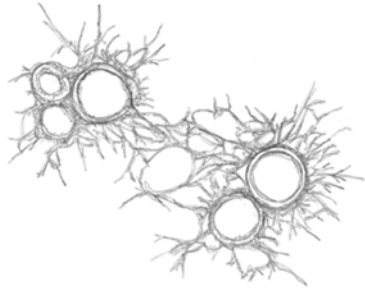
tumores neuroendocrinos pancreáticos debido a su rareza y al limitado número de pacientes que han sido tratados en ensayos clínicos con fármacos antiangiogénicos.

En el estudio de otros tipos tumorales no existen claras evidencias de que la terapia antiangiogénica produzca aumentos de invasión o metástasis, pero existen casos, como el de glioblastoma, donde se ha observado que tras la terapia antiangiogénica, sobretodo la llevada a cabo con bevacizumab, se produce una progresión adaptativa de la enfermedad, como sugieren las imágenes de resonancia magnética en un conjunto de pacientes con GBM. Se ha observado que estos pacientes desarrollan recurrencias multifocales durante el curso de la terapia (Fischer et al., 2008; Narayana et al., 2009; Norden et al., 2008).

En otros casos se ha observado un recrecimiento exacerbado del tumor durante los periodos de descanso de la terapia (Burstein et al., 2008); después de parar el tratamiento en pacientes de carcinoma renal tratados con sunitinib o sorafenib (Desar et al., 2009; Wolter et al., 2009); o en pacientes de cáncer de colon tratados con bevacizumab en combinación con quimioterapia (Cacheux et al., 2008). Es más, en ciertos análisis retrospectivos se ha determinado que existen incrementos en la invasión local y en la metástasis a otros órganos después de la interrupción de la terapia anti-VEGFR (Johannsen et al., 2009). Por todas estas razones se deberían realizar estudios más detallados acerca del efecto que comporta el uso de antiangiogénicos en los diferentes estadios tumorales, para poder determinar que efectos podrían tener este tipo de fármacos en estadios en los que la enfermedad metastásica está ya establecida, o en el caso contrario, en el que la enfermedad se encuentra en estadios iniciales.

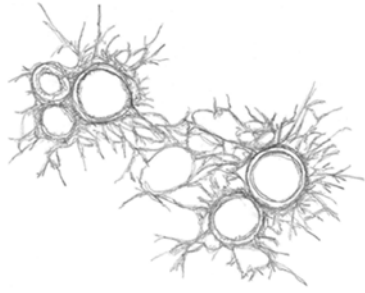
Todos estos fenómenos abren una importantísima puerta hacia el desarrollo de nuevas drogas que permitan contrarrestar los posibles efectos pro-invasivos y pro-metastásicos que los fármacos antiangiogénicos pudieran presentar en la clínica. Así se podría enfocar la investigación en combinaciones de fármacos que admitan su uso conjuntamente con los antiangiogénicos, y permitan la

administración de nuevos tratamientos que comporten una menor toxicidad respecto a las terapias tradicionales. Asimismo también valdría la pena determinar a qué es debida esta resistencia adaptativa tras la terapia e intentar esclarecer si existen determinadas mutaciones en las células tumorales que favorecen esta evasión a las terapias que conlleva un incremento invasivo.



Conclusiones

- Tras la inhibición de la vía VEGF/VEGFR2, se produce una resistencia adaptativa que promueve un incremento de la invasión local en un modelo transgénico de tumores pancreáticos: RIP-Tag2.
- La resistencia adaptativa al tratamiento antiangiogénico anti-VEGFR2 acelera el proceso metastásico, incrementando la diseminación hematológica a hígado y linfática a nódulo linfático.
- La inhibición de una molécula encargada de guiar las células endoteliales durante la ramificación de la vasculatura, Semaforina 4D, produce un efecto antiangiogénico, antitumoral y pro-supervivencia parcial.
- Una inhibición parcial de la angiogénesis, como la producida por el anticuerpo anti-Semaforina 4D, es suficiente para promover la adquisición de un fenotipo más agresivo por parte de las células tumorales, incrementando la invasión local y la metástasis a otros órganos.
- Tras la terapia antiangiogénica se produce hipoxia en el interior de los tumores que se correlaciona con un fenotipo más invasivo.
- Tras la inhibición farmacológica de la vía VEGF/VEGFR2 se produce un cambio en la expresión de las moléculas de adhesión de las células tumorales, que incluye sobreexpresión de E-cadherina e infraexpresión de NCAM, que favorece un modelo de invasión celular colectiva.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA**A**

Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., and Cherrington, J. M. (2003a). SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2, 471-478.

Abrams, T. J., Murray, L. J., Pesenti, E., Holway, V. W., Colombo, T., Lee, L. B., Cherrington, J. M., and Pryer, N. K. (2003b). Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care" therapeutic agents for the treatment of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2, 1011-1021.

Adams, J. M., and Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science* 254, 1161-1167.

Ali, S. H., and DeCaprio, J. A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Seminars in cancer biology* 11, 15-23.

Allt, G., and Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 169, 1-11.

B

Barberis, D., Casazza, A., Sordella, R., Corso, S., Artigiani, S., Settleman, J., Comoglio, P. M., and Tamagnone, L. (2005). p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling. *Journal of cell science* 118, 4689-4700.

Basile, J. R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K. L., and Gutkind, J. S. (2004). Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer research* 64, 5212-5224.

Basile, J. R., Castilho, R. M., Williams, V. P., and Gutkind, J. S. (2006). Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9017-9022.

Basile, J. R., Holmbeck, K., Bugge, T. H., and Gutkind, J. S. (2007). MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. *The Journal of biological chemistry* 282, 6899-6905.

Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., *et al.* (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer cell* *11*, 83-95.

Benjamin, L. E., Hemo, I., and Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)* *125*, 1591-1598.

Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* *8*, 592-603.

Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* *284*, 808-812.

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* *111*, 1287-1295.

Berns, A. (2001). Cancer. Improved mouse models. *Nature* *410*, 1043-1044.

Bienz, M., and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* *103*, 311-320.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* *376*, 768-771.

Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H. P., Johnson, R. S., and Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer cell* *4*, 133-146.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* *251*, 802-804.

Bouck, N. (1996). P53 and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* *1287*, 63-66.

Burstein, H. J., Elias, A. D., Rugo, H. S., Cobleigh, M. A., Wolff, A. C., Eisenberg, P. D., Lehman, M., Adams, B. J., Bello, C. L., DePrimo, S. E., *et al.* (2008). Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol* *26*, 1810-1816.

Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffe, A., and Comoglio, P. M. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *The Journal of cell biology* *119*, 629-641.

C

Cacheux, W., Boisserie, T., Staudacher, L., Vignaux, O., Dousset, B., Soubrane, O., Terris, B., Mateus, C., Chaussade, S., and Goldwasser, F. (2008). Reversible tumor growth acceleration following bevacizumab interruption in metastatic colorectal cancer patients scheduled for surgery. *Ann Oncol* *19*, 1659-1661.

Cairns, R. A., Khokha, R., and Hill, R. P. (2003). Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Current molecular medicine* *3*, 659-671.

Capparuccia, L., and Tamagnone, L. (2009). Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *Journal of cell science* *122*, 1723-1736.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* *9*, 653-660.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249-257.

Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* *436*, 193-200.

Carron, C. P., Meyer, D. M., Pegg, J. A., Engleman, V. W., Nickols, M. A., Settle, S. L., Westlin, W. F., Ruminski, P. G., and Nickols, G. A. (1998). A peptidomimetic antagonist of the integrin $\alpha(v)\beta3$ inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer research* *58*, 1930-1935.

Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell* *8*, 299-309.

Casazza, A., Fazzari, P., and Tamagnone, L. (2007). Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology* *600*, 90-108.

Castillo-Avila, W., Piulats, J. M., Garcia Del Muro, X., Vidal, A., Condom, E., Casanovas, O., Mora, J., Germa, J. R., Capella, G., Villanueva, A., and Vinals, F. (2009). Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 15, 3384-3395.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et biophysica acta* 1552, 39-45.

Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M. A., Cotten, M., and Christofori, G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer research* 60, 7163-7169.

Conrotto, P., Valdembrì, D., Corso, S., Serini, G., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Bussolino, F., and Giordano, S. (2005). Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 105, 4321-4329.

Chavakis, E., and Dimmeler, S. (2002). Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 887-893.

Cheng, N., Brantley, D., Fang, W. B., Liu, H., Fanslow, W., Cerretti, D. P., Bussell, K. N., Reith, A., Jackson, D., and Chen, J. (2003). Inhibition of VEGF-dependent multistage carcinogenesis by soluble EphA receptors. *Neoplasia* 5, 445-456.

Cherrington, J. M., Strawn, L. M., and Shawver, L. K. (2000). New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Advances in cancer research* 79, 1-38.

Chow, L. Q., and Eckhardt, S. G. (2007). Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 25, 884-896.

D

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584.

Darland, D. C., Massingham, L. J., Smith, S. R., Piek, E., Saint-Geniez, M., and D'Amore, P. A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental biology* 264, 275-288.

de Bouard, S., Herlin, P., Christensen, J. G., Lemoisson, E., Gauduchon, P., Raymond, E., and Guillamo, J. S. (2007). Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro-oncology* 9, 412-423.

Delaire, S., Billard, C., Tordjman, R., Chedotal, A., Elhabazi, A., Bensussan, A., and Boumsell, L. (2001). Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 166, 4348-4354.

Demetri, G. D., van Oosterom, A. T., Garrett, C. R., Blackstein, M. E., Shah, M. H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I. R., Heinrich, M. C., Morgan, J. A., *et al.* (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368, 1329-1338.

Desar, I. M., Mulder, S. F., Stillebroer, A. B., van Spronsen, D. J., van der Graaf, W. T., Mulders, P. F., and van Herpen, C. M. (2009). The reverse side of the victory: flare up of symptoms after discontinuation of sunitinib or sorafenib in renal cell cancer patients. A report of three cases. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 48, 927-931.

Dhanabal, M., Wu, F., Alvarez, E., McQueeney, K. D., Jeffers, M., MacDougall, J., Boldog, F. L., Hackett, C., Shenoy, S., Khramtsov, N., *et al.* (2005). Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis. *Cancer biology & therapy* 4, 659-668.

Dirkx, A. E., Oude Egbrink, M. G., Wagstaff, J., and Griffioen, A. W. (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* 80, 1183-1196.

Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R. S., Werb, Z., and Bergers, G. (2008a). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* 13, 206-220.

Du, R., Petritsch, C., Lu, K., Liu, P., Haller, A., Ganss, R., Song, H., Vandenberg, S., and Bergers, G. (2008b). Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-oncology* 10, 254-264.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology* 146, 1029-1039.

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F., and Dvorak, A. M. (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Current topics in microbiology and immunology* 237, 97-132.

E

Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K. H., and Augustin, H. G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer research* 60, 1388-1393.

Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., and Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer cell* 15, 232-239.

Elhabazi, A., Delaire, S., Bensussan, A., Boumsell, L., and Bismuth, G. (2001). Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *J Immunol* 166, 4341-4347.

Eliceiri, B. P., and Cheresh, D. A. (1999). The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103, 1227-1230.

Enenstein, J., Waleh, N. S., and Kramer, R. H. (1992). Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 203, 499-503.

Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A. D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H. P., Menger, M. D., Ullrich, A., and Vajkoczy, P. (2004). Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *Faseb J* 18, 338-340.

F

Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., *et al.* (2006). Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 24, 25-35.

Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., and Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature reviews* 6, 734-745.

Fernando, N. T., Koch, M., Rothrock, C., Gollogly, L. K., D'Amore, P. A., Ryeom, S., and Yoon, S. S. (2008). Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. *Clin Cancer Res* 14, 1529-1539.

Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2, 795-803.

Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 18, 4-25.

Fischer, I., Cunliffe, C. H., Bollo, R. J., Raza, S., Monoky, D., Chiriboga, L., Parker, E. C., Golfinos, J. G., Kelly, P. J., Knopp, E. A., *et al.* (2008). High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro-oncology* 10, 700-708.

Fogar, P., Basso, D., Pasquali, C., De Paoli, M., Sperti, C., Roveroni, G., Pedrazzoli, S., and Plebani, M. (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer research* 17, 1227-1230.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (1987). What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *European journal of cancer & clinical oncology* 23, 361-363.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews* 6, 273-286.

Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.

Fredriksson, L., Li, H., and Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews* 15, 197-204.

Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48, 441-449.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.

G

Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)* *126*, 1149-1159.

Giaccia, A. J. (1996). Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Seminars in radiation oncology* *6*, 46-58.

Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S., and Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* *136*, 261-276.

Gomez-Manzano, C., Holash, J., Fueyo, J., Xu, J., Conrad, C. A., Aldape, K. D., de Groot, J. F., Bekele, B. N., and Yung, W. K. (2008). VEGF Trap induces antiangioma effect at different stages of disease. *Neuro-oncology* *10*, 940-945.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 6624-6628.

Goodman, V. L., Rock, E. P., Dagher, R., Ramchandani, R. P., Abraham, S., Gobburu, J. V., Booth, B. P., Verbois, S. L., Morse, D. E., Liang, C. Y., *et al.* (2007). Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* *13*, 1367-1373.

Gorre, M. E., and Sawyers, C. L. (2002). Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Current opinion in hematology* *9*, 303-307.

Gschwind, A. Fischer, O. M. Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *4*, 361-70

Grant, D. S., Kleinman, H. K., Goldberg, I. D., Bhargava, M. M., Nickoloff, B. J., Kinsella, J. L., Polverini, P., and Rosen, E. M. (1993). Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 1937-1941.

Gullberg, M., Gustafsdottir, S. M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegard, M., Betsholtz, C., Landegren, U., and Fredriksson, S. (2004). Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8420-8424.

Guo, D., Jia, Q., Song, H. Y., Warren, R. S., and Donner, D. B. (1995). Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of

signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 270, 6729-6733.

H

Halloran, M. C., and Wolman, M. A. (2006). Repulsion or adhesion: receptors make the call. *Current opinion in cell biology* 18, 533-540.

Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115-122.

Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50.

Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., and Arbeit, J. (1996). Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 32A, 2386-2393.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K., and McDonald, D. M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American journal of pathology* 156, 1363-1380.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., and Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine* 3, 177-182.

Herold, C., Bismuth, G., Bensussan, A., and Bomsell, L. (1995). Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb. *International immunology* 7, 1-8.

Hicklin, D. J., and Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23, 1011-1027.

Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., *et al.* (2007). Hypoxia

promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 3810-3820.

Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., and Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4607-4612.

Holash, J., Wiegand, S. J., and Yancopoulos, G. D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18, 5356-5362.

Huang, X., Molema, G., King, S., Watkins, L., Edgington, T. S., and Thorpe, P. E. (1997). Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 275, 547-550.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.

I

Inoue, M., Hager, J. H., Ferrara, N., Gerber, H. P., and Hanahan, D. (2002). VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer cell* 1, 193-202.

J

Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.

Jain, R. K., and Booth, M. F. (2003). What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest* 112, 1134-1136.

Jimenez, B., and Volpert, O. V. (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 78, 663-672.

Johannsen, M., Florcken, A., Bex, A., Roigas, J., Cosentino, M., Ficarra, V., Kloeters, C., Rief, M., Rogalla, P., Miller, K., and Grunwald, V. (2009). Can tyrosine kinase inhibitors be discontinued in patients with metastatic renal cell carcinoma and a complete response to treatment? A multicentre, retrospective analysis. *European urology* 55, 1430-1438.

Johnson, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer metastasis reviews* 10, 11-22.

K

Kabbinavar, F. F., Hambleton, J., Mass, R. D., Hurwitz, H. I., Bergsland, E., and Sarkar, S. (2005a). Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 3706-3712.

Kabbinavar, F. F., Schulz, J., McCleod, M., Patel, T., Hamm, J. T., Hecht, J. R., Mass, R., Perrou, B., Nelson, B., and Novotny, W. F. (2005b). Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23, 3697-3705.

Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4895-4902.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2, 727-739.

Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505-515.

Kerbel, R. S. (2005). Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed. *Cancer cell* 8, 269-271.

Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358, 2039-2049.

Kikutani, H., and Kumanogoh, A. (2003). Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. *Nat Rev Immunol* 3, 159-167.

Kindler, H. L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M. F., O'Reilly, E., Wozniak, T. F., *et al.* Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 28, 3617-3622.

Klagsbrun, M., and Eichmann, A. (2005). A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 535-548.

Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D. J., Bohlen, P., and Kerbel, R. S. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF

receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 105, R15-24.

Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., and Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., *et al.* (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621-631.

Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M. A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M., and Lamszus, K. (2001). Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer research* 61, 6624-6628.

L

Levine, A. J., Finlay, C. A., and Hinds, P. W. (2004). P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 116, S67-69, 61 p following S69.

Lopez, T., and Hanahan, D. (2002). Elevated levels of IGF-1 receptor convey invasive and metastatic capability in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer cell* 1, 339-353.

M

Maina, F., and Klein, R. (1999). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nature neuroscience* 2, 213-217.

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., *et al.* (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60.

Mancuso, M. R., Davis, R., Norberg, S. M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V. J., Inai, T., Brooks, P., Freemark, B., *et al.* (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 116, 2610-2621.

McDonald, D. M., and Choyke, P. L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature medicine* 9, 713-725.

Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., *et al.* (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9, 327-337.

Miao, H. Q., Soker, S., Feiner, L., Alonso, J. L., Raper, J. A., and Klagsbrun, M. (1999). Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *The Journal of cell biology* 146, 233-242.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

Motzer, R. J., and Bukowski, R. M. (2006). Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 5601-5608.

Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., *et al.* (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 115-124.

N

Narayana, A., Kelly, P., Golfinos, J., Parker, E., Johnson, G., Knopp, E., Zagzag, D., Fischer, I., Raza, S., Medabalmi, P., *et al.* (2009). Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *Journal of neurosurgery* 110, 173-180.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13, 9-22.

Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 12, 13-19.

Neufeld, G., Shraga-Heled, N., Lange, T., Guttmann-Raviv, N., Herzog, Y., and Kessler, O. (2005). Semaphorins in cancer. *Front Biosci* 10, 751-760.

Norden, A. D., Young, G. S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G. L., Ciampa, A. S., Ebbeling, L. G., Levy, B., Drappatz, J., *et al.* (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 70, 779-787.

O

O'Connor, R., Clynes, M., Dowling, P., O'Donovan, N., and O'Driscoll, L. (2007). Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 3, 805-817.

O'Farrell, A. M., Abrams, T. J., Yuen, H. A., Ngai, T. J., Louie, S. G., Yee, K. W., Wong, L. M., Hong, W., Lee, L. B., Town, A., *et al.* (2003). SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101, 3597-3605.

Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305, 862-865.

Oliner, J., Min, H., Leal, J., Yu, D., Rao, S., You, E., Tang, X., Kim, H., Meyer, S., Han, S. J., *et al.* (2004). Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer cell* 6, 507-516.

P

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell* 15, 220-231.

Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., and Alitalo, K. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer research* 52, 5738-5743.

Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular biology of the cell* 4, 1317-1326.

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell* 3, 347-361.

Perl, A. K., Dahl, U., Wilgenbus, P., Cremer, H., Semb, H., and Christofori, G. (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nature medicine* 5, 286-291.

Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.

Pietras, K., and Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J Clin Oncol* 23, 939-952.

Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837-1851.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 305-315.

Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F., and Comoglio, P. M. (1998). Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of cell science* 111 (Pt 2), 237-247.

Prenen, H., Cools, J., Mentens, N., Folens, C., Sciot, R., Schoffski, P., Van Oosterom, A., Marynen, P., and Debiec-Rychter, M. (2006). Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 12, 2622-2627.

R

Rastinejad, F., Polverini, P. J., and Bouck, N. P. (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56, 345-355.

Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., and Harris, A. L. (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer research* 57, 963-969.

Rizzolio, S., and Tamagnone, L. (2007). Semaphorin signals on the road to cancer invasion and metastasis. *Cell adhesion & migration* 1, 62-68.

Roskoski, R., Jr. (2007). Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 356, 323-328.

Rubenstein, J. L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D. F., and Shuman, M. A. (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* 2, 306-314.

S

Saltz, L. B., Lenz, H. J., Kindler, H. L., Hochster, H. S., Wadler, S., Hoff, P. M., Kemeny, N. E., Hollywood, E. M., Gonen, M., Quinones, M., *et al.* (2007). Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 25, 4557-4561.

Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. (1995). A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 10, 135-147.

Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B., and Mignatti, P. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology* 141, 1659-1673.

Sepp, N. T., Li, L. J., Lee, K. H., Brown, E. J., Caughman, S. W., Lawley, T. J., and Swerlick, R. A. (1994). Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. *The Journal of investigative dermatology* 103, 295-299.

Serini, G., Napione, L., and Bussolino, F. (2008). Integrins team up with tyrosine kinase receptors and plexins to control angiogenesis. *Current opinion in hematology* 15, 235-242.

Serini, G., Valdembrì, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., *et al.* (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424, 391-397.

Shaked, Y., Ciarrocchi, A., Franco, M., Lee, C. R., Man, S., Cheung, A. M., Hicklin, D. J., Chaplin, D., Foster, F. S., Benezra, R., and Kerbel, R. S. (2006). Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 313, 1785-1787.

Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312, 549-560.

Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 5, 519-524.

Shojaei, F., and Ferrara, N. (2007). Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 13, 345-348.

Shojaei, F., Wu, X., Malik, A. K., Zhong, C., Baldwin, M. E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25, 911-920.

Sierra, J. R., Corso, S., Caione, L., Cepero, V., Conrotto, P., Cignetti, A., Piacibello, W., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Comoglio, P. M., *et al.* (2008). Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med* 205, 1673-1685.

Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S., and Fusenig, N. E. (1997). Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nature medicine* 3, 1222-1227.

Sofuni, A., Iijima, H., Moriyasu, F., Nakayama, D., Shimizu, M., Nakamura, K., Itokawa, F., and Itoi, T. (2005). Differential diagnosis of pancreatic tumors using ultrasound contrast imaging. *Journal of gastroenterology* 40, 518-525.

Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of cellular biochemistry* 85, 357-368.

Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M., and Birchmeier, C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the *c-met* tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *The Journal of cell biology* 123, 223-235.

Steeg, P. S. (2003). Angiogenesis inhibitors: motivators of metastasis? *Nature medicine* 9, 822-823.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.

T

Terman, B. I., Riek, R. P., Grodski, A., Hess, H. J., and Graham, R. M. (1990). Identification and structural characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Molecular pharmacology* 37, 526-534.

Toyofuku, T., Yabuki, M., Kamei, J., Kamei, M., Makino, N., Kumanogoh, A., and Hori, M. (2007). Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. *The EMBO journal* 26, 1373-1384.

V

Van Dyke, T., and Jacks, T. (2002). Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108, 135-144.

Verhoef, C., de Wilt, J. H., and Verheul, H. M. (2006). Angiogenesis inhibitors: perspectives for medical, surgical and radiation oncology. *Current pharmaceutical design* 12, 2623-2630.

W

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 269, 26988-26995.

Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A., and Ferrara, N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95, 1789-1797.

Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *The Journal of cell biology* 121, 145-154.

Weidner, N. (1993). Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Seminars in diagnostic pathology* 10, 302-313.

Wicki, A., Lehembre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., and Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer cell* 9, 261-272.

Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., *et al.* (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* *64*, 7099-7109.

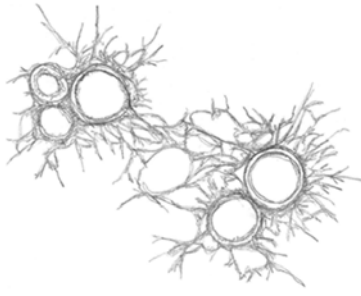
Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine* *10*, 145-147.

Wolter, P., Beuselink, B., Pans, S., and Schoffski, P. (2009). Flare-up: an often unreported phenomenon nevertheless familiar to oncologists prescribing tyrosine kinase inhibitors. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* *48*, 621-624.

X

Xian, X., Hakansson, J., Stahlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., and Semb, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest* *116*, 642-651.

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* *407*, 242-248.



Publicaciones

Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis

Marta Pàez-Ribes,^{1,6} Elizabeth Allen,^{2,6} James Hudock,³ Takaaki Takeda,⁴ Hiroaki Okuyama,⁴ Francesc Viñals,^{1,5} Masahiro Inoue,⁴ Gabriele Bergers,³ Douglas Hanahan,^{2,*} and Oriol Casanovas^{1,*}

¹Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

²Department of Biochemistry & Biophysics, Diabetes Center, and Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center

³Department of Neurosurgery and Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center
University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA

⁴Department of Biochemistry, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka 537-8511, Japan

⁵Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, IDIBELL, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: dh@ucsf.edu (D.H.), ocasanovas@iconcologia.net (O.C.)

DOI 10.1016/j.ccr.2009.01.027

SUMMARY

Multiple angiogenesis inhibitors have been therapeutically validated in preclinical cancer models, and several in clinical trials. Here we report that angiogenesis inhibitors targeting the VEGF pathway demonstrate anti-tumor effects in mouse models of pancreatic neuroendocrine carcinoma and glioblastoma but concomitantly elicit tumor adaptation and progression to stages of greater malignancy, with heightened invasiveness and in some cases increased lymphatic and distant metastasis. Increased invasiveness is also seen by genetic ablation of the *Vegf-A* gene in both models, substantiating the results of the pharmacological inhibitors. The realization that potent angiogenesis inhibition can alter the natural history of tumors by increasing invasion and metastasis warrants clinical investigation, as the prospect has important implications for the development of enduring antiangiogenic therapies.

INTRODUCTION

Judah Folkman's long-standing vision of angiogenesis as a therapeutic target (Folkman, 1971) has been increasingly validated in both traditional transplant tumor models and genetically engineered mouse models of cancer, beginning in the mid-1990s and continuing to the present (Parangi et al., 1996; Shaked et al., 2005). The "angiogenic switch" during tumor progression (Hanahan and Folkman, 1996) is increasingly recognized as constituting a rate-limiting secondary event in tumorigenesis (Hanahan and Weinberg, 2000) that can be effectively targeted as a successful therapeutic approach to treat cancer; clinically, proof of concept has begun with the recent regulatory approvals of three antiangiogenic therapies targeting the VEGF/VEGFR2 pathway in certain types of cancer (Folkman, 2007; Folkman

and Ingber, 1992; Kerbel, 2000). Notably, like most systemic therapies, these drugs have not produced enduring efficacy in terms of either tumor shrinkage or dormancy (stable disease) or long-term survival; rather, the common result is delayed time to progression following a period of clinical benefit, which is suggestive of an emergent resistance to the antiangiogenic therapy (Bergers and Hanahan, 2008; Kerbel et al., 2001; Miller et al., 2005).

Recently, experimental evidence has been developed in support of this proposition: VEGF receptor inhibition in a mouse model of pancreatic islet cancer reveals an initial response with vascular dropout and tumor stasis, but tumors then adapt and begin regrowing via a process referred to as "evasive resistance," based on the observed upregulation of alternative proangiogenic signals that include functional involvement of fibroblast

SIGNIFICANCE

Angiogenesis inhibitors targeting the VEGF signaling pathway have proven to be efficacious in preclinical cancer models and in clinical trials. While antitumoral effects and survival benefit are often evident, relapse to progressive tumor growth typically ensues, reflecting multiple mechanisms of adaptation to antiangiogenic therapies. Our findings further implicate angiogenesis inhibition as a driving force in tumor progression to stages of greater malignancy, reflected in heightened invasion into surrounding tissue and in some cases increased lymphatic and distant metastasis. Thus, antiangiogenic therapy that effectively inhibits neovascularization and produces antitumor effects and survival benefit can additionally alter the phenotype of tumors by increasing invasion and metastasis. This realization motivates clinical studies to confirm and potentially target this insidious consequence of antiangiogenic therapies.

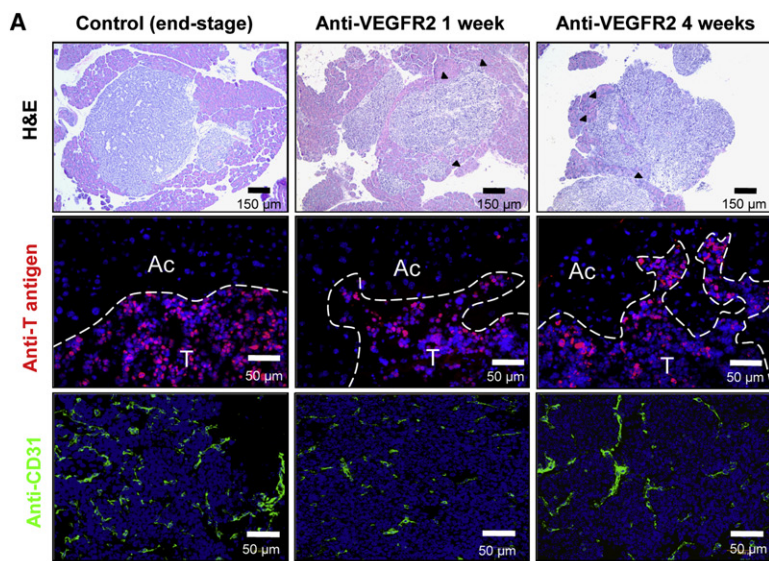


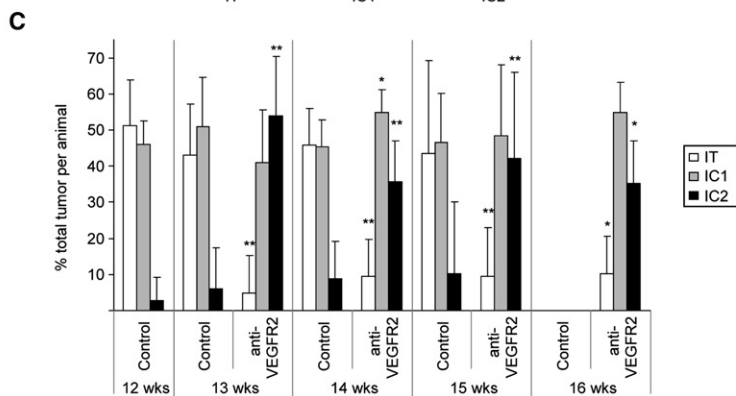
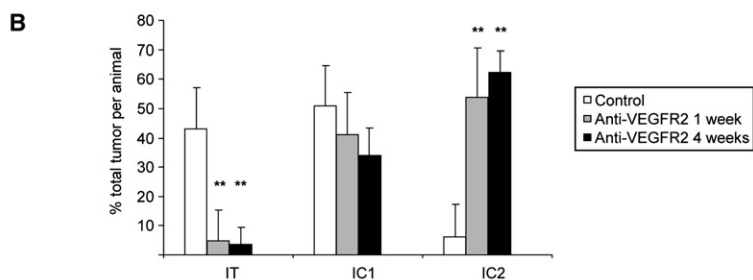
Figure 1. Increased Invasive Phenotype after Anti-VEGFR2 Therapy

Histological analysis and quantification of tumor invasion in anti-VEGFR2 antibody (DC101)-treated or control immunocompromised tumor-bearing RIP1-Tag2 animals are presented.

(A) Histological images of tumors from control, 1-week, and 4-week treatment arms are shown in hematoxylin and eosin staining (H&E; top row), indicating prominent invasive fronts in the treated animals (black arrowheads); high-magnification images of immunofluorescence staining for SV40 T antigen (middle row), where T indicates tumor and Ac indicates surrounding acinar tissue; and immunodetection of the vasculature with anti-CD31 antibody (bottom row), where a central view of the tumor parenchyma is shown.

(B) Quantification of tumor invasiveness represented as the percentage of encapsulated islet tumors (IT), microinvasive carcinomas (IC1), and fully invasive carcinomas (IC2) for the three different treatments. Both anti-VEGFR2 treatments show a statistically significant decrease in the percentage of IT and a significant increase in IC2 tumors (** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test).

(C) Quantification of tumor invasiveness in animals treated for only 1 week with anti-VEGFR2 antibody and then maintained without therapy for 1, 2, or 3 more weeks. Percentage of IT (white bars), IC1 (gray bars), and IC2 (black bars) is shown per treatment and time point. All treatment groups showed statistical differences by Mann-Whitney test ($p < 0.01$) when compared to the control group at the point when treatment was started. Age-matched treated versus control statistical analysis is shown for each time point. Note that no animals in the control group survived to the 16 week time point. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Mann-Whitney test. Error bars indicate \pm SD.



growth factor (FGF) ligands (Casanovas et al., 2005). Additionally, it was noted that the relapsing tumors appear to be more invasive. Other studies have also associated increased invasiveness with impaired angiogenesis in the context of genetic ablation of the hypoxia response and/or the VEGF/VEGFR pathways (Blouw et al., 2007; Du et al., 2008; Pennacchietti et al., 2003).

RESULTS

Increased Invasiveness in Response to a Specific VEGFR2 Inhibitor

To further extend our previous study of resistance to abrogation of VEGF signaling with a function-blocking antibody against

VEGFR2 (DC101) in the RIP1-Tag2 model of pancreatic neuroendocrine cancer (PNET) (Casanovas et al., 2005), we sought to focus on the initial onset of malignant progression to invasive islet carcinoma. Tumor-bearing immunocompromised RIP1-Tag2 mice treated with DC101 for a relatively brief period of 1 week had reduced tumor vasculature and volume compared to control age-matched untreated animals, as described previously (Figure 1A and data not shown; Casanovas et al., 2005). Nevertheless, histological analysis showed a significantly more invasive phenotype after 1

week of treatment, an effect that was exacerbated when therapy was maintained for 4 continuous weeks. These more aggressive tumors had wide fronts of invasion, which prominently intermingled with the surrounding acinar tissue, whereas the majority of control tumors were predominantly encapsulated or microinvasive (Figure 1A, top panels). This aggravated invasive phenotype was readily revealed by fluorescent immunostaining for a marker of cancer cells, the SV40 T antigen oncoprotein (Figure 1A, middle panels). Congruently, immunostaining for the tumor collagenous capsule with anti-collagen type I antibody revealed the anti-VEGFR2-treated tumors to have a much thinner capsule, with areas of breakage or its complete absence (data not shown).

In order to quantify the degree of invasion, the frequency of invasive lesions was scored in short-term (1 week) and

long-term (4 weeks) VEGFR2-blocking antibody-treated RIP1-Tag2 animals using a three-grade nomenclature of noninvasive encapsulated islet tumors (IT), microinvasive carcinomas (IC1), and widely invasive carcinomas (IC2) as described previously (Lopez and Hanahan, 2002). While control untreated animals showed a 6% incidence of highly invasive tumors (IC2), treatment with anti-VEGFR2 antibody for 1 week increased the IC2 tumor incidence to 54%, and furthermore, treatment for 4 continuous weeks with this antibody led to an incidence of 62.5% (Figure 1B). Thus, the event of increased tumor invasiveness was already evident and significant following 1 week of antiangiogenic treatment, and the effect persisted and increased during longer-term continuous treatment for 4 weeks. Notably, in some tumors from long-term anti-VEGFR2-treated animals, tumor cells could be observed invading not only into the surrounding acinar tissue but also into the vasculature (see Figure S1 available online); such "vasoinvasion" has been used as an indicator of poor prognosis in some human tumor types (Offerhaus et al., 1991; Waggoner, 2003).

Persistence of the Invasive Phenotype after Cessation of Anti-VEGFR2 Treatment

We next sought to investigate the reversibility of this heightened invasive phenotype in the presence of angiogenesis inhibition by assessing its persistence when the angiogenic blockade was lifted. Thus, 1-week anti-VEGFR2-treated animals were then maintained for an additional 1, 2, or 3 weeks without treatment, and tumor invasiveness was determined at each time point. Again, the proportion of invasive tumors was increased after 1-week treatment, and strikingly, invasiveness remained augmented after termination of therapy, with a 10-fold higher incidence of widely invasive carcinomas persisting 1, 2, and 3 weeks after cessation of treatment (Figure 1C). It is noteworthy that the treated animals survived until 16 weeks of age due to the beneficial effect of the 1-week therapy (which produced stable disease for that period), whereas control untreated animals survived only until 15 weeks of age (Figure S2). Thus, in order to rule out the possibility that this increased invasion was due to an increased life span of the animals and not to the inferred drug-related effect, we also performed an age-matched comparison of the tumor invasion incidence in treated animals versus controls at each defined time point. Again, all anti-VEGFR2 treatment groups also exhibited statistically significant differences when compared to their respective age-matched control groups (Figure 1C).

Thus, the augmentation of tumor invasiveness is a rapidly occurring event that develops within 1 week of initiating anti-VEGFR2 therapy, producing a condition of increased malignancy that persists even when the treatment is terminated.

Increased Invasiveness in Tumors Carrying a Genetic Deletion of *Vegf-A*

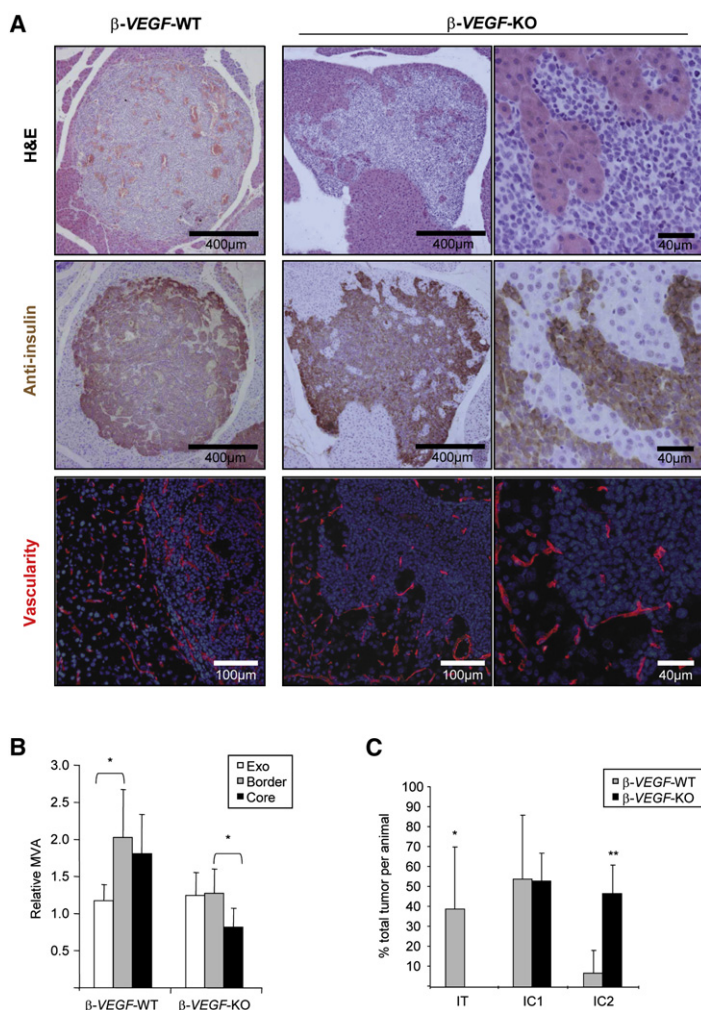
To substantiate the hypothesis that this augmented invasive and malignant phenotype is a result of impairing the VEGF/VEGFR2 proangiogenic signaling pathway, we asked whether a genetic disruption of this pathway would produce a similar adaptive response. To do so, we analyzed RIP1-Tag2 mice carrying a tumor cell-specific deletion of the *Vegf-A* gene, by means of the Cre-loxP system. We have previously shown that RIP1-Tag2/*Cre;Vegf-A^{fl/fl}* mice (β -VEGF-KO) exhibit a dramatic suppression

of angiogenesis and impairment of tumor development and growth (Inoue et al., 2002). Detailed histological observation of the borders of β -VEGF-KO lesions revealed the tumors to be much more irregular and invasive, encroaching into adjacent exocrine tissue, as compared to tumors in RIP1-Tag2/*Cre;Vegf-A^{+/+}* mice (β -VEGF-WT), a result that was further confirmed by positive immunostaining for insulin, a marker of these islet β cell tumors (Figure 2A). Consistent with previous observations (Inoue et al., 2002), β -VEGF-KO lesions had remarkably fewer blood vessels compared with their β -VEGF-WT counterparts, and their invasive fronts had a microvessel density similar to that of normal exocrine tissue, suggestive of a possible invasive co-option of the neighboring normal vasculature in the exocrine pancreas (Figures 2A and 2B). When tumor invasiveness was quantified in both genotypes, encapsulated tumors and both grades of invasive lesions were observed in the control β -VEGF-WT mice, whereas, remarkably, no noninvasive tumors were observed in the β -VEGF-KO mice (Figure 2C). Instead, all tumors were invasive to varying degrees, even in the smaller lesions. Taken together, these results recapitulate the effect of the anti-VEGFR2 blocking antibody and thus confirm the specificity of the heightened invasiveness caused by the specific disruption of the VEGF/VEGFR signaling axis.

Increased Metastasis in Response to VEGFR2 Blockade

To further determine the consequences of this augmented invasiveness, we next sought to determine whether anti-VEGFR2 antiangiogenic therapy was associated with a higher incidence of tumor dissemination and metastasis formation in immunocompetent RIP1-Tag2 mice. Recognizing the rapid time course to end-stage disease in this model, we started the treatment when solid tumors begin to appear (at 10 weeks of age) and continued it for 10 days. The treatment was then discontinued, and the animals were maintained until 16 weeks of age, when they were sacrificed along with age-matched untreated control animals. Gross morphology of surgically removed pancreata revealed that anti-VEGFR2-treated animals more frequently contained enlarged and hemorrhagic peripancreatic lymph nodes (LNs). The presence of tumor metastases in these lymph nodes was determined by hematoxylin and eosin (H&E) staining and corroborated by immunohistochemical staining for the tumor-specific SV40 T antigen oncoprotein (Figure 3A). Quantification of the incidence of macroscopic LN metastasis in both treatment groups revealed that the incidence of LN metastasis was 4-fold higher in treated animals than in controls, with a relative risk of 4.3 [1.5–12.4] (95% confidence interval) (Figure 3B).

We next investigated the possible occurrence of distant metastasis, focusing on the liver, which is a prevalent site for human pancreatic metastases. Microscopic liver metastases were detected by H&E staining and further confirmed by tumor-specific immunostaining for the T antigen oncoprotein, revealing microscopic tumor nodules in the liver parenchyma (Figure 3A). In this case, the incidence of animals with liver micrometastases was also 2-fold higher in the treated animals than in controls, with a relative risk of 2.0 [1.1–3.7] (95% confidence interval) (Figure 3B). Furthermore, the average number of metastatic lesions in the liver was also significantly increased (2.7-fold) in the treated animals compared to controls (Figure 3C). We infer that death due to primary tumor burden precluded the development of macrometastatic lesions.



A Multitargeted Antiangiogenic Kinase Inhibitor also Induces Increased Invasiveness

We further sought to determine whether these surprising adaptive responses occurred in the context of treatment with other angiogenesis inhibitors. We chose to investigate a more potent inhibitor of tumor angiogenesis, sunitinib (Sutent, Pfizer Inc.), which effectively inhibits both VEGFR and PDGFR signaling, a combination that we previously demonstrated to have potent efficacy and added benefit over singular inhibition of VEGFR, by targeting both endothelial cells and their supporting pericytes (Bergers et al., 2003; Pietras and Hanahan, 2005). Consistent with these results, continuous sunitinib treatment of tumor-bearing RIP1-Tag2 mice was markedly efficacious, producing a significant survival benefit (Figure 4A) and a 65% decrease in tumor burden after 5 weeks of treatment when compared to age-matched control animals (Figure 4B). Histological analysis of animals treated for 5 weeks starting at 10 weeks of age showed potent inhibition of angiogenesis and disruption of the preexisting tumor vasculature, with concomitant exacerbated invasive and more aggressive tumor phenotype (Figure 5A). Fluorescent immunostaining for T antigen further revealed widespread tumor infiltration, with apparent dissemination of tumor cell clusters far from the primary tumor masses (Figure 5A;

Figure 2. Increased Tumor Invasion after Tumor-Specific Vegf-A Gene Deletion

(A) Top row: H&E staining of lesions in RIP1-Tag2/Cre;Vegf-A^{+/+} (β -VEGF-WT; left) and RIP1-Tag2/Cre;Vegf-A^{fl/fl} (β -VEGF-KO; middle) mice. Middle row: insulin immunostaining reveals the tumor cells in serial sections to the H&E images shown in the top row. Bottom row: CD31 vessel staining (red) and DAPI nuclear staining (blue) of tumors in a β -VEGF-WT mouse and a β -VEGF-KO mouse. Images at right show a higher magnification of images in the middle column. (B) Microvessel area (MVA) at the invasive front was equivalent to that of exocrine tissue in β -VEGF-KO tumors. MVA of six tumors from four β -VEGF-WT and β -VEGF-KO animals was determined in the tumor "border" as the band-like region 50 μ m inside the tumor perimeter (gray bars), the surrounding exocrine tissue ("Exo"; white bars), and the tumor "core" (black bars). MVA values were standardized to those of exocrine tissue distant from the tumors in each section. * $p < 0.05$. (C) Quantification of invasiveness represented by the frequency of each tumor grade in 27 tumors from 5 β -VEGF-KO mice (gray bars) versus 75 tumors from 5 β -VEGF-WT mice (black bars) at 13 weeks of age. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Mann-Whitney test. Error bars indicate \pm SD.

Figure S3). Quantification of this increased invasiveness demonstrated that sunitinib treatment for 5 weeks more than doubled the incidence of highly invasive tumors (IC2) compared to control animals (Figure 5B). Notably, the tumors in sunitinib-treated mice, while graded as IC2, were often remarkable for the aggressive character of their invasiveness to a degree of malignancy rarely seen in untreated tumors (Figure S3).

Increased Metastasis in Sunitinib-Treated PNET Tumors

To further investigate the adaptive response to potent angiogenesis inhibition with sunitinib, peripancreatic LNs were assessed for the presence of metastatic lesions by H&E and by T antigen immunostaining of tissue sections from treated animals (Figure 5C). Quantitative analysis revealed a similar incidence of animals with LN metastasis in the sunitinib-treated versus control vehicle-treated groups (Figure 5D). In contrast to the lack of effect on lymphatic metastasis in sunitinib-treated mice, hematogenous dissemination was prevalent and arguably more aggressive. H&E staining confirmed by immunostaining for the T antigen oncoprotein consistently showed more abundant and larger liver micrometastases in the sunitinib-treated animals than in controls (Figure 5C, bottom row). The incidence of liver micrometastases was significantly increased by 3.5-fold in treated animals (χ^2 , $p < 0.05$), with a relative risk of 3.5 (95% confidence interval 0.8–14.3) (Figure 5D). When quantified, the number of liver micrometastases per animal was also increased by 3.7-fold in the sunitinib-treated animal group, which showed a clear but not statistically significant tendency when compared with control animals (Figure 5E). Thus, pancreatic islet tumors treated with a multitargeted kinase inhibitor also adapt by increasing their metastatic phenotype.

VEGF Inhibitors also Evoke Increased Invasiveness in Orthotopic Glioblastoma

These provocative observations in a mouse model of PNET raised the question of generality to other tumor types. As a first

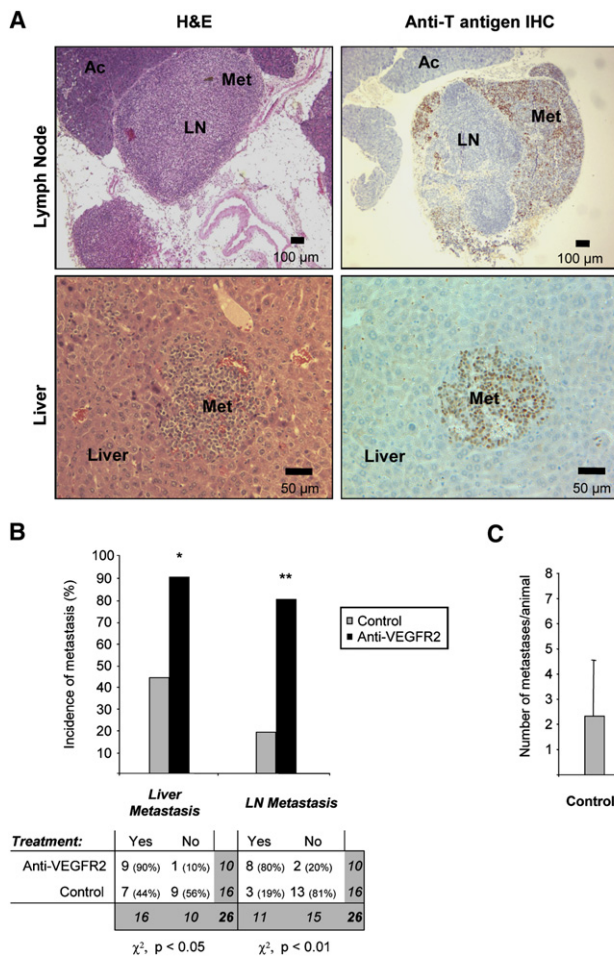


Figure 3. Increased Incidence of Lymph Node and Liver Metastasis in Anti-VEGFR2-Treated Animals

Histological analysis of lymph node (LN) and liver metastasis (Met) in RIP1-Tag2 animals treated with anti-VEGFR2 for 10 days starting at 10 weeks of age and then left untreated until 16 weeks of age.

(A) LN and Met observed by histological H&E staining of tissue sections from anti-VEGFR2-treated animals appear as enlarged hemorrhaging LNs infiltrated with tumor cells and a small tumor nodule in the liver parenchyma (left panels). Immunohistochemical staining for the tumor marker SV40 T antigen (brown) reveals the presence of tumor cells infiltrated into a LN or in the midst of the liver parenchyma (right panels).

(B) Top: quantification of the incidence of animals with microscopic liver micrometastasis and macroscopic LN metastasis in the control (gray bars) and anti-VEGFR2-treated (black bars) treatment arms. Bottom: contingency table relating the number and percentage of animals in each treatment/metastasis case. Treated animals show a statistically significant increase in the incidence of liver micrometastasis and LN metastasis by the chi-square test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

(C) Quantification of the number of microscopic liver metastasis in the anti-VEGFR2 treated (black bars) and control (gray bars) treatment arms. Treated animals show a statistically significant increase in the number of liver micrometastases per animal by the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$). Error bars indicate \pm SEM.

step, we asked whether this adaptive response of heightened malignancy in response to genetic or pharmacological angiogenesis inhibition occurred in a second tumor type, glioblastoma multiforme (GBM), by utilizing an orthotopic mouse model of genetically engineered transformed mouse astrocytes (Blouw et al., 2003; Du et al., 2008) characterized by development of aggressive and locally invasive glioblastomas that phenocopy the major characteristics of human glioblastomas (Berger and Wilson, 1999). Thus, the effects of a VEGFR-selective kinase inhibitor (SU10944, Pfizer Inc.) or the multitarget VEGFR kinase inhibitor sunitinib were assessed along with GBM cells genetically deficient in *Vegf-A* gene expression (VEGF-KO GBMs) (Blouw et al., 2003). In all three situations in which VEGF activity was either pharmacologically or genetically impaired, the tumor vasculature appeared thinner when compared to that of control tumors (Figure 6A). The VEGF-KO GBMs produced a survival advantage, consistent with our previous report (Blouw et al., 2003), whereas the kinase inhibitors produced minimal (SU10944) or modest (sunitinib) effects on tumor growth and animal survival (Figure 6B), consistent with a clinical study wherein a VEGFR kinase inhibitor transiently normalized the tumor vessels and reduced side effects such as edema but had little impact on GBM growth or patient survival (Batchelor et al., 2007). The most notable consequence of all three conditions of impaired VEGFR signaling in our mouse model was

alterations in the invasive phenotype of the GBM, in the form of a more highly invasive and qualitatively distinct tumor phenotype, with tumor cells dispersed throughout the brain in close proximity to resident normal blood vessels (perivascular tumor invasion), which contrasted with the less prominent single-cell infiltrative pattern that was typical in the control GBM tumors (Figure 6A). The relative prevalence of the perivascular invasive mode was assessed by counting the invading tumor cells in proximity to vessels and by grading the extent of perivascular invasion (which accounts for both single vascular-proximal tumor cells as well as focal clumps of tumor cells clustered around vessels). In all three cases, a significant increase in perivascular tumor cell invasion was observed, but the invasive effects were less pronounced in the case of both chemical VEGFR inhibitors (SU10944 and sunitinib) than in VEGF-KO GBM (Figure 6C). The differing degrees of invasion could be explained by the fact that VEGF-KO GBM cells were forced to grow from the time of their inoculation without a cancer cell-supplied source of VEGF, whereas WT GBM tumors were subjected to VEGF blockade only after having formed and grown to a substantive degree.

Thus, genetically or pharmacologically impaired VEGF signaling in an orthotopic model of GBM also evokes a more invasive and aggressive phenotype, distinct in form and yet analogous in essence to that observed in pancreatic neuroendocrine tumors subjected to similar genetic or pharmacological VEGF blockade.

Hypoxia Is Implicated in the Adaptive Response

To gain insight into one possible molecular mechanism for the increased invasion and subsequent dissemination, we sought to determine whether hypoxia developed in the treated tumors concomitant with invasion. While in control untreated animals, most of the tumors showed little or no hypoxia as revealed by

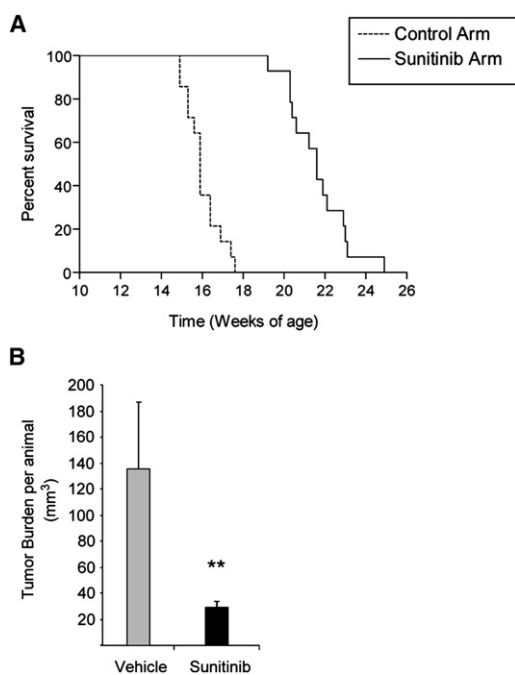


Figure 4. Increased Life Span and Tumor Reduction in Sunitinib-Treated RIP1-Tag2 Animals

(A) Kaplan-Meier survival curves in tumor-bearing RIP1-Tag2 mice (12 weeks) treated continuously with vehicle control or sunitinib starting at 12 weeks. While vehicle-treated mice showed a median life span of 15.2 weeks, mice receiving continuous sunitinib treatment demonstrated a survival benefit of 7 additional weeks. (Kaplan-Meier statistic: $p < 0.01$.)

(B) Total tumor burden analysis in 5-week treatment trials with sunitinib or vehicle control starting at 10 weeks of age. Gray bar shows tumor burden of vehicle-treated RIP1-Tag2 animals, and black bar shows the statistically significant tumor volume reduction of efficacious sunitinib therapy. Each treatment cohort involved a minimum of ten animals per group. ** $p < 0.01$ by Mann-Whitney test. Error bars indicate \pm SEM.

pimonidazole adduct staining, both β -VEGF-KO RIP1-Tag2 animals and animals treated with anti-VEGFR2 antibody or sunitinib displayed multiple tumors with distinct regions of intense hypoxia (Figure 7A). Moreover, when the incidence of hypoxic pimonidazole-positive tumors was quantified, both anti-VEGFR2 and sunitinib treatments showed a significant increase in hypoxic tumors (Figure 7B). Furthermore, intense hypoxia was evident in the disseminated liver micrometastases of the sunitinib-treated animals together with lack of vascularity inside the metastatic lesions, while in control animals, the micrometastases were vascularized and showed no hypoxia (Figures 7Ag–7Ai). Thus, the hyperinvasive and metastatic lesions that develop in the PNET model treated with a potent angiogenesis inhibitor exhibit marked hypoxia, suggestive of a role for the hypoxia response system in their manifestation.

DISCUSSION

Proinvasive consequences of antiangiogenic therapy had been described previously as a collateral to the antitumor response in glioblastoma multiforme and were attributed to vessel co-option by cancer cells, but with uncertain significance for thera-

peutic efficacy (Kunkel et al., 2001; Rubenstein et al., 2000). Recently, heightened invasion has been further implicated as a response to antiangiogenic therapy in another model of orthotopic GBM (Gomez-Manzano et al., 2008), consistent with these previous studies and our observations. More recently, we reported that abrogation of VEGF signaling with a function-blocking antibody against VEGFR2 elicits, after a period of transitory response, a bimodal resistance reaction with evident revascularization and increased invasiveness; while the revascularization was demonstrably important in the development of resistance (Casanovas et al., 2005), the significance of the heightened invasiveness was unclear. Here we demonstrate in two distinct engineered mouse models of cancer (PNET and GBM) that therapeutically efficacious antiangiogenic therapy can elicit an adaptive-evasive response involving an augmented invasive phenotype and, in some cases, increased dissemination and the emergence of distant metastasis (Figure 8).

Interestingly, PNET development in the context of genetic ablation of the *Vegf-A* gene produced small pancreatic lesions with increased invasiveness but without evident metastasis (data not shown), in contrast to the case of VEGF pathway inhibition. We suspect that the metastasis response is somehow enabled by the initial presence of an angiogenic vasculature in established solid tumors containing hyperproliferative cancer cells that, when disrupted, fosters metastatic dissemination. In contrast, the small avascular lesions populated by VEGF-KO cancer cells may have failed to acquire other necessary capabilities for productive dissemination. Regardless, the preclinical trials in the PNET model unambiguously demonstrate the enhancement of invasion and metastasis consequent to pharmacological angiogenesis inhibition.

In the PNET model, the multitargeted inhibitor sunitinib consistently demonstrated significantly better efficacy than the VEGFR2-specific antibody, in regard to both tumor shrinkage and augmented survival benefit. But in turn, sunitinib evidently elicited a more highly invasive adaptation, with some of the most aggressively invasive tumors observed heretofore in this model. Thus, the more effective the VEGF/angiogenesis inhibition, the more pronounced the adaptive progression to heightened and altered invasiveness. Interestingly, while both angiogenesis inhibitors enhanced liver metastasis, sunitinib did not increase lymphatic metastasis, in contrast to the anti-VEGFR2 antibody. This difference could be due to the differential specificity of inhibition by the two drugs: sunitinib potently blocks not only VEGFR2 and the PDGFRs but also lymphatic vessel-related VEGFR3 (Faivre et al., 2007; Roskoski, 2007). An attractive hypothesis is that the specific blockade of VEGFR3 signaling by sunitinib serves to alter the structure or permeability of lymphatic vessels or lymph nodes, thereby impeding formation of LN metastasis.

An intriguing paradox involving these results is raised by previous reports in other model systems, in which VEGF-driven angiogenesis was found to positively correlate with increased tumor invasiveness (Skobe et al., 1997) or metastasis (Warren et al., 1995). In contrast, our results as well as those presented in the accompanying study by Ebos et al. (2009) in this issue of *Cancer Cell* support the opposite conclusion, raising the possibility that both induction and suppression of tumor angiogenesis can exert proinvasive/prometastatic effects. We envision that

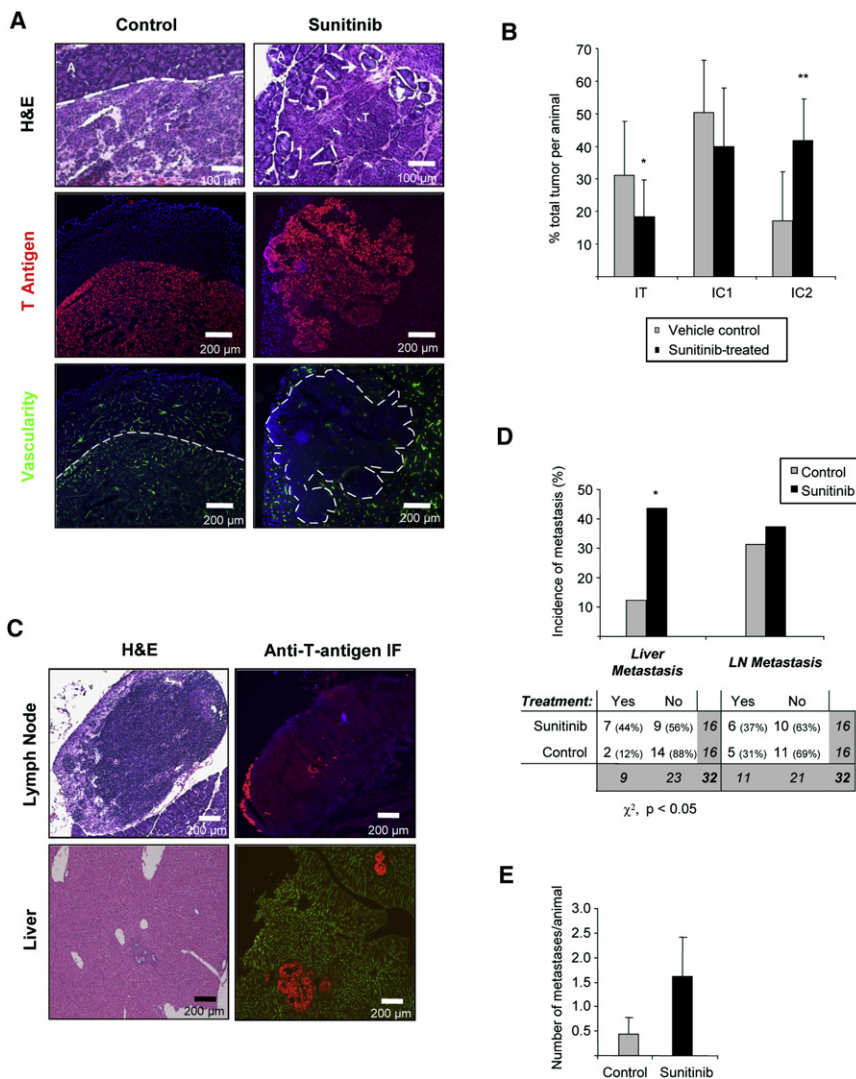


Figure 5. Increased Tumor Invasion Evoked by Treatment with a Multitargeted Angiogenic Kinase Inhibitor

Histological analysis and quantification of tumor invasion in RIP1-Tag2 mice treated for 5 weeks with sunitinib compared to control vehicle-treated mice are shown.

(A) Top row: H&E staining of control- and sunitinib-treated tumors showing the invasive front extensively intercalating into the surrounding tissue (dashed white line), producing isolated islands of normal exocrine tissue inside treated tumors (white arrow). Middle row: immunofluorescence staining for SV40 T antigen showing the widely invasive phenotype in treated tumors, with several fronts invading into the surrounding tissue. Bottom row: visualization of blood vessels by intravenous perfusion of FITC-conjugated tomato lectin (green), revealing the effect of the antiangiogenic treatment on the tumor vasculature.

(B) Quantification of the percentage of IT, IC1, and IC2 tumors in vehicle- versus sunitinib-treated animals. Sunitinib treatment shows statistically significant decrease in IT and increase in the highly invasive grade of tumor (IC2) by Mann-Whitney test (* $p < 0.01$; ** $p < 0.01$). Error bars indicate \pm SD.

(C) Left panels: histological analysis by H&E staining of tissue sections of lymph node and liver metastasis from sunitinib-treated animals. Right panels: confirmation of metastasis is shown by immunofluorescence staining for the tumor marker T antigen (red). The images give evidence of tumor cells infiltrated into the lymph node or the liver parenchyma.

(D) Top: quantification of the proportion of animals with liver and lymph node (LN) micrometastasis in the vehicle-treated (gray bars) and sunitinib-treated (black bars) arms. Bottom: contingency table listing the number and percentage of animals in each treatment/metastasis case. Treated animals show a 3.5-fold increase in the incidence of liver micrometastasis by the chi-square test (* $p < 0.05$).

(E) Quantification of the number of liver micrometastases in the vehicle-treated (gray bars) and sunitinib-treated (black bars) arms. The number of liver micrometastases was 3.7-fold increased in the sunitinib-treated group, which showed a clear but not statistically significant trend compared to control animals. Error bars indicate \pm SEM.

the two effects, while related, may have distinct physiological bases. For example, tumors that express very high levels of VEGF (as in Skobe et al. and Warren et al.) may produce a tumor vasculature with excessive sprouting, poor pericyte coverage, and collectively impaired vascular integrity. Notably, Xian et al. (2006) demonstrated that vessels with poor pericyte coverage are prone to increased metastasis and that overexpression of VEGF can drive intense angiogenesis with low pericyte coverage and a hyperpermeable vasculature, which can be more permissive for tumor cell intravasation and dissemination. On the other hand, antiangiogenic therapy demonstrably disturbs the tumor vasculature and in some cases (e.g., with sunitinib) also disrupts pericyte coverage, and may in addition be indirectly affecting the tumor cells by inducing a more invasive phenotype in response to hypoxia, leading to increased intravasation and metastatic dissemination.

How might tumors become more invasive during antiangiogenic therapy? One possibility is that tumors may elevate the

activity of a preexisting invasion program that was not previously the driving force of expansive tumor growth, given the capability for angiogenesis. Alternatively, some tumors may switch on an invasive growth program distinct from that arising spontaneously during unperturbed tumor development and progression, as is evidently the case for GBMs, in which antiangiogenic therapy induced a phenotypic change from single-cell infiltration to migration of cell clusters along normal blood vessels. These observations suggest that the invasive growth program induced in response to therapy may be qualitatively different than the pathway used in normal tumor progression.

In this regard, genetic studies have implicated the hypoxia/HIF-1 α pathway as an instigator of invasion and metastasis (Du et al., 2008; Pennacchietti et al., 2003). Interestingly in the GBM model, hypoxia via consequent HIF-1 activation induced angiogenesis and more infiltrative tumor cell behavior, while inhibition of HIF-1 and consequent failure to respond to

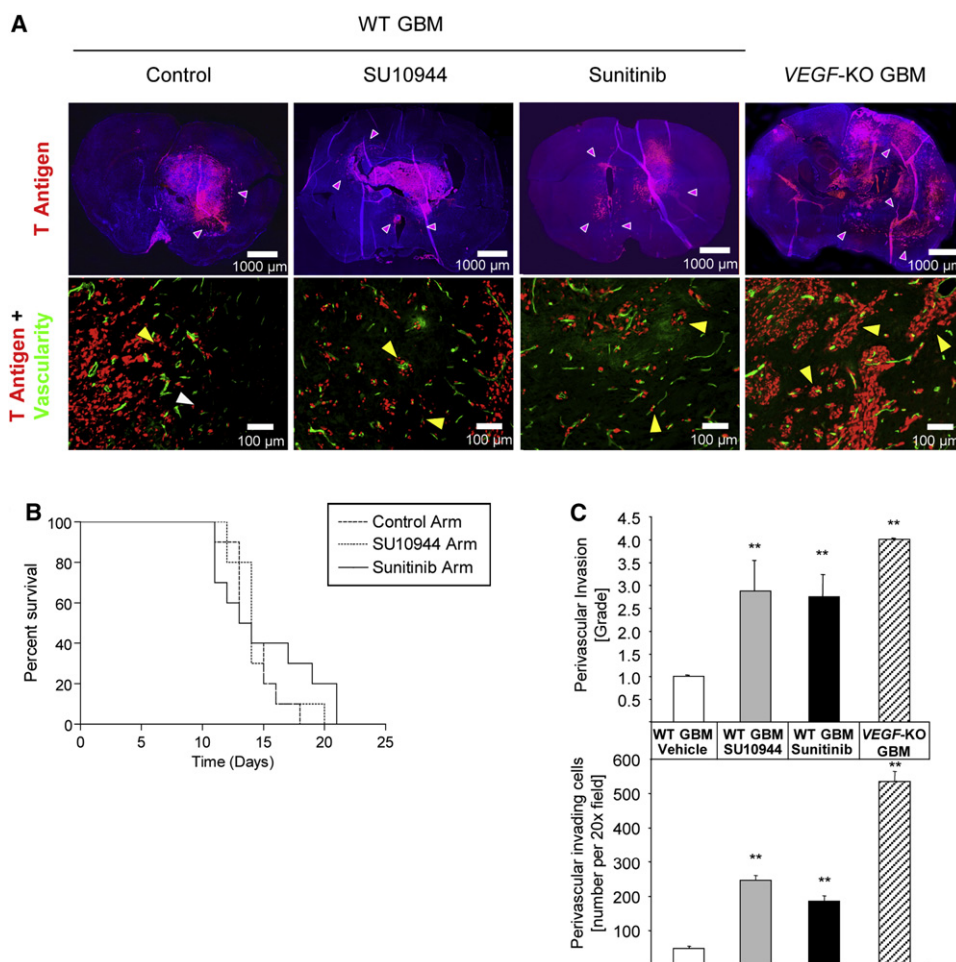


Figure 6. Effects of VEGFR-Selective Kinase Inhibitors on an Orthotopic Mouse Model of Glioblastoma Multiforme

(A) Top row: immunohistological analysis of glioblastoma multiforme (GBM) with fluorescent SV40 T antigen staining (red) on whole brain sections counterstained with DAPI (blue). Control wild-type (WT) GBMs appear less invasive than WT GBMs treated with SU10944 or sunitinib, or VEGF-KO GBMs (purple arrowheads). Bottom row: high-magnification images of fluorescent detection of tumor cells (anti-T antigen antibody; red) and the perfused vasculature (FITC-lectin, green). WT GBM cells infiltrate as single cells into the brain parenchyma without associating with blood vessels (white arrowheads) or invade alongside blood vessels in the brain (perivascular invasion; yellow arrowheads). GBMs treated with either SU10944 or sunitinib as well as VEGF-KO GBMs are more invasive and predominantly migrate along blood vessels (yellow arrowheads).

(B) Kaplan-Meier survival curves of WT GBM-bearing mice untreated or treated with a relatively selective VEGFR inhibitor (SU10944) or a multitargeted VEGFR inhibitor (sunitinib) starting 3 days after inoculation. The effects on survival observed with SU10944 and sunitinib treatment were minimal or modest, respectively, and were not statistically significant.

(C) Top: grading of perivascular invasion was performed on a scale from 1 to 4, where 1 indicates minimal distant spread of tumor cells and 4 indicates substantial and marked distant spread; this parameter indicated a significant increase in perivascular invasion in response to both pharmacological treatments and in the VEGF-KO GBMs (** $p < 0.01$). Bottom: quantification of perivascular invasive mode by immunohistochemical analysis on tumor sections. Perivascular invasive cells, counted as the number of cells in the tumor periphery tightly associated with vessels, were significantly increased by both antiangiogenic small-molecule treatments and the genetic ablation of VEGF-KO GBM cells (** $p < 0.01$). Error bars indicate \pm SD.

hypoxia led to a blockade of angiogenesis and an exacerbated proinvasive phenotype. Due to the degree of invasion and the close proximity of invading tumor cells to blood vessels, these tumors are less hypoxic (Blouw et al., 2003; Du et al., 2008), despite the implication that hypoxia in the primary tumor drove their switch to a hyperinvasive condition. In concordance with the GBM results, we document herein the concomitant triggering of hypoxia with increased invasion in response to antiangiogenic therapy in the PNET model. While the concurrent initiation of hypoxia and invasion could be a circumstantial coincidence, a body of published evidence linking hypoxia

and invasion (Cairns et al., 2001; Pennacchietti et al., 2003; Young and Hill, 1990) suggests that the hypoxia response system could be involved in regulating invasion in this tumor type as well. Additionally, other therapy-induced mechanisms could contribute to the phenotypic progression of malignancy, such as activation or upregulation of extracellular proteases (e.g., matrix metalloproteinases and cathepsins), latent signaling circuits (e.g., c-Met), or triggering of epithelial-to-mesenchymal transition programs, each of which can demonstrably lead to more invasive and/or metastatic phenotypes and has been linked to the hypoxia response in particular model

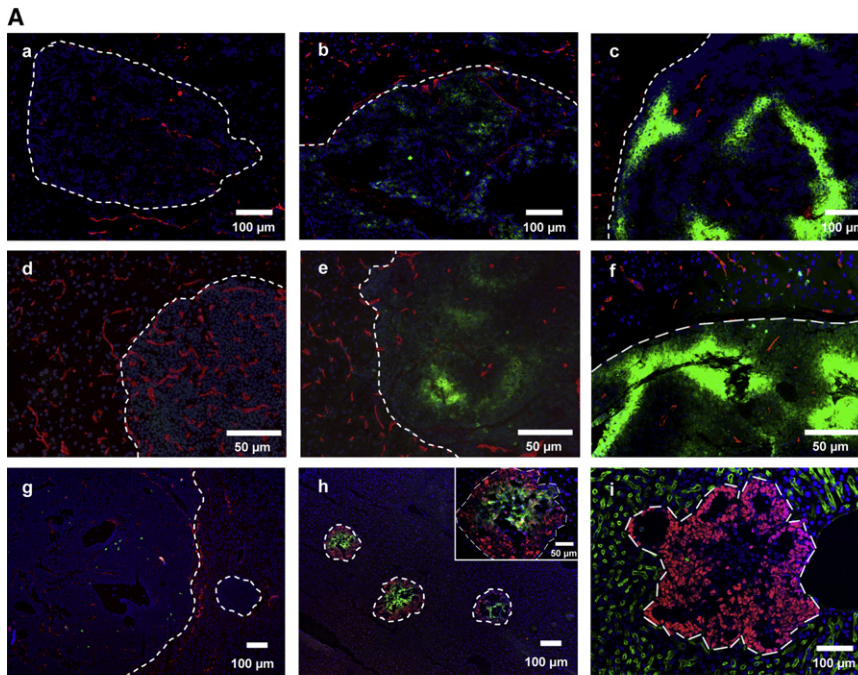
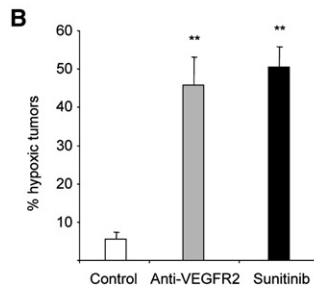


Figure 7. Antiangiogenic Treatment also Provokes Hypoxia in Tumors and Liver Micrometastases

(A) Hypoxia in islet tumors was detected by immunofluorescence staining of pimonidazole adducts in sections of pancreas (Aa–Af) or liver (Ag–Ai) from control untreated animals (Aa and Ag), animals receiving short-term (Ab) or long-term (Ac) anti-VEGFR2 treatment, β -VEGF-WT (Ad) and β -VEGF-KO (Ae) islet tumors, and sunitinib-treated animals (Af, Ah, and Ai). (Aa)–(Ag) show pimonidazole immunodetection (green) with blood vessel CD31 staining (red); (Ah) shows pimonidazole immunodetection (green) and T antigen oncoprotein (red); (Ai) shows blood vessel MECA32 staining (green) and T antigen oncoprotein (red). All images show nuclei counterstained with DAPI (blue).

(B) Quantitation of the incidence of hypoxic tumors was performed in long-term anti-VEGFR2-treated and sunitinib-treated animals and plotted as the percentage of pimonidazole-positive tumors per animal compared to control animals. ** $p < 0.01$ by Mann-Whitney test. Error bars indicate \pm SEM.



Translational Considerations

It must be emphasized that the three VEGF pathway inhibitors currently approved for certain cancer types (variously including colorectal, renal, breast, and hepatocellular), and likely others (both new drugs and new indications) to follow, are markedly altering the standard of care for these cancers. Despite their transitory efficacy, angiogenesis inhibitors present important therapeutic options that

constitute improvements in terms of both clinical benefit and reduced toxicity compared to conventional agents used to treat these diseases. Recognizing both their benefits and their limitations, a pertinent question at hand is that of the broader applicability of our findings to antiangiogenic therapies aimed at other

constitute improvements in terms of both clinical benefit and reduced toxicity compared to conventional agents used to treat these diseases. Recognizing both their benefits and their limitations, a pertinent question at hand is that of the broader applicability of our findings to antiangiogenic therapies aimed at other

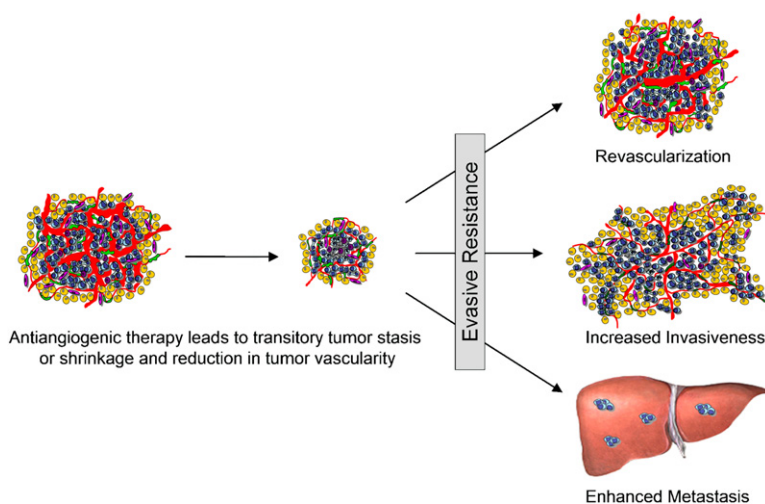


Figure 8. Adaptive-Evasive Responses by Tumors to Antiangiogenic Therapies

Schematic summary of adaptive responses to VEGF/VEGFR inhibitors (and likely other angiogenesis inhibitors) that elicit “evasive resistance.” Tumors respond to VEGF/VEGFR pathway inhibition with tumor stasis or regression and a loss of blood vessels, but mechanisms of evasive resistance to the antiangiogenic treatment are then induced that can variously enable revascularization via alternative proangiogenic signals, increased local invasiveness, and/or enhanced distant metastasis.

Cancer Cell

Malignant Progression in Angiogenesis Inhibition

organ-specific cancers, and in particular their extrapolation to the outcomes of antiangiogenic therapies in cancer patients. Notably, in the accompanying paper by *Ebos et al. (2009)*, one of these approved angiogenesis inhibitors, sunitinib, is shown to facilitate metastatic dissemination of both human breast cancer cells and syngeneic melanoma in mice following either orthotopic or intravenous inoculation; a second approved drug, sorafenib, evidently has similar effects. Even brief week-long antiangiogenic treatment elicited increased metastasis, much as we observed following a similar week-long treatment with the anti-VEGFR2 antibody in the PNET model. Collectively, the two studies document increased invasion and/or metastasis in four distinct mouse models of organ-specific cancer and begin to establish a mechanistic pattern of increased invasion and metastasis as an adaptive response to antiangiogenic therapy, one that seems likely to be operative in certain human tumors.

In regard to the relevance of our findings in mouse models of neuroendocrine tumors and glioblastoma to antiangiogenic therapies for the cognate human cancers, there are currently insufficient data about the responses of human pancreatic neuroendocrine tumors due to both their rarity and the limited number of patients that have been treated in clinical trials with angiogenesis inhibitors. In the case of glioblastoma, there is growing experience with antiangiogenic therapies, specifically the VEGF ligand-trapping antibody bevacizumab (*Fischer et al., 2008; Narayana et al., 2009; Norden et al., 2008*) and the VEGFR1/2/3 kinase inhibitor AZD2171 (*Batchelor et al., 2007*). In both cases, there seems to be a proinvasive adaptation to antiangiogenic therapy, as suggested by magnetic resonance imaging in a subset of GBM patients that developed multifocal recurrence of tumors during the course of therapy with anti-VEGF (bevacizumab) (*Fischer et al., 2008; Narayana et al., 2009; Norden et al., 2008*) or AZD2171 (*Batchelor et al., 2007*). Much as in the mouse GBM model, we infer that the human glioblastoma cells could be co-opting blood vessels by invading along them into the surrounding normal brain tissue, thereby achieving vascular/nutrient/oxygen sufficiency while consequently promoting an invasive dispersion phenotype (perivascular tumor invasion). Thus, there is reason to predict clinical relevance of our collective observations.

How then could the improvement of survival in many clinical trials in spite of increased invasiveness and metastasis be explained? The increased progression-free survival (PFS) could likely reflect the impairment of primary tumor growth, which, while initially efficacious, is short lived, with the onset of multiple forms of evasive resistance that would inevitably produce a return to progressive disease. This tumor relapse would compromise this initial benefit such that the prolongation of PFS and even overall survival (OS) would not be particularly robust, as is the case in many clinical trials. For example, recent results from two randomized clinical trials with bevacizumab and taxanes for the treatment of metastatic breast cancer (the E2100 study and the AVADO study) demonstrated small benefits in PFS but not an OS benefit, and our results provide a possible explanation for this disconnect.

Indeed, this undesirable therapy-triggered change in the natural history of the treated tumors is convergent with emerging examples involving other targeted therapy-driven changes, such as the case of trastuzumab (Herceptin) therapy in HER2-positive

breast cancer patients. Although effective in its antitumor and pro-survival effects (13 months increased life span), trastuzumab therapy changes the course of disease progression in these patients to one with a markedly increased incidence of brain metastasis (*Bendell et al., 2003; Clayton et al., 2004; Miller et al., 2003; Weil et al., 2005*), which is otherwise rare in untreated patients. The companion study by *Ebos et al. (2009)* documents increased metastasis in multiple organs, including the brain, in response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in a mouse model of breast cancer, illustrating that convergence.

Another clinically relevant question raised by our results is whether concomitant chemotherapy in some tumor types (e.g., in all currently approved indications for bevacizumab) could alter or even abrogate this increased malignant phenotype. Both preclinical and clinical trials investigating the effects of standard-of-care and more recent (e.g., metronomic) chemotherapy regimens on proinvasive and prometastatic responses to antiangiogenic therapies are warranted.

Certainly, the characteristics and consequences of the exacerbated invasive-metastatic phenotype that develops in response to treatment with angiogenesis inhibitors motivate critical assessment in the clinical setting. Moreover, further preclinical studies are warranted to elucidate the mechanisms of this adaptive-evasive resistance, so as to design and test the potential of mechanism-based combination therapies aimed at impeding this insidious consequence of singular antiangiogenic therapy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal Models

RIP1-Tag2 (*Hanahan, 1985*), immunocompromised RIP1-Tag2;*Rag1*-KO (*Casanovas et al., 2005*), and RIP1-Tag2/*Cre*;*Vegf-A*^{fl/fl} mice (*Inoue et al., 2002*) have been described previously. The orthotopic mouse GBM models utilizing intracranial injection of transformed mouse astrocytes of wild-type or *Vegf-A-loxP* mice have also been described previously (*Blouw et al., 2003; Du et al., 2008*). Animal housing, handling, and all procedures involving mice were approved by the University of California, San Francisco (UCSF), Catalan Institute of Oncology, and Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases institutional committees that approve and oversee research involving vertebrate animals, and all experiments were performed according to each country's guidelines governing animal care in the USA, Spain, and Japan, respectively.

Therapeutic Trials

RIP1-Tag2 mice were treated starting at 10 or 12 weeks of age as indicated, and immunocompromised RIP1-Tag2;*Rag1*-KO mice were used for long-term DC101 treatment to avoid immune reaction against the therapeutic antibody. The following antiangiogenic regimens were used: (1) 1 mg/mouse twice per week of anti-VEGFR2 blocking antibody (DC101) purified from a hybridoma culture (American Type Culture Collection) and its control purified rat IgG (Jackson ImmunoResearch) as described previously (*Casanovas et al., 2005*) administered intraperitoneally (i.p.). (2) 40 mg/kg/day sunitinib L-malate (Sutent, Pfizer Inc.) and its control carboxymethylcellulose vehicle formulation, administered daily by oral gavage for 5 weeks. Tumor volume in the RIP1-Tag2 animals was measured as described previously (*Inoue et al., 2002*). For therapeutic trials in the GBM model, FVB/*N Rag1*-KO mice were injected intracranially with 25,000 cells and treated with 150 mg/kg/day SU10944 or 40 mg/kg/day sunitinib L-malate administered by oral gavage starting 3 days after inoculation until moribund (average 13.5 days in both groups).

Histopathological Analyses

Pancreata and livers were either OCT embedded and frozen or fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. Antibodies used for specific tissue immunostaining included rat monoclonal anti-mouse CD31 (clone MEC13.3,

1:50, BD Pharmingen), rabbit polyclonal serum anti-large T antigen (1:10,000, prepared in the Hanahan laboratory), polyclonal guinea pig anti-insulin (A0564, DAKO), and rat anti-MECA32 (550563, BD Pharmingen). For immunohistochemistry, the EnVision system of labeled polymer-HRP anti-rabbit IgG (Dako-Cytomation) was used as a secondary antibody. For immunofluorescence detection, Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG secondary antibodies were used at a dilution of 1:200. For nuclear counterstaining, tissue sections were either mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories) or stained with TO-PRO-3 iodide used at a 1:1000 dilution and then mounted with Vectashield without DAPI.

Systemic perfusion of fluoresceinated lectin to visualize the functional blood vasculature was performed as described previously (Inoue et al., 2002). Briefly, 0.1 mg of fluorescein-labeled tomato lectin (Vector Laboratories) was injected intravenously in a total volume of 0.1 ml and allowed to circulate for 5–10 min, followed by heart perfusion with neutral buffered formalin and tissue sample preparation for OCT-embedded frozen sectioning.

For microvessel area (MVA) quantification, the ratio of CD31-stained area to total area was calculated in ten randomly chosen circular spots (50 μ m diameter) using Lumina Vision image analysis software (Mitani Corporation). The MVA of the region was expressed as the average ratio of these ten spots.

Hypoxia detection was performed 1 hr after i.p. injection of 60 mg/kg pimonidazole using a Hypoxyprobe Plus kit (Natural Pharmacia International Inc.) following the manufacturer's instructions.

Invasion and Metastasis Analysis

Invasion grading in the RIP1-Tag2 model was performed as described previously (Lopez and Hanahan, 2002) from five H&E-stained sections per animal from a minimum of five mice per treatment group. The incidence of LN/liver metastasis was determined by scoring for presence or absence in each animal and counting the number of liver micrometastases in five sections per animal from a minimum of ten animals per treatment group. In the GBM model, perivascular invasion was quantified by counting the number of invasive cells/clusters associated with a vessel at the tumor edge (20 \times field) in double-stained frozen sections with large T antigen and CD31 from 3–10 sections per 2–4 different tumor samples per group. Perivascular invasion grading of tumors was determined by staining tumor cells with an antibody for SV40 large T antigen on whole-brain sections, and 5–8 tumors from each group were graded from 1 to 4, where 1 indicates minimal distant spread of tumor cells and 4 indicates substantial and marked distant spread.

Statistical Analysis

All results were evaluated using the SPSS statistical software package. Due to the small sample size in each analysis and the fact that not all of the data were normally distributed, nonparametric statistical tests were used in each case (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, or chi-square test).

SUPPLEMENTAL DATA

The Supplemental Data include three figures and can be found with this article online at [http://www.cancerjournal.org/supplemental/S1535-6108\(09\)00034-8](http://www.cancerjournal.org/supplemental/S1535-6108(09)00034-8).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge J.G. Christensen of Pfizer for advice and encouragement; Pfizer for generous gifts of SU10944 and sunitinib; and X. Hernando (Casanovas laboratory), C. Guinto and E. Drori (Hanahan laboratory), and K. Lu and B. Kaplan (Bergers laboratory) for excellent technical support. This work was funded by research grants SAF2006-00590, SAF2007-60955, RTIC-RD2006-0092, and SGR727 from MICINN and AGAUR (Spain); grants from the US National Cancer Institute to G.B. and D.H.; a grant from the William K. Bowes, Jr. Foundation to D.H.; and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science to M.I. D.H. is a American Cancer Society Research Professor, O.C. is a Ramon y Cajal fellow of the Spanish Ministry of Education, G.B. holds the Neill H. and Linda S. Brownstein Chair in Brain Tumor Research at UCSF, and M.P.-R. is a recipient of an IDIBELL fellowship.

D.H. serves on a strategic advisory panel for oncology at Pfizer Inc.

Received: July 20, 2008

Revised: October 27, 2008

Accepted: January 27, 2009

Published: March 2, 2009

REFERENCES

- Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M., et al. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11, 83–95.
- Bendell, J.C., Domchek, S.M., Burstein, H.J., Harris, L., Younger, J., Kuter, I., Bunnell, C., Rue, M., Gelman, R., and Winer, E. (2003). Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer* 97, 2972–2977.
- Berger, M.S., and Wilson, C.B. (1999). *The Gliomas* (Philadelphia: W.B. Saunders Company).
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603.
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 111, 1287–1295.
- Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H.P., Johnson, R.S., and Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4, 133–146.
- Blouw, B., Haase, V.H., Song, H., Bergers, G., and Johnson, R.S. (2007). Loss of vascular endothelial growth factor expression reduces vascularization, but not growth, of tumors lacking the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Oncogene* 26, 4531–4540.
- Cairns, R.A., Kalliomaki, T., and Hill, R.P. (2001). Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res.* 61, 8903–8908.
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309.
- Clayton, A.J., Danson, S., Jolly, S., Ryder, W.D., Burt, P.A., Stewart, A.L., Wilkinson, P.M., Welch, R.S., Magee, B., Wilson, G., et al. (2004). Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* 91, 639–643.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., and Bergers, G. (2008). HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13, 206–220.
- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, this issue, 232–239.
- Favre, S., Demetri, G., Sargent, W., and Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 734–745.
- Fischer, I., Cunliffe, C., Bollo, R., Raza, S., Monoky, D., Chiriboga, L., Parker, E., Gólfinos, J., Kelly, P., Knopp, E., et al. (2008). High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro-oncol.* 10, 700–708.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273–286.
- Folkman, J., and Ingber, D. (1992). Inhibition of angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 3, 89–96.
- Gomez-Manzano, C., Holash, J., Fueyo, J., Xu, J., Conrad, C.A., Aldape, K.D., de Groot, J.F., Bekele, B.N., and Yung, W.K. (2008). VEGF Trap induces anti-glioma effect at different stages of disease. *Neuro Oncol.* 10, 940–945.

- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115–122.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., et al. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 117, 3810–3820.
- Inoue, M., Hager, J.H., Ferrara, N., Gerber, H.P., and Hanahan, D. (2002). VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell* 1, 193–202.
- Kerbel, R.S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505–515.
- Kerbel, R.S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, B.L., and Rak, J. (2001). Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 79–86.
- Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M., and Lamszus, K. (2001). Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 61, 6624–6628.
- Lopez, T., and Hanahan, D. (2002). Elevated levels of IGF-1 receptor convey invasive and metastatic capability in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* 1, 339–353.
- Miller, K.D., Weathers, T., Haney, L.G., Timmerman, R., Dickler, M., Shen, J., and Sledge, G.W., Jr. (2003). Occult central nervous system involvement in patients with metastatic breast cancer: prevalence, predictive factors and impact on overall survival. *Ann. Oncol.* 14, 1072–1077.
- Miller, K.D., Sweeney, C.J., and Sledge, G.W., Jr. (2005). Can tumor angiogenesis be inhibited without resistance? *EXS* 94, 95–112.
- Munoz-Najar, U.M., Neurath, K.M., Vumbaca, F., and Claffey, K.P. (2006). Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* 25, 2379–2392.
- Narayana, A., Kelly, P., Golfinos, J., Parker, E., Johnson, G., Knopp, E., Zagzag, D., Fischer, I., Raza, S., Medabalmi, P., et al. (2009). Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *J. Neurosurg.* 110, 173–180.
- Norden, A.D., Young, G.S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G.L., Ciampa, A.S., Ebbeling, L.G., Levy, B., Drappatz, J., et al. (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 70, 779–787.
- Offerhaus, G.J., Giardiello, F.M., Bruijn, J.A., Stijnen, T., Molyvas, E.N., and Fleuren, G.J. (1991). The value of immunohistochemistry for collagen IV expression in colorectal carcinomas. *Cancer* 67, 99–105.
- Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., and Hanahan, D. (1996). Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2002–2007.
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347–361.
- Pietras, K., and Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 939–952.
- Roskoski, R., Jr. (2007). Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 323–328.
- Rubenstein, J.L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D.F., and Shuman, M.A. (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* 2, 306–314.
- Shaked, Y., Bertolini, F., Man, S., Rogers, M.S., Cervi, D., Foutz, T., Rawn, K., Voskas, D., Dumont, D.J., Ben-David, Y., et al. (2005). Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7, 101–111.
- Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S., and Fusenig, N.E. (1997). Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat. Med.* 3, 1222–1227.
- Waggoner, S.E. (2003). Cervical cancer. *Lancet* 361, 2217–2225.
- Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A., and Ferrara, N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J. Clin. Invest.* 95, 1789–1797.
- Weil, R.J., Palmieri, D.C., Bronder, J.L., Stark, A.M., and Steeg, P.S. (2005). Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am. J. Pathol.* 167, 913–920.
- Xian, X., Hakansson, J., Stahlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., and Semb, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J. Clin. Invest.* 116, 642–651.
- Young, S.D., and Hill, R.P. (1990). Effects of reoxygenation on cells from hypoxic regions of solid tumors: anticancer drug sensitivity and metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 371–380.