

ESTUDI DE L'ANGIOGÈNESI EN EL PECTEN OCULI DE L'EMBRIÓ DE POLLASTRE

Escrit per:

Joaquim Bosch Barrera

Estudiant de Medicina
Universitat de Barcelona

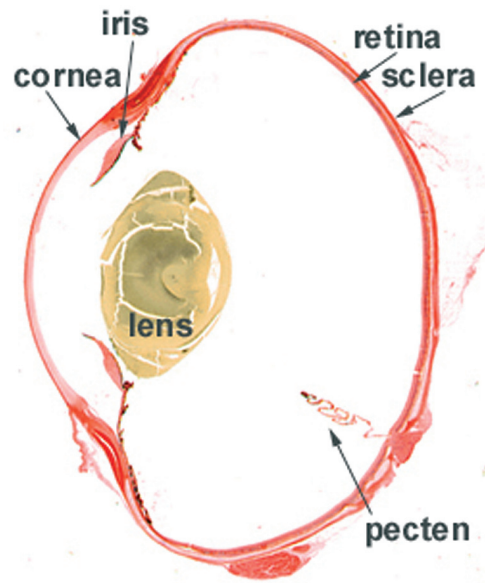


Figura 1. Anatomia de l'ull del pollastre, on es pot veure la localització del pecten.

L'angiogènesi és la formació de vasos sanguinis a partir de vasos ja formats. Aquest procés biològic ha prè molt de relleu en l'àmbit de la investigació biomèdica sobretot a partir de les idees de Judah Folkman relatives al paper d'aquesta en el creixement i disseminació dels tumors. Aquestes propostes foren formulades ja fa uns 30 anys, i han fet merèixer al seu autor el reconeixement científic amb el Premi Príncep d'Astúries d'enguany. Segons Folkman les cèl·lules tumorals es mantenen inicialment en un estat quiescent. Quan es dispara l'angiogènesi, els tumors creixen i poden fer metàstasi.

Si un tumor no experimentés angiogènesi no creixeria per sobre de 1-2 mm de diàmetre, ja que li faltaria l'oxigen i els nutrients necessaris per sobreviure. Així doncs, perquè un tumor pugui créixer necessita segregat factors i senyals químiques angiogèniques.

Aquest fet ha promogut la investigació d'aquestes senyals per tal de poder-les inhibir i poder aturar la progressió dels tumors neoplàssics, és a dir, en busca de l'anomenada teràpia antiangiogènica.

De forma esquemàtica es parla que en el procés de l'angiogènesi hi ha quatre etapes bàsiques:

- 1) Desestabilització del vas existent: les cèl·lules endotelials del "vas mare" hidrolitzen la seva membrana basal i es produeix una dissociació de les cèl·lules de la paret vascular (cèl·lules musculars llises, principalment). S'ha postulat que aquest pas estaria principalment controlat per l'angiopoietina 2.
- 2) Proliferació de les cèl·lules endotelials: un cop les cèl·lules endotelials estan alliberades, aquestes són estimulades pel VEGF (Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular) resultant una proliferació permetent disposar de noves cèl·lules per construir els nous vasos.
- 3) Associació de les cèl·lules endotelials: tot seguit, les cèl·lules endotelials es col·loquen formant estructures tubulars i formen la membrana basal. Aquest pas està controlat sobretot per l'angiopoietina 1.
- 4) Estabilització dels vasos formats. Els nous vasos interaccionen amb les cèl·lules de la paret vascular augmentant així la seva resistència a l'apoptosi. En aquesta fase hi participen el VEGF i l'Angiopoietina 1.

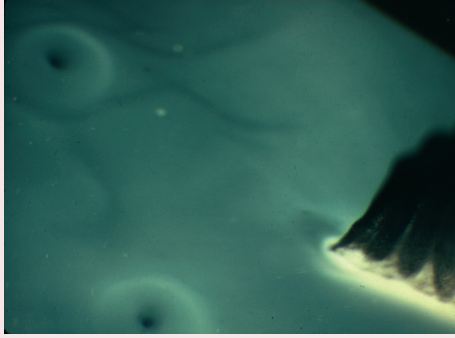


Figura 2. Imatge del pecten de l'*Elanus notatus*. Es poden observar dues fòvees i a l'extrem dret inferior de la imatge es pot visualitzar el pecten oculi d'aquesta au.

La regressió vascular, el pas invers, constaria només de dues fases :

- 1) Desestabilització dels vasos, que es produiria de la mateixa manera que en l'angiogènesi.
- 2) Apoptosi de les cèl·lules dissociades a causa de l'absència de l'expressió de VEGF en presència d'Angiopoietina 2 (que és l'encarregada de la desestabilització).

El procés de l'angiogènesi no només té importància avui en dia en la seva possible utilització en la terapèutica del càncer –fet que la va popularitzar en l'àmbit de la investigació biomèdica– sinó també dins d'un gran ventall de patologies :

A) Malalties causades per un increment anormal d'angiogènesi:

Multiorgànica: Càncer, malalties autoimmunes.

Vassos sanguinis: Malformacions vasculares, Síndrome DiGeorge, Hemangioma cavernós, aterosclerosi, arteriopatia del trasplantament.

Teixit adipós: Obesitat

Pell: Psoriasis, dermatitis al·lèrgica, sarcoma de Kaposi en malalts de SIDA, granulomes.

Ulls: Síndrome d'hiperplàsia persistent del vitri, retinopatia diabètica, neovascularització coroidal, retinopatia de la prematuritat.

Pulmó: Hipertensió pulmonar primària, asma, pòlips nasals

Intestins: Malalties inflamatòries, ascitis, adhesions peritoneals.

Aparell reproductor: endometriosis, quists ovàrics, hiperestimulació ovàrica.

Ossos i articulacions: artritis, sinovitis, osteomielitis, formació d'osteòfits.

B) Malalties causades per una insuficient angiogènesi o regressió vascular:

Sistema nerviós: Malaltia d'Alzheimer, Esclerosi Lateral Amiotròfica, Ictus.

Vasos sanguinis: Arteriosclerosi, hipertensió, diabetis, reestenosis.

Gastrointestinal: Úlceres gàstriques o bucal, Malaltia de Crohn.

Pell: Pèrdua de cabell, púrpura, telan-gectàsia, formació de varices.

Aparell reproductor: Pre-eclàmpsia, menorràgia.

Pulmó: Distrés respiratori del neonat, fibrosi pulmonar, emfisema.

Ronyó: Nefropatia

Ossos: Osteoporosi, fractures òssies.

Les molècules relacionades amb l'angiogènesi són moltes. En el meu treball m'he centrat només en algunes d'elles i els seus receptors: VEGF, Flt-1 (VEGFR1) i KDR (VEGFR2), les angiopoietines (1 i 2), el PEDF i la N-caderina. A continuació faig una breu descripció de cadascuna d'elles:

VEGF (Factor de Creixement Endoteli Vascular): Aquest factor actua específicament sobre l'endoteli promovent la proliferació i supervivència de les cèl·lules endotelials i l'augment de la permeabilitat dels vasos.

Receptors VEGF: S'han caracteritzat tres receptors per al VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 o KDR) i VEGFR-3 (Flt-3). Aquest últim, el VEGFR-3, no ha estat estudiat en aquest treball, ja que està implicat en la formació dels vasos limfàtics.

El VEGFR-2 (KDR) augmenta la proliferació endotelial i la permeabilitat dels vasos.

S'ha postulat que el VEGFR-1 o Flt-1 actuarà com un receptor "reclam", ja que s'ha descrit que el domini extracel·lular del Flt-1 té una afinitat 10 vegades més gran que el KDR, mentre que l'activitat tirosinquinasa del Flt-1 és un ordre de magnitud inferior al KDR.

El Flt-1 té una forma soluble (Flt1-s) que s'uneix al VEGF però que no posseeix cap domini tirosinquinasa (és un receptor truncat). El nostre laboratori va ser el primer en descriure dues formes del sFlt-1 de pollastre .

Angiopoetines: Les angiopoetines són proteïnes amb importants funcions en el desenvolupament vascular i l'angiogènesi. Totes les angiopoetines s'uneixen amb similar afinitat a un receptor tirosinquinasa específic de les cèl·lules endotelials (Tie-2).

Ang-1: L'angiopoetina-1 és una glicoproteïna de 70-kd que activa el receptor Tie-2 produint la seva fosforilització. Malgrat que l'Ang-1 no causa una proliferació endotelial significativa en els cultius, és essencial per a la supervivència de l'endoteli.

Ang-2: La funció de l'Ang-2 al unir-se al Tie-2 varia en funció del teixit, ja que en alguns l'activa i en d'altres l'inhibeix.

La seva principal funció és convertir els vasos en més inestables i per tant, deixar-los en una posició més plàstica (facilitant l'angiogènesi o la regressió vascular depenent del VEGF, com ja s'ha explicat). En el nostre laboratori s'ha caracteritzat la primera isoforma de l'angiopoietina 2 i se n'ha determinat l'estructura del gen .

PEDF: Les seves inicials corresponen al nom de Factor Derivat de l'Epiteli Pigmentari (en anglès: Pigment epithelium-derived factor). Entre les seves funcions s'ha descrit que és un potent inhibidor natural de l'angiogènesi en l'ull.

N-Caderina: Hem estudiat la N-Caderina (la inicial N indica que és d'origen neural) bàsicament perquè ha estat estudiada prèviament per un grup alemany en el pecten de pollastre i ens ha servit de control i punt de referència. A més a més, es postula que és un marcador d'invasió tumoral.

Com s'ha pogut comprovar, s'han estudiat principalment factors pro-angiogènics,

però també s'ha volgut afegir a la llista de molècules estudiades un factor anti-angiogènic. Aquest fet és interessant ja que s'està tendint últimament a enfocar l'angiogènesi i la regressió vascular com el resultat d'un equilibri de forces.

També cal constatar que el fet d'explorar l'expressió de diverses molècules -i no només centrar-se en una- té un cert encant ja que cada cop es sol investigar més quin és el paper d'una molècula en relació amb d'altres per tal de poder explicar com funciona l'angiogènesi.

El pecten oculi:

El pecten oculi és un conglomerat de vasos sanguinis que es troba en l'humor vitri dels ulls de les aus. Aquesta estructura vascular va ser descrita per primera vegada el 1676 per C. Perrault. Ha estat estudiada en profunditat des de l'anatomia i la histologia durant el seu desenvolupament embrionari i en l'adult. La funció del pecten ha estat motiu de controvèrsies. Una de les funcions que se li ha adjudicat és la de formar una barrera entre la retina i la sang. A part d'aquesta funció de barrera, la hipòtesi més convincent sobre la seva funció dins de l'ull seria la de subministrar l'aport nutricional en la retina avascular pròpia de les aus. Tanmateix, seria difícil explicar la perfusió per part del pecten de la retina pel mecanisme de la difusió ja que les distàncies són enormes per a aquest sistema. Per aquesta raó s'ha postulat que els moviments sacàdics de l'ull podrien justificar que el pecten sigui, de fet, l'encarregat de la nutrició de la retina .

El pecten oculi de pollastre presenta diversos avantatges com a model experimental:

- 1) És observable macroscòpicament i microscòpicament.
- 2) És de fàcil obtenció.
- 3) El curt cicle embrionari del pollastre (21 dies).

4) La possibilitat de mantenir-lo viu in vitro per a poder analitzar la seva resposta a determinats estímuls.

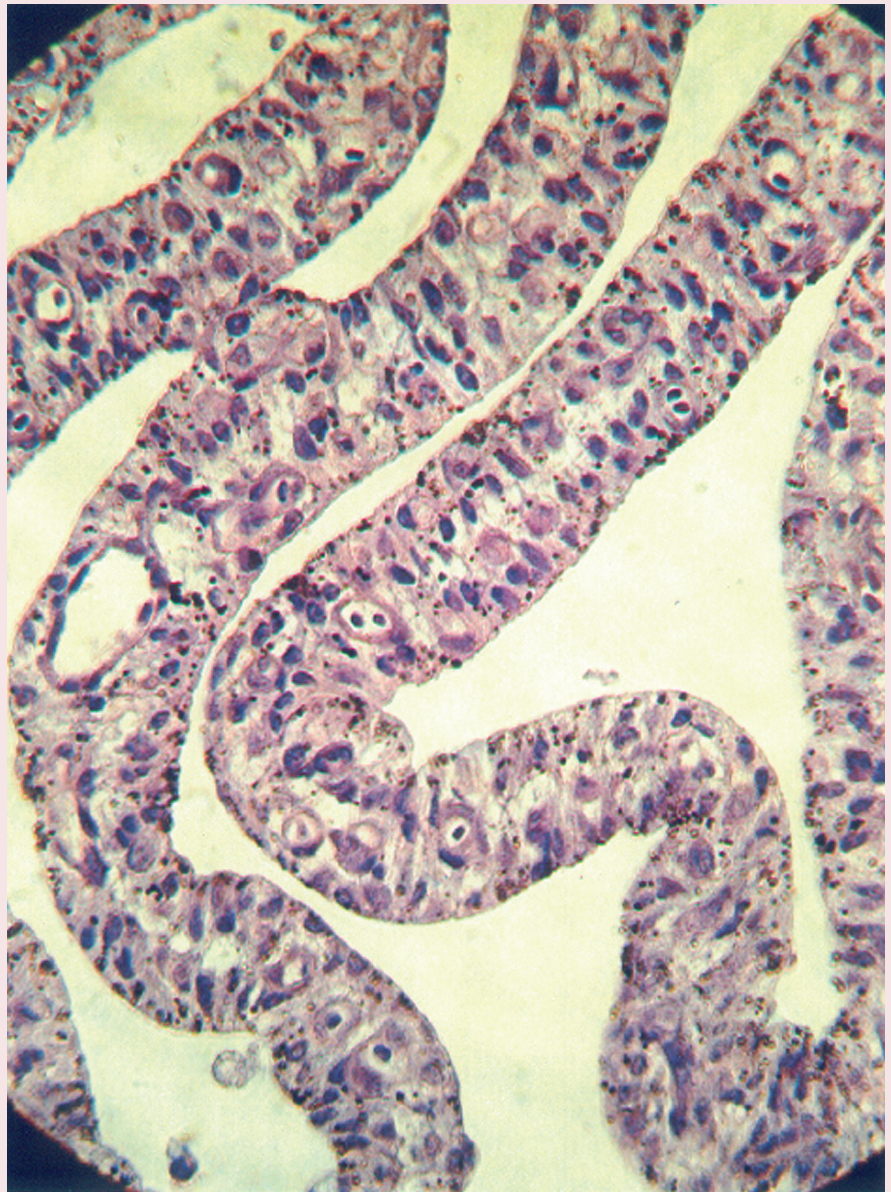
Malgrat totes aquestes característiques del pecten oculi, encara mai s'havia estudiat amb profunditat com es correlacionen els canvis morfològics del pecten durant el seu desenvolupament amb la seva expressió gènica pel que fa a l'angiogènesi, que ha estat el motiu de la meua investigació.

Resultats:

El que he fet en el meu treball ha estat analitzar per RT-PCR (fer una amplificació per PCR a partir de RNA amb un enzim retrotranscriptasa) i analitzar les mateixes molècules amb anàlisi Northern amb sondes de RNA per a les molècules citades anteriorment.

A continuació es mostren les conclusions a partir dels resultats obtinguts:

Figura 3. Imatge de microscòpia òptica (x600 augments) del pecten de pollastre de 16 dies d'embriogènesi. Es pot observar en aquesta mostra tenyida amb Hematoxilina/Eosina la gran quantitat de vasos sanguinis presents en el pecten, així com la presència de cèl•lules pigmentades. Agraïxo la col•laboració d'Agustín García en l'obtenció d'aquesta preparació i fotografia.



· L'expressió de VEGF en el pecten de pollastre augmenta lleugerament durant el desenvolupament embrionari des del dia 10 fins al naixement.

· Els receptors del VEGF, KDR i Flt-1, mostren ambdós un patró d'increment d'expressió a nivell de l'ARN missatger. Tanmateix, l'augment del Flt-1 és més precoç que el del KDR segons la RT-PCR. Les dues formes del sFlt-1 presenten un patró d'expressió similar al del Flt-1. L'augment d'ambdós receptors, Flt-1 i KDR, podria explicar que malgrat el VEGF no augmenti excessivament d'expressió, el seu efecte a nivell cel•lular podria ser més gran a mesura que avança el desenvolupament embrionari del pecten de pollastre.

· L'angiopoetina 1 presenta un màxim d'expressió al dia 16. Segons aquest patró podria tenir un paper important en l'adquisició de propietats de barrera hemàtica o encefàlica per part del pecten.

· Pel que fa a l'Angiopoetina 2 podem concloure que presenta com en el cas del VEGF una expressió elevada al llarg del temps.

· El PEDF, molècula antiangiogènica, presenta un considerable increment d'expressió al llarg del desenvolupament.

? Finalment, indicar que la N-Caderina presenta un màxim d'expressió el dia 12.

Els resultats d'aquests experiments han permès al nostre laboratori poder conèixer l'expressió fisiològica d'aquestes molècules angiogèniques. Amb aquestes dades hem pogut seleccionar l'edat del pecten idònia per tal de fer experiments d'inducció-repressió d'aquestes molècules per part de l'inhibidor del proteasoma (un nou fàrmac antitumoral en fase d'assaig clínic en diferents tipus de tumors i ja aprovat als EUA per al tractament del mieloma múltiple). Els resultats d'aquest últim experiment han estat motiu d'una recent publicació. Malgrat aquests resultats, encara queda molt de camí per comprendre del tot la fisiologia de l'angiogènesi en el pecten oculi embrionari.

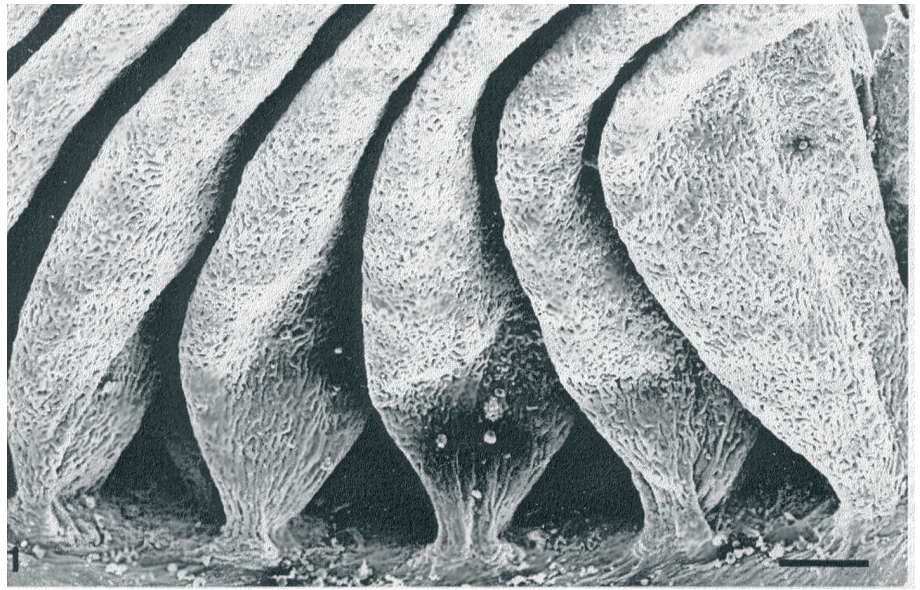


Figura 4. Imatge de microscòpia electrònica d'escombratge del pecten de pollastre. Els plegaments surten del disc òptic (inferior). El gran número de vasos sanguinis apareix com un densa xarxa en la superfície del plegaments. Barra: 100 micres x 170. Publicat a: Gerhardt H, Liebner S, Wolburg H. The pecten oculi of the chicken as a new in vivo model of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 1996 Jul;285(1):93.

Com a conclusió final, també indicar que un millor coneixement de l'angiogènesi fisiològica ens ha de permetre poder dissenyar noves estratègies terapèutiques per tal de curar malalties relacionades amb una angiogènesi patològica (ja sigui per excés com per dèficit). Fins ara s'ha investigat molt en buscar correlacions i detectar els factors implicats en l'angiogènesi, però encara no s'ha profunditzat en el seus mecanismes de regulació i funcionament. Per aquest objectiu caldrà tenir en compte els gens implicats, el paper dels ARN missatgers i les proteïnes, però sense oblidar el paper que poden desenvolupar en aquest camp els ARN reguladors, que cada cop s'estan mostrant més implicats en la química de la vida.

Agraïments:

No vull acabar aquest article sense agrair l'esforç realitzat pels Drs. Cristóbal i Jovita Mezquita en el seu "Programa d'introducció a la recerca" de la Facultat de Medicina de la UB. També vull agrair la col•laboració de la Montserrat Pau, Agustín Garcia i Betlem Mezquita pel seu suport i col•laboració al llarg del treball realitzat en el laboratori.



BASES DE LA CONVOCATÒRIA 2004-2005

Requisits Bàsics

Ser estudiant de 1r o 2n cicle de la llicenciatura en Medicina, Biologia, Bioquímica, Farmàcia, Química o Biotecnologia d'alguna de les universitats de parla catalana i haver participat en un projecte d'investigació biomèdica en una universitat nacional o estrangera.

Resums

La convocatòria per a l'enviament de resums i sol·licituds s'obre de l'1 d'octubre de 2004 fins a l'1 de març de 2005. Els resums s'enviaran per correu electrònic a la següent adreça premigrr@yahoo.com, tindran una extensió màxima de 500 paraules i hi haurà de constar:

- Títol del treball de recerca.
- Autor/s.
- Universitat on s'ha realitzat la recerca.
- Universitat on s'ha llicenciat l'estudiant.
- Contingut: Objectius, Metodologia, Resultats, Conclusions. Destacar la contribució personal al projecte.

Imprès de Sol·licitud de Participació

Juntament amb el resum cal emplenar la sol·licitud de participació i enviar-la a: premigrr@yahoo.com

Tant el resum (només en cas de participació activa) com l'Imprès de Sol·licitud (tant participació activa com passiva) els trobaràs a www.gemmarr.org

Procés de Selecció

Un cop tancada la convocatòria un jurat format per investigadors i professors universitaris decidirà quins abstracts tenen la qualitat necessària per a ser presentats públicament. El 7 de març es publicarà en aquesta pàgina web el nom dels estudiants seleccionats.

La presentació a les Jornades

Presentació en Power Point 2000, NT, XP de 10 minuts de duració i 5 minuts per a preguntes del jurat i dels assistents. La presentació s'haurà de lliurar un dia abans del començament de les jornades en un CD.

Premis

S'adjudicaran 3 premis:

- 1r Premi 1000 euros. Atorgat per Encarna Romero Buiza, mare de Gemma Rosell i Romero.
- 2n Premi 500 euros. Atorgat per l' Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears.
- 3r Premi 300 euros. Atorgat per l'Associació d'Estudiants de Ciències de la Salut.

a les 3 millors presentacions del congrés. El Premi es pot declarar desert.

Crèdits de lliure elecció

La participació activa al congrés està reconeguda amb crèdits de lliure elecció a les diferents universitats de parla catalana. Consulta la pàgina web www.gemmarr.org per saber si la teva Universitat reconeix l'activitat amb crèdits de lliure elecció.

Publicació a la revista Omnis cellula

L'estudiant guanyador del primer Premi tindrà l'oportunitat de publicar un article sobre el tema de la seva investigació a l'edició d'octubre de 2005 de la Revista Omnis Cellula dins l'espai Jove Científic.