



Angiogénesis Tumoral: estrategias diagnósticas y terapéuticas

Ximena Camacho Damata^a, Pablo Cabral^b.

a) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR).

b) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR). Laboratorio Farmacéutico,

D.N.S.F.F.A.A.

Resumen

La angiogénesis es fundamental para el desarrollo tumoral, y el período durante el cual se produce la transición de la fase tumoral avascular a la fase vascular, se encuentra regulado por la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Esta sustancia es una glicoproteína que es producida ya sea por las células normales como las neoplásicas, y juega un rol muy importante tanto en situaciones fisiológicas como las patológicas. La unión del VEGF a sus receptores conduce al reclutamiento de señales moleculares intracelulares responsables de la supervivencia, permeabilidad vascular, migración y proliferación celular. Muchos estudios han descripto la relación que existe entre la expresión del VEGF y el pronóstico de los pacientes en patologías oncológicas. Tanto el VEGF como sus receptores han sido blancos para el desarrollo de numerosos agentes terapéuticos y de diagnóstico. En el presente trabajo se hace una descripción de algunos de estos agentes, así como sus estrategias y/o mecanismos para visualizar o inhibir la angiogénesis tumoral.

Palabra clave: INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS
VEGF

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis, definida como el proceso de formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura preexistente (1), es fundamental en el crecimiento tumoral y la progresión y formación de metástasis. Más allá de garantizar un soporte adecuado de oxígeno y nutrientes a las células neoplásicas, la formación de una compleja red de microcapilares que irriga al tumor favorece a la formación de una ruta para el drenaje eficiente de metabolitos y para la diseminación de células tumorales vía corriente sanguínea o linfática para los órganos a distancia (2).

Por décadas la terapia antitumoral estuvo restringida apenas a procedimientos quirúrgicos, radioterapéuticos o una quimioterapia citotóxica, que presentan elevada toxicidad y eficacia variable, siendo apenas moderada para fracciones significativas de pacientes. El reconocimiento del tumor como un órgano complejo ha proporcionado el desarrollo de abordajes más específicos para el tratamiento del cáncer. Estos abordajes tienen

como objetivos minimizar la toxicidad y mejorar la sobrevida de los pacientes con cáncer. Las células neoplásicas están insertadas en un microambiente que incluye otras células, una matriz extracelular y los elementos del estroma, tales como vasos sanguíneos. Son justamente estos vasos sanguíneos que están asociados con la progresión de esta que es una de las enfermedades más prevalentes y de elevada mortalidad de la población humana.

El término de angiogénesis fue difundido a partir de 1787 por el cirujano británico John Hunter (3), que describió la apariencia de los vasos sanguíneos del tejido conectivo formados en una herida. La investigación de la angiogénesis tumoral cobró impulso un siglo después, cuando Virchow llama la atención, en 1863, reconociendo que el estroma de los tumores posee una distintiva red capilar.(4) En 1907, la vascularización tumoral fue por primera vez estudiada de modo sistemático por Goldman, el cual describió la respuesta vasoproliferativa responsable del órgano en el cual el tumor se desarrolla de la siguiente manera: “los vasos sanguíneos normales

de los órganos en los que el tumor se está desarrollando se ven perturbados por el crecimiento caótico; hay una dilatación y una espiralización de los vasos afectados, un notable brotamiento capilar y formación de nuevos vasos, particularmente hacia el frente de crecimiento del tumor” (5). Cuando Clark et al. (6,7) perfeccionaron la implantación de cámaras transparentes en la oreja de un conejo, las características morfológicas de los vasos sanguíneos lograron estudiarse in vivo. En 1939 Ide et al. (8) fueron los primeros en sugerir que los tumores liberan factores específicos los cuales estimulan el crecimiento de los vasos sanguíneos, mientras que en 1945 Algire y Chalkley (9) concluyeron que el crecimiento tumoral está relacionado con el desarrollo de una red vascular intrínseca. Más de 25 años pasaron hasta que Folkman sugirió, en 1971, que la inhibición de la angiogénesis podría ser una estrategia interesante para inhibir el crecimiento tumoral y la formación de nuevas metástasis (10). Folkman observó que los tumores se desarrollaban hasta alcanzar un tamaño de 1-2 mm³, a partir del cual se estabilizaban y detenían su crecimiento (10,11).

A partir de ahí, numerosos esfuerzos fueron puestos con el objetivo de entender los mecanismos moleculares de la angiogénesis, así como desarrollar estrategias antiangiogénicas para el tratamiento del cáncer.

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra a distintas células, componentes solubles y factores de la matriz extracelular y tiene gran importancia en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos del organismo. Así, para el desarrollo embrionario, la curación de las heridas y el ciclo menstrual, procesos que podemos considerar fisiológicos, los tejidos normales precisan la formación de nuevos vasos que aporten los nutrientes y el oxígeno necesarios y, a su vez, retiren los productos de desecho. La regulación de la angiogénesis se lleva a cabo mediante un perfecto equilibrio entre la producción y la liberación de diversos factores estimulantes e inhibidores, que varían en función de las necesidades y el tipo de tejido (12).

En general, la angiogénesis es un proceso controlado por el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, que pueden coexistir en un mismo tejido. Estos factores pueden ser circulantes o actuar localmente como factores parácrinos. Estas moléculas

constituyen una serie de eventos complejos que son regulados por factores micro y macroambientales en un aparente estado de flujo dinámico del tumor. Su producción es dependiente del sitio del tumor primario, más allá de poder ser alterados a lo largo de la progresión tumoral y durante el curso de la terapia antitumoral.

Hay dos tipos de factores estimuladores de la angiogénesis: a) factores específicos, liberados por numerosos tipos celulares, que se unen de forma específica a los receptores de las células endoteliales, y b) factores inespecíficos, que se unen a las células endoteliales pero también a otras células que infiltran el tumor, las cuales incluyen las células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, plaquetas, células inflamatorias y células tumorales. Entre los factores específicos se destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las angiopoyetinas. Los factores pro-angiogénicos inespecíficos son numerosos y afectan al crecimiento de la célula endotelial y de muchas otras. Algunos de los más importantes son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF: ácido y básico), factor de crecimiento transformante (TGF α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiogenina, etc. Estas y otras moléculas angiogénicas, juntamente con sus mecanismos de acción, se encuentran sistematizados en la Tabla 1.

El VEGF es la molécula mejor caracterizada y más importante del proceso angiogénico. Fue identificado en los años 80s como un factor de permeabilidad vascular (VPF) (13), y como un factor de crecimiento específico de las células endoteliales vasculares (14).

Se han encontrado siete isoformas del VEGF-A en seres humanos, las cuales contienen 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos, generados como resultado del procesamiento alternativo del ARNm (2-15,16), que difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas.

El VEGF-A165 es la isoforma predominante del VEGF, es la isoforma que es capaz de traducir las señales de forma más potente entre los distintos tipos de VEGFs; además de ser un potente factor de permeabilización vascular (1).

Asimismo, se conocen tres receptores del VEGF:

VEGF-R1 (Flt-1) (17), VEGF-R2 (KDR/Flk-1) (15) y VEGFR3 (KDR/Flt-1) (1). Los dos principales receptores, Flt-1 y KDR, son expresados en las células endoteliales cuando se encuentran en fase de proliferación. La unión del VEGF con sus receptores, de tipo tirosina kinasa (RTKs)(18), activa diversas vías de señal que intervienen en diferentes pasos en la angiogénesis. Así, el VEGF contribuye a la vasodilatación inicial mediada por óxido nítrico y aumenta la permeabilidad de las células endoteliales, 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 perivascular (19).

Las angiopoyetinas representan otra familia importante de factores proangiogénicos. Las más decisivas son la Ang-1 y Ang-2, que se unen al receptor de tipo tirosina kinasa Tie2 presente en las células endoteliales y favorecen la estabilización y maduración de los vasos neoformados. En presencia del VEGF, la Ang-2 antagoniza los efectos estabilizadores o antiapoptóticos de la Ang-1 sobre las células endoteliales y promueve la proliferación y migración de las células endoteliales. Sin embargo, en ausencia del VEGF, la Ang-2 puede conducir a la apoptosis y a la regresión vascular (20).

Sin embargo, el proceso angiogénico no está producido por una sola molécula o familia de moléculas, sino que depende de la cooperación e integración de varios factores que contribuyen a la proliferación, migración, invasión y diferenciación de la célula endotelial.

Opuestos a la actividad de los proangiogénicos, un gran número de agentes antiangiogénicos endógenos también, han sido funcionalmente caracterizados (Tabla 2). Al menos 27 proteínas diferentes y otras pequeñas moléculas actúan como inhibidores endógenos de la angiogénesis, muchas de las cuáles son fragmentos derivados de la matriz extracelular, tales como la endostatina, un producto del clivaje proteolítico del colágeno XVIII, y la canstatina y tumstatina, dos fragmentos proteolíticos de colágeno IV. (21) Estos fragmentos son liberados por proteólisis de la matriz y de la membrana vascular basal por enzimas, como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), catepsinas y elastasas. La actividad de este grupo heterogéneo de antiangiogénicos es regulada a nivel de la expresión

génica, la secreción y la activación proteolítica.

Otras clases de angiainhibidores incluyen a factores solubles, como interferones (IFN), interleucinas (ILs) y la angiostatina, así como productos de fragmentos de metabolitos hormonales, de factores de coagulación o de proteínas del sistema inmune (Tabla 2).

Moléculas involucradas en la angiogénesis tumoral	
Factores proangiogénicos	Mecanismo de acción
Familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Estimula la proliferación, motilidad e interacción de células endoteliales (CE), interfiriendo en la permeabilidad vascular. Reclutamiento de células del sistema inmune promotoras del crecimiento tumoral y de la angiogénesis.
VEGF-C, -D	Estimulan la linfangiogénesis tumoral.
PIGF	Induce la angiogénesis tumoral
Angiopoyetina (Ang)/Tie2	Tie2 es sobreexpresada en diversos carcinomas. Induce la migración de CE, actúa en el remodelamiento y maduración de la red vascular tumoral.
Factor de crecimiento 1 y 2 (FGF-1 y -2)	Actúan en el remodelamiento de la matriz extracelular y en la proliferación y migración de las CE. Es sobreexpresada en diversos tipos tumorales.
PDGF/PDGFR	Mitógeno y quimioatrayente de los pericitos, fibroblastos u otras células mesenquimales, regula la angiogénesis indirectamente a través de la inducción del VEGF.
TGF-alfa/beta	Estimula la producción de la matriz extracelular y expresión de integrinas y de VEGF; modula la proliferación y migración de CE; participa en la formación de los tubos capilares; interfiere en la estabilización de los vasos sanguíneos y en la interacción CE-pericito.
TNF-alfa	Estimula la angiogénesis y diferenciación celular.
COX-2	Estimula la angiogénesis y la vasodilatación vía Tromboxano A2; regula la apoptosis.
Delta-like ligant 4 (DDL4)/vía de Notch	Sobreexpresado en vasos sanguíneos tumorales. Su inhibición compromete a la vascularización y crecimiento tumoral.

Moléculas involucradas en la angiogénesis tumoral	
Factores proangiogénicos	Mecanismo de acción
Efrinas (Eph)	Sobreexpresadas en linajes de tumor mamario metastásico; ejercen un papel importante en la formación de vasos sanguíneos.
Endotelina (ET-1)	Sobreexpresa la expresión de VEGF por estabilización de HIF-1; interfiere con la secreción de proteasas por las células tumorales.
Óxido nítrico sintasa (NOS)	Estimula la angiogénesis y vasodilatación.
Citocinas/quimiocinas	Papel pleiotrópico en la angiogénesis
Integrinas	Afectan la motilidad, mecano-transducción y proliferación celular, interfiriendo con un amplio espectro de procesos angiogénicos.
VE-caderinas	Estabilizan las uniones de CE en las paredes de los vasos; aumentan la sobrevida de CE por la transmisión de una señal anti-apoptótica de VEGFs.
Activadores de plasminógeno	Remodelación de la matriz extracelular; liberación de la activación de factores de crecimiento.
MMPs	Degradan proteínas de la matriz extracelular y activan factores proangiogénicos; interfieren en la migración de CE y en el remodelamiento de la red vascular.

Tabla 1. Ejemplos de moléculas proangiogénicas involucradas en la neovascularización tumoral y sus mecanismos de acción

Inhibidores endógenos de la angiogénesis		
Inhibidor	Blanco angiogénico	Función
Fragmento de MMP-2 que contiene el dominio hemopexina C-terminal	MMP-2	Supresor de la angiogénesis
IL-12	VEGF, MMP-9	Imunomodulatorio, antitumoral y antimetastásica.
Arrestina	Integrina $\alpha 1\beta 1$	Inhibición de la migración, proliferación de células endoteliales e induce apoptosis de células endoteliales/tumorales
Tumstatina	Integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 1$	Inhibe la síntesis proteica. Atenúa la proliferación de células endoteliales
Canstatina	Integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 1$	Inhibe migración e induce la apoptosis dependiente de CD95 en células endoteliales.
Endorepelina	Integrina $\alpha 2\beta 1$	Inhibe la migración celular vía desorganización del citoesqueleto de actina y de adhesiones focales.

Tabla 2. Ejemplos de inhibidores endógenos de la angiogénesis

Inhibidores endógenos de la angiogénesis		
Inhibidor	Blanco angiogénico	Función
Endostatina	VEGFR, integrina $\alpha 5\beta 1$	Actúa en diversas vías asociadas a la sobrevivencia y migración de células endoteliales. Induce la apoptosis de células endoteliales
Angiostatina	Angiomotina, Integrina $\alpha v\beta 3$, ATP sintasa	Supresor de la angiogénesis tumoral, actuando en varias vías de señalización celular.
TSP-1	MMP-9, CD36, Integrina $\alpha v\beta 3$	Inhibición de diversas vías intracelulares. Inhibe la migración, crecimiento, adhesión y sobrevivencia de células endoteliales. Inhibe proteasas asociadas a la matriz extracelular.

ANGIOGÉNESIS EN CÁNCER Y METÁSTASIS

Hace ya más de un siglo que se observó que la proliferación de los vasos sanguíneos era necesaria para el crecimiento tumoral, pero fue en la década de los setenta, a partir de los trabajos de Folkman, cuando se introdujo el concepto de angiogénesis. Folkman observó que los tumores se desarrollaban hasta alcanzar un tamaño de 1-2 mm (3), a partir del cual se estabilizaban y detenían su crecimiento. (22) La proliferación activa de células tumorales, que habitualmente acompañaba el crecimiento inicial de los tumores, se equilibraba con el proceso de muerte celular producido por el alejamiento del aporte sanguíneo de las células tumorales. Mediante la observación directa del tumor se ha demostrado que el rápido crecimiento exponencial no ocurre hasta

que hay una neovascularización y que el proceso de angiogénesis es paralelo al proceso de formación de metástasis. (23)

Se han propuesto dos vías por las que los nuevos vasos se pueden formar: a) sprouting o formación de brotes, y b) non-sprouting o por inserción de tejido intersticial en la luz del vaso preexistente. (24) Además de estos dos mecanismos, la angiogénesis tumoral puede estar también sustentada por la movilización e incorporación funcional de los precursores de las células hematopoyéticas, que se trasladarían desde la médula ósea para integrarse en los nuevos vasos formados. (25)

Actualmente se reconocen varias fases para la formación de los vasos. Durante la fase inicial de la angiogénesis se produce una vasodilatación de los vasos preexistentes (capilares y vénulas) mediada por el VEGF, que aumentan su permeabilidad y activan sus células endoteliales (se incrementan las organelas del citoplasma y se reducen las uniones intercelulares). Posteriormente, mediante la acción de diversas enzimas proteolíticas denominadas metaloproteasas, se produce la degradación de la membrana basal y su rotura. En una segunda fase se promueve la proliferación y migración de las células endoteliales para formar los nuevos brotes que penetran entre las redes de las células tumorales en crecimiento. Las células endoteliales migradas se alinean en cordones y brotes sueltos formando una luz en el brote de avance. Cuando todos los brotes se conectan se restablece el flujo. (22)

Folkman propuso que la inhibición de la angiogénesis podría ser una estrategia terapéutica efectiva en el tratamiento del cáncer e inició una búsqueda dirigida hacia la purificación de los factores angiogénicos tumorales. (23)

ACTIVACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

En la actualidad está ampliamente aceptada la idea del “encendido o interruptor angiogénico” del tumor que, mientras está en la posición “off”, el tumor se encuentra en una fase quiescente o dormido, con un tamaño microscópico de 0,2-3 mm (3) de diámetro. La fase rápida de crecimiento ocurre cuando éste activa su fenotipo angiogénico. (23)

Una cuestión pendiente es cómo, cuándo y por qué una célula tumoral durmiente o silente activa el fenotipo angiogénico. En 1996, Hanahan y Folkman propusieron que este “encendido” era el resultado de un desequilibrio entre los factores estimuladores de la angiogénesis y los inhibidores, con un predominio de los primeros de forma sostenida. (26) El encendido angiogénico puede estar influido por situaciones ambientales, fundamentalmente la hipoxia, y otros factores del microambiente tumoral, tales como la acidosis y la inflamación. También es importante la base genética del huésped, puesto que pueden ocurrir mutaciones genéticas con activación de protooncogenes (bcl2, K-ras, H-ras, c-myc, etc.) e inhibición de genes supresores de tumor (p53), que amplifican la expresión de factores proangiogénicos. (27)

Los tumores de gran tamaño durante su crecimiento pueden experimentar fenómenos de hipoxia y necrosis por compresión de los vasos. La presencia de un pH y una concentración de glucosa bajos en el seno tumoral puede estimular la producción de los factores angiogénicos, especialmente el VEGF. (23)

Si bien la mayoría de los trabajos apuntan en este sentido, algunos datos preclínicos muestran que la hipoxia y la angiogénesis en el tumor no siempre progresan paralelamente. Aunque la falta de oxigenación es un fuerte estímulo para la angiogénesis del tumor, la patogenia de la hipoxia del tumor es mucho más complicada y puede que no sea necesaria para que se produzca la neovascularización. (28)

Teniendo en cuenta que el oxígeno debe ser distribuido por la sangre a todas las células del cuerpo de un organismo, es necesario que las células estén localizadas entre 100 a 200 μm de un vaso sanguíneo para poder sobrevivir, (24-29) por lo que si un grupo de células tumorales necesita evadir la inanición, requiere promover el proceso normal de la angiogénesis para formar su propia fuente sanguínea mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y así, superar la falta de distribución de oxígeno y nutrientes, de modo de propiciar el crecimiento tumoral más allá del límite de difusión de oxígeno (entre 100 a 200 μm) de la distancia de los vasos sanguíneos. (30,31) Mediante este sistema vascular se logra remover los residuos metabólicos y suministrar el oxígeno y los nutrientes que

son necesarios para los tejidos y órganos distantes del organismo. (32,33)

Ambos tipos de angiogénesis se diferencian (fisiológica y patológica) por los tipos de vasos sanguíneos que las inducen.

- Angiogénesis fisiológica, caracterizada por vasos sanguíneos que poseen una estructura básica, la cual consta de un lumen central que se encuentra recubierto de células endoteliales rodeadas por una membrana basal. Para satisfacer las demandas locales, la red se remodela por medio de recortes, ampliaciones y ramificaciones de la vasculatura. Según el tipo de vaso, esta estructura básica puede estar rodeada por células de soporte, células de músculo liso y una matriz extracelular. Esto provoca la formación de un sistema muy vascularizado que suministra los nutrientes a los tejidos sanos. Esta angiogénesis normal comienza en el desarrollo fetal y continúa luego del nacimiento, es esencial para el crecimiento y desarrollo normales del embrión y de los niños, pero la función fisiológica de la angiogénesis en los adultos está limitada a la curación de heridas y al ciclo reproductor femenino. (2-33,34)
- Angiogénesis tumoral o patológica, al igual que en los tejidos sanos depende de una extensa red de vasos sanguíneos para crecer y sobrevivir. Además, la capacidad de un tumor para producir metástasis depende del desarrollo de su propio aporte sanguíneo. Por esto la angiogénesis patológica es esencial para la progresión maligna de los tumores sólidos.

Los tumores pequeños, con un diámetro inferior a 0.5 mm, son estructuras latentes (durmiente) y reciben nutrientes por simple difusión. Pero, para desarrollarse, el tumor depende de la vasculatura del huésped y de la generación de su propio aporte sanguíneo. (2)

Los vasos tumorales difieren de los de los tejidos sanos y su estructura y función es anormal. Son de forma irregular, dilatados y de un diámetro desigual, sinuoso, con fugas y propenso a hemorragias, están imperfectamente recubiertos de células endoteliales que poseen múltiples aberturas y son

más permeables de lo normal. No siempre están conectados a otros vasos, no se organizan en vénulas, arteriolas y capilares definitivos, sino que tienen características de todos los tipos de vasos y presentan una expresión anómala de antígenos de superficie celular en las células endoteliales. (35) Como resultado de esta estructura el flujo sanguíneo en los vasos tumorales es generalmente irregular. La estructura caótica provoca que el flujo sanguíneo circule lentamente y los capilares pueden dejar de funcionar.

La activación de la angiogénesis conduce a la neovascularización del tumor, dando como resultado su rápido crecimiento. (34) En contraste, los tumores latentes no tienen la capacidad de expandirse más allá de un tamaño microscópico menor a 0.5 mm. (36) Se ha propuesto el bloqueo de la angiogénesis como el mecanismo para explicar este comportamiento, ya que se ha observado que pueden permanecer latentes por meses, hasta que ocurre la activación de la angiogénesis. Esto resulta cuando los reguladores pro-angiogénicos sobrepasan el balance contra los reguladores anti-angiogénicos secretados por las células del microambiente tumoral a favor de los promotores de la angiogénesis (36), evento conocido como el cambio angiogénico (en inglés, angiogenic switch). Diversas señales pueden activar el cambio angiogénico en los tumores, los cuales incluyen el estrés metabólico (por ejemplo, el pH bajo y la baja presión de oxígeno), el estrés mecánico (debido a la proliferación de las células tumorales), respuesta inflamatoria y eventos genéticos y epidemiológicos.

De hecho, la angiogénesis no participa en la carcinogénesis pero sí promueve la progresión tumoral (32) y es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación de los vasos sanguíneos, así como de oxígeno y nutrientes por la neo-angiogénesis. (31) Además, el tumor puede secretar factores que promueven reacciones linfáticas de manera similar a la producción de factores angiogénicos, influyendo en la ruta de diseminación metastásica dado que los vasos linfáticos pueden ser invadidos por las células tumorales; de hecho, para los patólogos, tanto la invasión vascular como la linfática son factores pronósticos en las

enfermedades malignas. (15)

Considerando todo lo anterior, queda claro que el bloqueo de la angiogénesis es actualmente considerado como una estrategia clave para atacar el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

Una secuencia de eventos iniciados por la expresión de los factores proangiogénicos y la subsecuente ligadura a sus receptores de unión conduce a la neovascularización del tejido neoplásico. Entre las múltiples etapas de este proceso, lleva: (a) activación de la señalización angiogénica a través de la interacción del factor angiogénico-receptor en las células endoteliales presentes en el microambiente tumoral; (b) secreción de proteasas (enzimas proteolíticas) y subsecuente degradación de la membrana basal de los vasos parentales y de la matriz extracelular del tejido en el cual el tumor se está desarrollando; (c) migración, reclutamiento y proliferación de las células endoteliales circulantes en el medio ambiente angiogénico, con la subsecuente formación de brotamientos vasculares; (d) interconexiones de los brotes capilares para la formación de redes vasculares del tejido; (e) estabilización de los capilares a través del reclutamiento de células de soporte (pericitos y células musculares lisas, por ejemplo) y de la formación de una membrana basal. (32,33)

Aparentemente simple, el proceso de la angiogénesis está lejos de ser trivial como se planteó anteriormente y sus complejos mecanismos moleculares han sido estudiados extensamente. No hay duda en cuanto el papel central de la angiogénesis que es conferido a la célula endotelial, sino también es importante comprender a todas aquellas complejas interrelaciones que existen entre receptor-factor de crecimiento, célula-célula y célula-matriz que caracterizan este proceso, con una intensa participación no sólo de las células tumorales sino también del estroma circundante, la cual incluye a fibroblastos, células musculares lisas y células del sistema inmune por ejemplo.

TERAPÉUTICA ANTIANGIOGÉNICA

En los últimos 50 años, la estrategia predominante del tratamiento del cáncer se ha centrado en la célula tumoral. De este modo, cualquier fármaco o sustancia capaz de matar a las células tumorales in vitro era, por definición, un candidato para el tratamiento

quimioterapéutico in vivo.

El tratamiento antiangiogénico realiza una acción antitumoral de forma indirecta mediante la inhibición de la vascularización del tumor e impidiendo de esta forma que se le aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Con este nuevo concepto, la terapéutica antitumoral no se centra únicamente en la célula cancerígena, sino también en su entorno y, sobre todo, en el proceso de formación de nuevos vasos.

El desarrollo de tratamientos antiangiogénicos contra cáncer ha avanzado de manera rápida. El primer inhibidor selectivo de la angiogénesis utilizado en ensayos clínicos fue el TNP-470. (37) Actualmente se han descubierto más de 300 inhibidores de la angiogénesis, muchos de ellos en ensayos clínicos en diferentes fases y otros ya aprobados para su utilización clínica. (38)

Las ventajas teóricas de los fármacos antiangiogénicos son las siguientes:

1. Estos agentes pueden acceder fácilmente a las células endoteliales del tumor, a diferencia de los fármacos citostáticos, que tienen que penetrar en grandes masas tumorales.
2. Los fármacos antiangiogénicos no producen citopenias ni toxicidad medular y gastrointestinal, por lo que podemos evitar muchas de las toxicidades asociadas con la quimioterapia estándar.
3. Estos fármacos pueden ser muy específicos, por ejemplo, cuando actúan contra moléculas expresadas en la superficie de la célula endotelial activada, pero no en la célula endotelial quiescente u otras células. Sería el ejemplo de los receptores del VEGF, las angiopoyetinas y algunas moléculas de adhesión (integrinas).
4. En teoría no están sujetos a fenómenos de resistencia al tratamiento al actuar sobre las células endoteliales, que son estables genéticamente y son menos probables de acumular mutaciones que permitan la adquisición de resistencia a drogas antitumorales. Sin embargo, las nuevas células endoteliales son estructural y funcionalmente anormales y hace poco se ha descrito que pueden adquirir alteraciones citogenéticas en el microambiente tumoral. (39) El gen supresor de tumor

p53 se encuentra inactivado en la mayoría de los cánceres humanos y las células tumorales deficientes en p53 experimentan una reducción en la tasa de apoptosis bajo condiciones hipóxicas, circunstancia que podría disminuir su dependencia del soporte vascular y la respuesta al tratamiento antiangiogénico. De este modo, se ha mostrado que las alteraciones genéticas que disminuían la dependencia vascular de las células tumorales (p.ej., células deficientes en p53) podían influir en la respuesta de los tumores al tratamiento antiangiogénico. (40)

5. Su espectro de acción puede ser amplio, al no depender del tipo de célula tumoral ni de su fase del ciclo celular. Se ha diseñado una amplia gama de estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear uno o más pasos del proceso angiogénico. El término fármaco antiangiogénico se utiliza para describir un grupo diverso de agentes que afectan al crecimiento de nuevos vasos.

Las estrategias anti-angiogénicas pueden dividirse en:

A) Anticuerpos anti-VEGF

Dado que el VEGF es uno de los factores clave en la promoción de la angiogénesis, se han llevado a cabo distintas estrategias para inhibirlo, mediante el uso de anticuerpos. En el 2004 se aprobaron los siguientes compuestos inhibidores del VEGF: el **Pegaptinib**, un aptámero que bloquea dicho factor, utilizado para el tratamiento de cáncer colorrectal metastático en combinación con regímenes de quimioterapia basada en 5-fluorouracilo; el **Ranibizumab**, que es un fragmento molecular de un anticuerpo monoclonal (Fab) que neutraliza a todas las isoformas del VEGF, para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el **Bevacizumab** (Avastin®), que es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra el VEGF-A165 (rhu Mab VEGF). (41)

La terapia antiangiogénica se convirtió en una realidad a partir de la aprobación de **Bevacizumab** en febrero de 2004 por la FDA, para el tratamiento de primera línea de cáncer metastático colorrectal (CRC). (42) El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal (Mab) humanizado recombinante que es capaz de unirse y neutralizar la actividad biológica del VEGF-A. (43,44) Desarrollado a partir del Mab anti-VEGF murino A4.6.1, el bevacizumab fue humanizado a través de técnicas

avanzadas de ingeniería genética, de modo que el anticuerpo resultante conserve la especificidad de la molécula original. La vida media plasmática de esta proteína es de 17-21 días. (43)

Numerosos ensayos clínicos demostraron que su uso intravenoso potencializa el efecto antineoplásico de los esquemas terapéuticos convencionales. En estudio en fase III delineado por Hurwitz y col., la adición de bevacizumab en combinación citotóxica irinotecan /5-fluorouracilo administrado en bolo/leucovorina en portadores de cáncer colorrectal (CRC) metastásico tratado previamente, resultaron en un aumento de la tasa de respuesta a la quimioterapia. (2)

Resultados promisorios también han sido obtenidos en el carcinoma renal (RCC) metastásico, en el cual la combinación de bevacizumab con interferón alfa aumenta en 5 veces la supervivencia media libre de progresión. Además de CRC y RCC metastásico, bevacizumab está reglamentado por la FDA para su uso en casos de cáncer de mama, pulmón y en glioblastoma.

B) Anticuerpos contra VEGFRs

La señalización del VEGFR-1 ha sido ligada a la inducción de MMP9 (metaloproteinasas de matriz-9) y a la facilitación de la metástasis por lo que es considerado como un blanco de inhibición en la terapéutica anti-tumoral. (2) De hecho, se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-2 como el DC101 pueden inhibir la angiogénesis y el crecimiento de distintos xenotransplantes tumorales humanos. (45) También el VEGFR-3 es un marcador útil y potencial blanco terapéutico anti-angiogénico/ linfoangiogénico, para la identificación de neoplasias endoteliales malignas dado que se encuentra expresado ampliamente en la mayoría de los tumores vasculares humanos benignos y malignos. (15)

C) Moléculas pequeñas inhibitoras de VEGFR-TKs

La angiogénesis es promovida a través de citocinas que se unen a receptores de las células endoteliales y desencadenan una cascada de señales. La mayoría de estos receptores son del tipo tirosina kinasa y tras su unión con el factor de crecimiento determinado, son

fosforilados y transducen señales proangiogénicas, tales como la vía de las MAPK (mitogen activated protein kinase), FAK (focal adhesión kinase) y AKt. Se han desarrollado pequeñas moléculas capaces de inhibir la transducción de señal de la célula endotelial, con la finalidad de detener el crecimiento tumoral, al bloquear la cascada de señalización de los VEGFRs. Algunas de estas moléculas inhibitoras son: **SU6668** que bloquea tanto al VEGFR-2 como al PDGFR- β (14), **SU11248 o malato de sunitinib**, que interfiere con el VEGFR-2, PDGFR, c-kit y Flt-3 (46), **Bay 43-9006 o sorafenib**, que bloquea al VEGFR- 2 y -3 (5), además de **PTK787/ ZK 222584 o vatalanib**. (47)

D) Esteroides angiostáticos

Algunos esteroides incluyendo a la progestina, acetato de medroxi-progesterona y glucocorticoides como la dexametasona y cortisona fueron las primeras moléculas reconocidas en contar con actividad anti-angiogénica (47); algunos metabolitos de los corticoesteroides como el tetrahidrocortisol han mostrado también actividad anti-angiogénica y han guiado el camino para el descubrimiento de otros inhibidores endógenos. (36)

Otro esteroide, la escualamina, interrumpe significativamente la proliferación y progresión tumoral en estudios in vitro, mientras que en estudios pre-clínicos, ha mostrado beneficios aditivos en el retraso del crecimiento tumoral al combinarse con cis-platino, paclitaxel, ciclofosfamida, genisteína o radioterapia. Sin embargo, el único esteroide antiangiogénico que ha sido evaluado en estudios clínicos es la Medroxiprogesterona. (47)

E) Inhibidores endógenos

Consisten en fragmentos de proteínas grandes, que pueden actuar como inhibidores endógenos de la angiogénesis a manera de precursores latentes activados por la proteólisis, únicamente cuando son requeridos (31), por ejemplo la **angiostatina**, que resulta de la degradación de plasminógeno y fue el primer agente antiangiogénico descubierto, inhibe la migración de la célula endoteliales e induce su apoptosis.

La **endostatina** que es un fragmento críptico de la colágena XVIII, inhibe la proliferación y migración de las células endotelial a través de la inhibición de la

MMP-9 y la movilización del VEGF. Y otros inhibidores endógenos de la matriz extracelular como la tumstatina, vasostatina y vasoinhibina. (36)

F) Inhibidores de metaloproteinasas de la matriz

La matriz extracelular es un complejo entorno compuesto de proteínas como el fibrinógeno, el colágeno y la gelatina, que aporta el andamiaje de soporte de los tejidos. La matriz continuamente experimenta procesos de remodelado en situaciones fisiológicas y patológicas. Su degradación es producido por un grupo de proteínas denominadas metaloproteasas de la matriz (MMP).

Las MMP constituyen una familia de al menos 26 enzimas que se dividen en matrilisinas, estromalisinas y gelatinasas, de las cuales la MMP-2 (o gelatinasa-A) y la MMP-9 (o gelatinasa B) son las más importantes. Hay una serie de inhibidores naturales tisulares de las MMP que se denominan **TIMP** e inhiben la angiogénesis, así como el crecimiento tumoral y la metástasis. Se ha observado en estudios pre-clínicos que el BB94 y batimastat, inhibidores sintéticos de proteasas, resultan en anti-angiogénesis, inhibición del crecimiento tumoral y actividad anti-metastásica (31), sin embargo, esta estrategia ha tenido una eficacia pobre y con efectos secundarios. (49)

G) Modificadores de la respuesta biológica

Son sustancias sintéticas como el interferón- α (citosina) que se han utilizado para tratar distintos tumores, empleando su capacidad para estimular al sistema inmune y afectar el suministro sanguíneo. (36)

H) Péptidos anti-adhesivos

Anticuerpos que reconocen a la integrina (familia de receptores de la superficie celular expresados por las células endoteliales) así como péptidos antagonistas, han mostrado la capacidad de bloquear la interacción de las integrinas con sus ligandos en la matriz extracelular. (31) La **vitaxina**, es un anticuerpo humanizado (LM609) dirigido contra la molécula de adhesión integrina α -v- β -3 que inhibe la angiogénesis inducida por el FGF- β y favorece la apoptosis de la célula endotelial activada, pero no de la célula endotelial quiescente. (50)

I) Otros agentes

Los oligonucleótidos antisentido (2), así como anticuerpos de fragmento variable de una sola cadena (scFv), inmunotoxinas, inmunoliposomas (50), anticuerpos fúngicos como la fumagilina y sus análogos sintéticos como el TNP-470, e inhibidores de canales de calcio que bloquean la proliferación y migración de las células tumorales, así como el carboxiamidotriazol (CAI), que inhibe la angiogénesis (31), han sido utilizados exitosamente contra el crecimiento tumoral, principalmente al inhibir la actividad angiogénica.

J) Estrategias combinatorias

Como ya hemos visto, el dirigir las estrategias contra el VEGF, aunque es el principal factor angiogénico, por sí sólo no es suficiente para erradicar tumores malignos debido a que muchos factores angiogénicos además de éste, contribuyen para el cambio hacia la angiogénesis patológica. (32) Para atacar este problema, se han realizado distintos esfuerzos que combinan estrategias, obteniendo así efectos anti-tumorales mayores al combinar por ejemplo la terapia antiangiogénica particularmente contra el VEGFR y VEGFR-2 con la radioterapia así como quimioterapia, respectivamente. (2) Además, la intervención de otras células pro-angiogénicas como las células murales, células del estroma y hematopoyéticas podría mejorar en un futuro el desempeño de las estrategias antiangiogénicas al incrementar la eficacia y disminuir la resistencia a la inhibición de la angiogénesis. (32)

IMAGEN MOLECULAR DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL: NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS

La imagenología molecular es definida como la caracterización y medición de los procesos biológicos a nivel celular y molecular en los seres vivientes, empleando técnicas de imagen mínimamente invasivas. (51)

Las aplicaciones en los organismos in vivo incluyen: (a) Visualización de los mecanismos de expresión y entrega genética. (b) La evaluación de los procesos celulares. (c) El desarrollo de nuevas técnicas de imagen. (d) La facilitación del desarrollo de nuevas drogas. (e) El diseño de nuevos métodos para el monitoreo terapéutico y la visualización de diferentes mecanismos moleculares

como la angiogénesis y la apoptosis.

Las tecnologías involucradas son:

Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

Explora procesos moleculares y el metabolismo tisular de la glucosa, mediante la inyección endovenosa de un radiofármaco (positrones), que luego son rastreados por los detectores fotosensibles del equipo PET. El radioisótopo más empleado en la PET es el ^{18}F (FDG) con el cual se marca la glucosa, molécula que participa en el metabolismo de numerosos tejidos normales y patológicos. Además del FDG también se pueden producir otros isótopos emisores de positrones como el ^{13}N , el ^{15}O y el ^{11}C , que tienen una vida media más corta que la FDG y ello dificulta su manejo y aplicación clínica. Tiene aplicaciones en oncología, en los procesos inflamatorios e infecciosos, en cardiología, en neurología y psiquiatría se utiliza en investigación sobre el cerebro y en el estudio del mapa de las funciones cerebrales. Pre-clínicamente ha sido particularmente útil en el monitoreo de la expresión de receptores extracelulares y la eficacia de vectores de terapia genética. (52,53)

Tomografía por Emisión de Fotón Simple (SPECT)

Es una técnica en la cual después de la administración al paciente de un radiofármaco ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I y ^{125}I), una o varias gamma cámaras rotan alrededor del paciente para obtener y reconstruir los datos obtenidos por la emisión de un fotón simple en forma de rayos gamma, produciendo una imagen en forma de cortes que puede ser presentada en cualquier plano incluyendo en 3D. La SPECT es una técnica poderosa que se ha usado para obtener la imagen de varios procesos moleculares, se ha usado para rastrear moléculas y células incluso radiotrazadores de annexin-V como un marcador temprano de apoptosis. (54,55)

Potencialidades

Es posible que el desarrollo de la imagenología molecular promueva al descubrimiento más temprano y a la caracterización de las enfermedades, en la comprensión de la biología tanto de los procesos fisiológicos como fisiopatológicos. La aparición de tratamientos con mejores resultados así como la evaluación y monitoreo de su acción, por lo que ya se prevé una

mayor especificidad en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades. La imagenología molecular in vivo podría permitir el estudio de la patogénesis en el micro ambiente intacto de los sistemas vivientes. Tiene el potencial para proporcionar información mucho más rápidamente que la que actualmente es posible con las técnicas convencionales invasivas y laboriosas como el análisis histológico, juega un importante rol en el desarrollo y aplicación de las técnicas de imagen para las manipulaciones genéticas, realiza el “screening” in vivo de las nuevas drogas y permite entender los eventos moleculares funcionales en los organismos vivientes a los niveles celulares y moleculares. La imagenología molecular permitirá el descubrimiento de las bases de las enfermedades mediante su caracterización molecular y la detección de las fases tempranas de las enfermedades como el Alzheimer y el cáncer antes de que aparezcan síntomas claros. Para las compañías farmacéuticas, la imagenología acelerará la llegada de los fármacos al mercado, ya que permite a los científicos ver, en sólo unos días, si los medicamentos funcionan, sin tener que esperar mucho tiempo.

Imagen molecular de la expresión VEGF/VEGFR.

La sobreexpresión de VEGFR y de VEGF-A está asociada con la progresión tumoral y pobre pronóstico en varios estudios clínicos del cáncer (56). Están en desarrollo agentes que prevengan la unión del VEGF-A a sus receptores, anticuerpos que bloquean directamente el VEGFR-2 y pequeñas moléculas que inhiban la actividad quinasa del VEGFR-2 que bloquean la señalización VEGF/VEGFR. Con este fin se ha marcado el VEGF₁₂₁ recombinante humano con ¹¹¹In y ^{99m}Tc para imágenes SPECT, y ⁶⁴Cu para imagen PET de la angiogénesis tumoral y expresión de VEGFR(56) También se ha marcado con ¹²³I el VEGF₁₆₅ como un posible marcador tumoral en pacientes con carcinoma pancreático. (57)

Un anticuerpo monoclonal IgG1, el VG76e, que se une al VEGF humano, fue marcado con ¹²⁴I para imagen PET. (58) Otro anticuerpo, el HuMV833, la versión humanizada del anticuerpo MV833, fue marcado con ¹²⁴I en pacientes con cáncer en Fase I. (59) A su vez, se han marcado péptidos antagonistas del VEGFR con ¹¹C o ¹⁸F. (60)

También se ha marcado del anticuerpo bevacizumab con ^{99m}Tc el cual ha sido evaluado en modelos preclínicos de melanoma como un posible agente de imagen molecular y se han obtenidos muy buenos resultados hasta el momento (61).

Imagen molecular de la expresión de la integrina αβ3

La integrina αβ3, la cual se une a los componentes de la matriz intersticial, ácido aspártico-arginina-glicina (RGD), es sobreexpresada sobre el endotelio vascular durante la angiogénesis tumoral pero no en aquellos tejidos quiescentes. La inhibición de la actividad de dicha integrina αβ3 por anticuerpos monoclonales, péptidos antagonistas RGD cíclicos y peptidomiméticos, se ha visto que son capaces de inducir la apoptosis de la célula endotelial, de inhibir la angiogénesis e incrementar la permeabilidad de la monocapa endotelial. Los péptidos RGD han sido marcados con ¹¹¹In/⁹⁰Y y ^{99m}Tc para imágenes SPECT de la expresión de la integrina αβ3 (62-63) y con ¹²⁵I, ¹⁸Fy con ⁶⁴Cu para imágenes PET y se han logrado considerables resultados. (64-66)

Un anticuerpo humanizado contra esta integrina, el Abegrin (MEDI-522, también denominado VITAXIN), se ha marcado con ⁶⁴Cu y se encuentra en ensayo clínico para el tratamiento del cáncer. (67)

Imagen molecular de la expresión MMP

Las MMPs juegan un rol importante en la angiogénesis tumoral, en particular las gelatinasas MMP-2 y la MMP-9. Un número de inhibidores MMP han sido desarrollados como agentes citostáticos y antiangiogénicos y están en la actualidad en ensayo clínico. Se han desarrollado marcaciones de la expresión de inhibidores de las MMPs con ¹²³I, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ¹¹C, ¹⁸F y/o ⁶⁴Cu para investigación clínica y biológica in-vivo utilizando SPECT y PET. 68-71

CONCLUSIONES

Los procesos angiogénicos son de vital importancia ya sea para el crecimiento tumoral, la invasividad y formación de posibles metástasis. Tanto la identificación de los factores que la promueven, así como de sus receptores asociados, han sido blancos para la creación de numerosas drogas cuya finalidad es la inhibición de tal proceso. El diseño de nuevos métodos para el monitoreo

terapéutico y la visualización de diferentes mecanismos moleculares de la angiogénesis, han sido claves para la comprensión e identificación de nuevas estrategias anti-angiogénicas actuales. Los autores consideran que este es uno de los procesos más importantes en el desarrollo tumoral y a su vez, que se encuentra muy estrechamente vinculado a su microambiente, y por lo cual el estudio conjunto de estos dos fenómenos podría ayudar a la comprensión y al mejoramiento de las terapias actuales contra el cáncer.

SUMMARY

Angiogenesis is basic for tumor development, and the period during which the transition from the tumor avascular to the vascular phase is regulated by the expression of pro angiogenic factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF). This substance is a glycoprotein produced either by normal or by neoplastic cells and it plays a significant role in physiologic and pathologic situations as well. The union of the

VEGF to its receptors, leads to the recruiting of intracellular molecular signals, responsible for cell survival, vascular permeability, migration and proliferation. Many studies have described the relationship existing between the expression of VEGF and prognosis for the patients with oncologic pathologies. Both the VEGF and its receptors have been the target for the development of various therapeutic and diagnostic agents.

This paper describes a few of these agents, as well as their strategies and/or mechanisms towards the visualization or inhibition of tumor angiogenesis.

Key Work: ANGIOGÉNESIS INHIBITORS
VEGF

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Dvorak HF. Angiogenesis update 2005. *Thromb Haemost* 2005; 3:1835-1842.
- (2) Ferrara N, Gerber HP, LeCounter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-676.
- (3) Hunter J. Lectures on the Principles of Surgery in the Works of John Hunter, ed. J. F. Palmer, vol.1, p.220. London : Longman, sf. p 220.
- (4) Virchow R, Die. Krankhaften Geschwulste. Berlin : August Hirschwald, 1863.
- (5) Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907; 2:1236-40.
- (6) Clark ER, et al. General observations on the ingrowth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit's ear, and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of months. *Anat Rec* 1931; 50:129-67.
- (7) Clark ER, Clark EI. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammals. *Am J Anat* 1939; 64:251-301.
- (8) Ide AG, Baker NH, Warren, et al. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939; 32:891-9.
- (9) Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6:73-85.
- (10) Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
- (11) Figg WD, Folkman J. Angiogenesis: an integrative approach from science to medicine. New York: Springer, 2008.
- (12) Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum (Geneva)* 1999; 9:3 (3 Suppl):59-62.
- (13) Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance on microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:97-132.
- (14) Shibuya M. Structure and fuction of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26:25-35.
- (15) Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 2001; 55:108-121.

- (16) Houck KA, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1806-1814.
- (17) De Vries C, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989-991.
- (18) Veikkola T, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60:203-212.
- (19) Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005; 9:209-31.
- (20) Holash J, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284:1994-8.
- (21) Ruhrberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *J Cell Sci* 2001; 114:3215-6.
- (22) Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-16.
- (23) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
- (24) Carmeliet P; Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-57.
- (25) Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8:294-300.
- (26) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-64.
- (27) Folkman J, et al. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001; 86:23-33.
- (28) Moeller BJ, et al. The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:215-21.
- (29) Semenza G. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 2003; 54:17-28.
- (30) Goodsell D. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003; 21: 118-119.
- (31) Zetter B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49:407-424.
- (32) Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932-36.
- (33) Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-74.
- (34) Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29(6):10-14.
- (35) Dvorak HF, Rons-Whipple A. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003;162:1747-57.
- (36) Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenesis process. *Curr Mol Med* 2003, 3: 643-51.
- (37) Ingber D, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348:555-7.
- (38) Hurwitz H, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42.
- (39) Hida K, et al. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 2004; 64:8249-55.
- (40) Yu JL, et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002; 295:1526-8.
- (41) Ferrara N, Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-74.
- (42) Ferrando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *The Oncologist* 2004; 9(1): 11-18.

- (43) Presta LG, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57:4593-99.
- (44) Lee CG, et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000; 60:5565-70.
- (45) Prewett M, et al. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 5209-18.
- (46) Mendel DB, et al. 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* 2003; 9(1):327-37.
- (47) Wood JM, et al. PTK787/ ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000; 60:2178-89.
- (48) Pietras R, Weinberg O. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *ECAM* 2005; 2(1): 49-57.
- (49) Bikfalvi A, Bicknell R. Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(12): 576-82.
- (50) Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs* 1999; 17: 195-212.
- (51) Weissleder R, Mahmood U. Molecular Imaging. *Radiology* 2001; 219:316- 33.
- (52) Blankenberg FG, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:6349-54.
- (53) Miles K A. Perfusion CT for the assessment of tumour vascularity: which protocol? *British Journal of Radiology* 2003; 76: 36-42.
- (54) Maria Moresco R, et al. PET in psychopharmacology. *Pharmacol Res* 2001; 44:151-9.
- (55) Eleta F, et al. Imágenes moleculares: morfología y función. *Rev Argent Radiol* 2004; 68: 201-22.
- (56) Cai W, et al. Positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Nucl Med* 2006; 47 (12): 2048-56.
- (57) Cornelissen B, et al. In vitro and in vivo evaluation of [123I]-VEGF165 as a potential tumor marker. *Nucl Med Biol* 2005; 32:431-6.
- (58) Cornelissen B, et al. In vitro and in vivo evaluation of [123I]-VEGF165 as a potential tumor marker. *Nucl Med Biol* 2005; 32:431-6.
- (59) Jayson GC, et al. Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94:1484-93.
- (60) Goncalves M, et al. Design, synthesis, and evaluation of original carriers for targeting vascular endothelial growth factor receptor interactions. *Pharm Res* 2005; 22:1411-21.
- (61) Camacho X, et al. [99mTc(CO)3]-Radiolabeled Bevacizumab: In vitro and in vivo evaluation in a Melanoma model. *Oncology*, "in press"; DOI: 10.1159/000338961.
- (62) Janssen ML, et al. Tumor targeting with radiolabeled avh3 integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Res* 2002; 62:6146-51.
- (63) Line BR, et al. Targeting tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates. *J Nucl Med* 2005; 46:1552-60.
- (64) Haubner R, et al. Noninvasive imaging of avh3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptides and positron emission tomography. *Cancer Res* 2001; 61:1781-5.

- (65) Chen X, et al. MicroPET and autoradiographic imaging of breast cancer αv -integrin expression using ^{18}F - and ^{64}Cu -labeled RGD peptide. *Bioconjug Chem* 2004;15:41–9
- (66) Chen X, et al. Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: ^{64}Cu labeling and PET imaging of brain tumor $\alpha v\beta 3$ -integrin expression. *J Nucl Med* 2004; 45:1776–83.
- (67) Cai W, et al. In vitro and in vivo characterization of ^{64}Cu -labeled Abegrin2, a humanized monoclonal antibody against integrin $\alpha v\beta 3$. *Cancer Res* 2006; 66:9673–81.
- (68) Furumoto S, et al. Tumor detection using ^{18}F -labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor. *Nucl Med Biol* 2003; 30:119–25.
- (69) Giersing BK, et al. Synthesis and characterization of ^{111}In -DTPA-N-TIMP-2: a radiopharmaceutical for imaging matrix metalloproteinase expression. *Bioconjug Chem* 2001; 12:964–71.
- (70) Oltenfreiter R, et al. New radioiodinated carboxylic and hydroxamic matrix metalloproteinase inhibitor tracers as potential tumor imaging agents. *Nucl Med Biol* 2004; 31:459–68.
- (71) Sprague JE, et al. In vitro and in vivo investigation of matrix metalloproteinase expression in metastatic tumor models. *Nucl Med Biol* 2006; 33:227–37.