

XV SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 3 DE JUNIO DE 2003

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**MARCADORES MOLECULARES DE RIESGO
DE METÁSTASIS EN EL CÁNCER COLORRECTAL**
*PREDICTIVE MOLECULAR MARKER OF DISTANT
METASTASIS IN COLON CANCER*

Por el Excmo. Sr. D. JULIÁN SANZ ESPONERA

Académico de Número

ANGIOGÉNESIS Y VASCULOGÉNESIS CARDÍACA
ANGIOGENESIS AND HEART VASCULOGENESIS

Por el Excmo. Sr. D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO

Académico de Número

**MARCADORES MOLECULARES DE RIESGO
DE METÁSTASIS EN EL CÁNCER COLORRECTAL ***
*PREDICTIVE MOLECULAR MARKER OF DISTANT
METASTASIS IN COLON CANCER*

Por el Excmo. Sr. D. JULIÁN SANZ ESPONERA

Académico de Número

Resumen

El desarrollo y la progresión del cáncer de colon es la consecuencia de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas. Actualmente se aceptan dos mecanismos patogénicos diferentes en la aparición de estos tumores. La primera vía, denominada la vía APC/Bcatrina está caracterizada por la existencia de una inestabilidad cromosómica que da lugar a la acumulación de mutaciones en diferentes oncogenes o genes supresores y ocurre a través de una serie de cambios morfológicos identificables. La segunda vía está caracterizada por una lesión en los genes «ADN mismatch repair genes» y se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones, pero los genes afectados son diferentes y no hay una correlación morfológica.

Presento un estudio utilizando tissue-array sobre el valor predictivo de la presencia de metástasis hepática en pacientes con cáncer colo-rectal que se encuentran en estadio T2 N0 de distintos marcadores moleculares. Nuestros resultados muestran que un aumento en la expresión de survivina, CDK, MIBI y Topoisomerasa II se asocian con la presencia de metástasis en este tipo de tumores.

Abstract

Tumor development and progression is driven by the accumulation of somatic genetic alterations. Two major pathways have been suggested in colon tumorigenesis. The first one, The APC/B-catenin pathway consists of chrosomal imbalance (Instability) and therefore accumulation of different oncogenes and tumor supressor genes mutations associated with morphologi-

cal changes. The second one is characterized by «DNA mismatch repair genes» damage with subsequent accumulation of somatic genetic predictive markers of distant metastasis using tissue microarrays in T2N0 colon cancer. IN our series, we detected over expression of survivin, CDK1, MIB1 and topoisomerase IIa in metastatic tumors.

En la última década se ha producido un incremento exponencial de nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que originan las neoplasias y que condicionan su posterior comportamiento biológico. A pesar de ello, la repercusión en la práctica clínica de dichos avances nosológicos es actualmente escasa. Es por ello necesario, encauzar los esfuerzos de la investigación, a conseguir una mayor proyección clínica de dichos conocimientos. Dos retos fundamentales deben plantearse en el momento actual con el objetivo último de mejorar nuestra función asistencial: el diagnóstico precoz de los tumores y la aplicación de la mejor opción terapéutica posible en cada paciente. Hemos hablado en esta Academia, en otras ocasiones, sobre las aplicaciones de estas técnicas en el diagnóstico precoz de los tumores. Analizaremos hoy, con mayor detalle, si en el momento actual los conocimientos moleculares pueden mejorar la especificidad y eficacia de nuestros recursos terapéuticos, buscando como objetivo, un tratamiento individualizado «a la carta», de los tumores (10).

Dentro de este tratamiento individualizado, a su vez, se podrían distinguir dos capítulos: el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y la optimización de los recursos terapéuticos actualmente existentes. Dentro de este último punto, la principal aportación que podría realizar la patología molecular, es distinguir entre casos en los que la extirpación quirúrgica habría sido curativa, de aquellos en los que pueden persistir células neoplásicas en el paciente, a pesar, de no existir evidencia clínica de ello, y que por tanto se beneficiaran de terapias coadyuvantes como la quimio o radioterapia, o incluso nuevas terapias génicas o inmunoterapia. Con ello, se podrían reducir cortes socio-sanitarios, empleando las terapias más efectivas en cada caso e impedir tratamientos coadyuvantes innecesarios en otros casos.

Las nuevas tecnologías están permitiendo un acercamiento eficaz a los análisis masivos de la expresión génica en los tumores. Los microarrays de c-DNA son ya hoy un arma eficaz que permite el estudio de miles de genes en amplias series tumorales. Los análisis de agrupamientos están permitiendo descubrir nuevos perfiles de expresión génica asociada a tipos tumorales previamente particularizados, o nuevos subtipos identificados a la luz de las relaciones

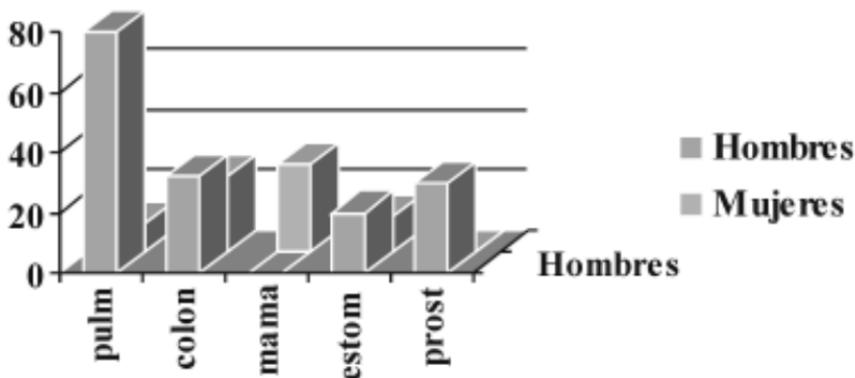


TABLA I.

establecidas entre estos análisis y la situación clínica de los pacientes. Estos ensayos están basados en el estudio de los niveles de expresión del ARN.

De un modo paralelo y con entidad propia, se está desarrollando en estos últimos años, un método sencillo de análisis de expresión génica: los «Tissue-array», que se han convertido en un método efectivo para el estudio, en series tumorales amplias, de estos perfiles mediante el análisis de ADN con técnicas de hibridación in situ o de expresión de proteínas mediante la inmunohistoquímica. Este método permite el análisis de cientos de marcadores tumorales en secciones consecutivos del tumor, con un mínimo de requerimiento tisular. Toda la serie tumoral es analizada a la vez, de modo que se garantiza la homogeneidad de las técnicas entre las muestras y se evitan los sesgos (8-15).

En la etiología del cáncer colorrectal se considera que participan múltiples factores. Es posible que exista una interrelación entre factores ambientales y constitucionales en su etiología y que la importancia de unos u otros varía según los individuos. Por tanto, ni un factor ni una serie de ellos serán la base en todos los casos de cáncer colorrectal. El cáncer es en último término una alteración a nivel genético. La fase inicial puede que en algunos casos sea constitucional, como, por ejemplo, la herencia de un gen supresor mutado como ocurre en el síndrome de la poliposis múltiple. De forma alternativa, la iniciación puede ser adquirida a través o bien de una mutación espontánea, o por la acción de mutagenes ambientales. Nuevas mutaciones e influencias promocionales actuarían en el proceso de «etapas múltiples» que conducen a la formación de una neoplasia maligna.

INCIDENCIA

En las últimas décadas la mortalidad por cáncer ha mantenido un aumento progresivo en nuestro país. A mediados del siglo pasado, se producían anualmente 20.000 muertes por cáncer, actualmente este número se ha cuadruplicado, mientras que las tasas brutas casi se han triplicado, pasando del 80 por 100.000 habitantes en 1951, a 228 por 100.000 habitantes en 1998. Junto a este incremento de su incidencia están cambiando las tasas de mortalidad por los diferentes tipos de tumores (tabla I). Especialmente preocupante es el aumento significativo en los varones de las tasas de mortalidad por cáncer, que se han atribuido en gran parte al aumento en la incidencia del cáncer de pulmón. En contraste, en las mujeres está disminuyendo ligeramente la incidencia de mortalidad debido en gran parte a la caída en la mortalidad de cánceres como el de útero, estómago y colon (7).

CARCINOGENESIS COLORRECTAL

Prácticamente todos los carcinomas colorrectales muestran alteraciones genéticas, cuyo estudio está permitiendo en gran parte, comprender el mecanismo general de la carcinogénesis como una alteración genética no letal. Actualmente se aceptan dos mecanismos patogénicos diferentes en la aparición del cáncer colo-rectal, ambos, se caracterizan por la suma de múltiples mutaciones. Si bien, los mecanismos como actúan y los genes que intervienen son diferentes.

La primera vía, denominada la vía APC/B-catenina, está caracterizada por la existencia de una inestabilidad cromosómica que da lugar a la acumulación de mutaciones en diferentes oncogenes o genes supresores. La evolución molecular del cáncer de colon por esta vía ocurre a través de una serie de estadios morfológicos identificables. En la etapa inicial hay una proliferación epitelial localizada que se sigue por la formación de pequeños adenomas que aumentan progresivamente de tamaño. Adquieren diferentes grados de displasia y finalmente se transforman en cánceres infiltrantes. Esta vía fue definida por Morson como la secuencia adenoma-carcinoma y se basa en las siguientes observaciones (12):

1. Las poblaciones con una elevada prevalencia de adenomas tienen también una alta incidencia de cáncer colorrectal y viceversa.
2. La distribución de los adenomas en el colon y el recto es más o menos comparable a la del cáncer colorrectal.
3. La incidencia máxima de los pólipos adenomatosos precede en algunos años al pico de incidencia del cáncer colorrectal.
4. Cuando se identifican carcinomas infiltrantes en estadio precoz, suele encontrarse tejido adenomatoso en su alrededor.
5. El riesgo de cáncer es directamente proporcional al número de adenomas, de ahí la certeza prácticamente total de que los pacientes con síndromes de poliposis familiar van a desarrollar un cáncer.
6. En los programas con seguimiento regulares de los pacientes para detectar el desarrollo de adenoma y extirpar todas los sospechosos reducen la incidencia de cáncer colorrectal.

Los procesos genéticos que se producen en esta vía son los siguientes:

Pérdida de gen supresor de los tumores APC. Se considera como el suceso inicial en la formación de los adenomas. En los síndromes de la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el de Gardner, una mutación en la línea germinal en el gen APC da lugar a la aparición de cientos de adenomas que progresan en pocos años a cánceres invasivos. Para que aparezcan los adenomas se necesita que se pierdan ambas copias del gen APC. Las funciones de la proteína APC están íntimamente relacionadas a la B-catenina normal. En condiciones normales promueve la degradación de la B-catenina; cuando hay una pérdida de la función del gen APC, la acumulación de B-catenina se traslada al núcleo y activa la transcripción de diferentes genes tales como el MyC y la ciclina D1, que promueven la proliferación celular. En el 80 % de los cánceres esporádicos de colon existe una mutación en el gen APC. Por tanto, se considera que el primer golpe se produce como consecuencia de una pérdida de una copia normal del gen supresor APC. De hecho, las personas que nacen con un alelo mutante de este gen son más propensas a desarrollar cánceres de colon. El segundo golpe sigue con la pérdida de la copia normal del gen APC. El siguiente paso parece ser una mutación en el gen K-ras, a los que se suman mutaciones adicionales de los genes supresores de los tumores DCC y

TP53, que conducen a la aparición de un carcinoma en el que ocurren nuevas mutaciones. Es conveniente señalar que aunque ésta parece ser la secuencia temporal, la acumulación de múltiples mutaciones es más importante que el orden en que éstas se producen. /5, 1,14)

El gen K-ras es el oncogen activado que con mayor frecuencia se observa en los adenomas y en los cánceres de colon. El K-ras activado (cromosoma 12p 12) interviene en la traducción de la señal intracelular que inicia la mitosis y previene la apoptosis. Se encuentra mutado en menos del 10 % de los adenomas que tienen un tamaño menor de 1 cm. En el 50 % de los mayores de 1 cm. y en el 50 % de los carcinomas.

Una pérdida alélica común en el cáncer de colon que afecta al cromosoma 18q 21 se produce en el gen DCC (deleted in colon cancer). La proteína que codifica este gen, una molécula de adherencia celular, se expresa ampliamente en la mucosa del colon. Sin embargo, la expresión se reduce o falta por completo en el 70 a 75 % de los cánceres, con la consecuencia habitual de pérdida de heterogeneidad en esta región del cromosoma 18q.

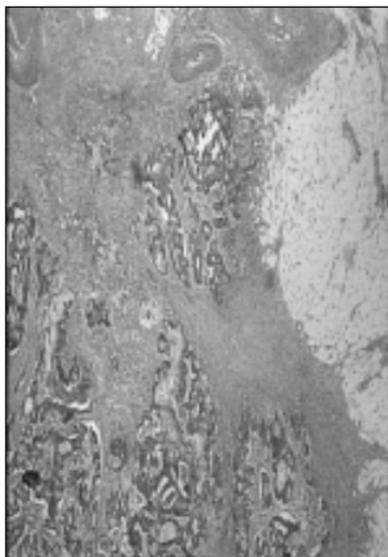
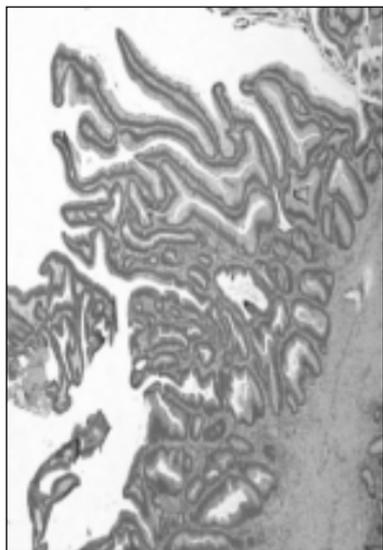
En el 70 a 80 % de los cánceres de colon se encuentran pérdidas en el cromosoma 17p, mientras que dichas pérdidas son poco frecuentes en los adenomas. Estas deleciones cromosómicas afectan al gen P53, lo que indica que las mutaciones de éste gen aparecen tardíamente en la carcinogénesis del colon (17).

La segunda vía está caracterizada por una lesión genética en los genes «ADN mismatch repair genes». Está presente en el 10 al 15 % de los cánceres esporádicos. Se caracteriza, al igual que en la vía anterior, por la acumulación de múltiples mutaciones, pero los genes afectados son diferentes y no hay una clara correlación morfológica. El suceso fundamental en ésta vía es una reparación anormal del ADN originada por una inactivación de los genes DNA mismatch repair gens. Mutaciones heredadas en estos genes son los responsables de los carcinomas de colon heredados en paciente sin poliposis. De estos genes el MMLH-1 es el que afecta de forma mas frecuente en las formas esporádicas de carcinoma de colon. La pérdida de los genes que reparan el ADN conducen a un estado hipermutable en la que los microsátélites son inestables durante la replicación del ADN y dan lugar a extensas alteraciones en estas secuencias repetitivas. La señal que indica un defecto en los DNA mismatch repair gens, es la aparición de inestabilidad en los micro-

satélites, que conducen a la acumulación de mutaciones que culminan en la aparición del cáncer colorrectal.

Aproximadamente el 50 % de los pacientes que han tenido una «cirugía curativa» por cáncer de colon fallecerán debido a una recidiva de la enfermedad. La explicación que se admite actualmente como más posible, es que en el tiempo de la cirugía, existían ya metástasis hepáticas. Una de las metas fundamentales al establecer los factores pronósticos en los pacientes que se someten a una cirugía curativa por cáncer colorrectal, son aquellos que permiten distinguir entre los pacientes que son curados y los que tienen una enfermedad residual oculta. A este ideal se consigue llegar identificando aquellos variables que tienen una influencia importante e independiente sobre la supervivencia. Los modelos pronósticos que se utilizan actualmente se basan en el grado de diferenciación de las células tumorales, en el número de ganglios linfáticos afectados, en la extensión de la invasión directa, en el carácter de los márgenes invasivos y en la presencia de un infiltrado linfocítico peritumoral (9) (Fig. 1-2).

La clasificación de Dukes fue introducida en 1928 en el St. Marcks Hospital de Londres y desde entonces se reconoce su importancia para establecer el pronóstico en el cáncer colorrectal. El estadio A, en el que se encuentran el 15 % de los cánceres operables, la infiltración tumoral se extiende a través de la muscular de la mucosa hacia la pared, pero sin ir más allá de la muscular propia y sin que se observen



FIGURAS 1 y 2.

metástasis en los ganglios linfáticos. La supervivencia a los 5 años es prácticamente del 100 %. En el estadio B de Dukes, el 35 % de los casos operados, el crecimiento invade los tejidos peri-rectales o pericólicos en continuidad, pero sin que existan metástasis ganglionares. Alrededor del 75 % de los enfermos en estadio B se curan de su enfermedad. En el estadio C, independientemente del grado de infiltración de la pared, hay metástasis en los ganglios linfáticos. En este estadio el porcentaje de supervivencia a los 5 años es inferior al 35 % y el 50 % de los enfermos operados se encuentran en este estadio (3).

Una de las líneas de investigación que estamos siguiendo en el laboratorio de Patología Molecular que dirige el Dr. Sanz Ortega, es el estudio de «Marcadores Predictores» de metástasis a distancia en el cáncer colorrectal, mediante la determinación de marcadores moleculares utilizando el método de «Tissue arrays».

La finalidad última de nuestro trabajo es, mediante el estudio de marcadores moleculares, establecer dos grupos de pacientes con cánceres de colon que se encuentran en estadio T2 N0, con un riesgo biológico diferente a desarrollar metástasis.

Hemos hecho un estudio retrospectivo de 85 cánceres de colon que se encontraban en estadio T2 N0; en 52 de estos casos no existía evidencia de metástasis tras un seguimiento entre 6 y 12 años, y 33 tenían evidencia de metástasis a lo largo de su seguimiento. Para la realización del Tissue-array se seleccionaron dos cilindros de 1 mm de diámetro procedentes del tumor y se utilizó el método estándar de nuestro laboratorio para el estudio inmunohistoquímico (Fig. 3). Seleccionamos 30 proteínas que intervienen en el ciclo celular, que son factores reguladores de la angiogénesis o del crecimiento, moléculas de adhesión o que inhiben la apoptosis y moléculas que intervienen en la reparación celular (Tabla II, 6-13-4)

En nuestros resultados observamos que una alta expresión en los tumores primarios de Survivina (> 50%), Ki67 (50 %), Topoisomerasa II (> 50%), CD K1 (> 10 %) y una baja expresión nuclear de P16 se asocian estadísticamente ($p < 0,05$) con la aparición de me-

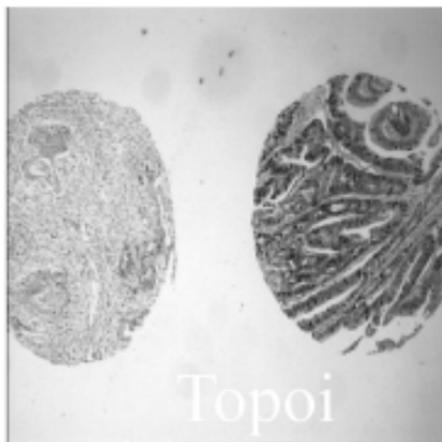


FIGURA 3.

Protein	clone	Source	Dilut	Reactiv.	Threshold	p
Ki67	MIB1	DAKO	1.100	High/low	>50%cells	0.02
Survivin	Polycl	RD sys	1.1500	High/low	>50%cells	0.05
CyclinA	6E6	Novocastra	1.100	+/-	10%cells	0.75
CyclinB1	7A9	Novocastra	1.25	+/	>10%cells	0.67
CyclinD1	DCS6	DAKO	1.100	+/	>10%cells	0.22
CyclinD3	DCS22	Novocastra	1.10	+/	>10%cells	0.57
CyclinE	13A3	Novocastra	1.10	+/	>10%cells	0.43
CDK1	1	Transd Lab	1.1500	+/	>10%cells	0.04
CDK2	8D4	Neomarker	1.500	+/	>10%cells	0.91
P53	DO7	Novocastra	1.50	High/low	>80%cells	0.27
P21	EA10	Oncogene	1.50	High/low	>50%cells	0.10
P16	POLIC	SantaCruz	1.50	High/low	>50%cells	0.01
P27	57	Transd Lab	1.1000	High/low	>50%cells	0.36
Hdm2	IF2	Oncogene	1.10	High/low	>50%cells	0.59
Rb	C3245	BD Ph.	1.250	High/low	>50%cells	0.17
Topoisomerasa II	Ki-s1	Dako	1.50	High/low	>50%cells	0.04
VEGF		BBiogenex	1.100	High/low	>80%cells	0.47
EGFr	113	Novocastra	1.25	High/low	>80%cells	0.07
HER2/neu	POLY	DAKO	1.200	High/low	>80%cells	0.91
ECadherin	4A2C7	ZYMED	1.200	High/low	>50cells	0.82
P120	98	Trand Lab	1.500	High/low	>50%cells	0.39
Bcl2	124	DAKO	1.25	High/low	>50%cells	0.43
Caspase3a	C92-	Bd PH	1.25	High/low	>50%cells	0.76
APOPTAG*		iINTERG.		+/-	>20%cells	0.14
G-Catenin	15	Transd Lab	1.1000	High/low	>50%cells	0.34
MLH1	G168	Pharming	1.100	High/low	>50%cells	0.37
MSH2	FE11	Oncogene	1.100	High/low	>50%cells	0.32
CatepsinD	DB200	DAKO	1.25	High/low	>50%cells	0.29

TABLA II.

tástasis. Por que el análisis simultáneo de estos 5 marcadores puede tener una aplicación potencial como un indicador pronóstico para determinar que pacientes que están en un estadio T2 N0 tienen un riesgo mayor de presentar metástasis en el curso de su evolución después de la cirugía y por tanto requerirán una terapia coadyuvante con quimio o radioterapia. (2-11).

BIBLIOGRAFÍA

1. BEHSEN, S.; VON KRIES, S.P.; KUHLM, *et al.*: «Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1». *Nature* 1996, 382: 638-642.
2. CHIOU, S.K.; JONES, M.K.; TARNAWSKI, A.S.: «Survivin an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond». *Med Sci Monit* 2003, 9 (4), 25-29
3. DUKES, C.: «The classification of cancer of reactivities». *S. Pathol Bacteriol* 1932, 35: 323-332.
4. FERNÁNDEZ ACEÑERO, M. J.; GALINDO, M.; SANZ, J.: «Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma». *Cancer* 2000; 196 (9): 607-12
5. FODDE, R.: «The APC gene in colorectal cancer». *European Journal of cancer*. 2002; 38: 867-871.
6. GALINDO, M.; FERNÁNDEZ ACEÑERO, M. J.; SANZ ORTEGA, J., *et al.*: «Vascular enumeration as a prognosticator for colorectal carcinoma». *Eur. J. Cancer* 2000; 36 (1): 55-60.
7. GREENLEE, R. T.; MURRAYT BOLDAS, S.; WINGO, P. A.: «Cancer statistics 2000», *Ca Cancer S. Clin* 2000; 50: 7-33.
8. HOOS, A. AND CORDON CORDO, C.: «Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations». *Lab Invest* 2001; 81(10): 1331-1338.
9. KICKEN, S. M.: «Past, present and future perspectives of colorectal cancer-on the brink of a new era?». *European Journal of cancer* 2002; 38: 855-857.
10. LIEFERS, G. S.; TOLLENAAR, R. A.: «Cancer genetics and their application to individualised medicine», *European Journal of cancer*, 2002; 38: 872-879.
11. LINF, L.S.; ZHENG, C. QM. SIN Y.; SIANG, W.G., M. A T.: «Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis». *World S Gastroenterol* 2003; 9 (5): 974-977.
12. MORSON AND DAWSON'S: *Gastrointestinal Pathology*. Blackwell Publishing 2003.
13. SANZ ORTEGA, J.: «Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer». *Histol Histopathol*. 2000; 15: 455-462.
14. SPAARKS, A.B.; MORIN, P.S.; VOGELSTEIN, B.; KINGLER, K.W.: «Mutation analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer». *Cancer Res* 1998; 58: 1130-1134.

15. THORHORST, S., *et al.*: «Tissue microarrays for rapid linking of molecular Changes to clinical end points». *Amb. S. Pathol*, 2001; 159 (6): 2249-2256.

INTERVENCIONES

Prof. Blázquez Fernández

Ante todo unas palabras de felicitación al Prof. Julián Sanz Esponera por su brillante disertación sobre un tema de gran importancia y actualidad. Con la aplicación de técnicas como la hibridación *in situ*, inmunocitoquímica, «microarrays» y otras también relacionadas con la Biología Molecular al estudio de los tumores, se está obteniendo mucha información acerca de la expresión génica de las células tumorales y de las mutaciones de los protooncogenes, genes supresores de tumores y de otros genes implicados en el ciclo y la apoptosis celulares. Dado que para que una célula llegue a ser cancerígena se necesitan al menos seis mutaciones de genes y esto requiere un período de tiempo significativo, las transiciones que experimentan estas células hasta su malignización son de gran interés para la investigación científica actual. Especialmente la transición de la polipomatosis y adenomas hasta cáncer de colon de las que nos ha hablado el Prof. Julián Sanz Esponera representan un buen modelo para la investigación de estas entidades patológicas. Por ello me gustaría conocer si han realizado estudios en esta dirección o los tienen diseñados para un futuro próximo.

Prof. Lucas Tomás

Debo decir, Prof. Sanz Esponera, que he quedado fascinado por los datos que nos ha proporcionado en esta conferencia, en relación al cáncer colo-rectal.

Especialmente, me ha llado la atención su consideración acerca de la carcinogénesis o de la etiopatogenia del carcinoma colo-rectal que nos ha presentado. Concretamente cuando demuestra con sus experiencias que el 85 % de estos tumores siguen la secuencia adenoma-carcinoma, es decir, polipo-adenocarcinoma, mientras que solamente el 15 % está en relación con la disfunción de genes reguladores de ADN.

En este grupo reducido, en el que entran en función los genes reguladores de ADN, es de interés de ver como el Gen KRAS y los ligados al cromosoma 16, como puede ser el de la P53, tienen un valor significado en este tipo de tumores.

Si me han llamado la atención sus consideraciones acerca de la etiopatogenia del carcinoma colo-rectral, me han interesado más sus comentarios acerca de la prospectiva terapéutica y especialmente con marcadores que puedan identificar la capacidad metastásica de estos tumores. También me parece muy interesante que estos marcadores de metástasis estén en relación con la P51 y la P16. Todo esto demuestra que el avance dado no sólo es en la etiopatogenia, sino también en poder programar el tratamiento específico o la carta, como ahora se dice. Es uno de los avances más interesantes en los que usted está involucrado.

Después de estas consideraciones, me gustaría poder oírle si tiene experiencia o existe alguna relación sobre la posibilidad de que suceda lo mismo en la parte proximal del tubo digestivo. Al igual de lo que pasa con el carcinoma colo-rectal, pudiera existir también en el cáncer oro-faríngeo una carcinogénesis similar. Recuérdese que en esta zona proximal del tubo digestivo también hay lesiones precancerosas. Y si la misma secuencia de la carcinogénesis que nos ha comentado en el cáncer colo-rectal pudieran darse en la zona oro-faríngea, es decir, la secuencia leucoplasia-carcinoma epidermoide.

Prof. Espinós Pérez

Me levanto para felicitar al Prof. Julián Sanz Esponera. Nos ha presentado una comunicación de alto nivel científico y de una gran trascendencia y aplicabilidad futura en el campo de la Oncología.

El Prof. Sanz, en los últimos años, nos ha expuesto varias comunicaciones sobre la moderna «morfopatología molecular». Sus trabajos, sus comunicaciones, han ido alcanzando cada vez mayor nivel, como la que hoy nos ha presentado en la Real Academia. Ha incorporado tecnología puntera, que nos llena de satisfacción a todos por ser un trabajo realizado por un Académico de nuestra Real Academia.

Nos ha comentado el largo camino de la transformación maligna de las células, pasando por distintas fases, cada vez con mayor displasia, hasta llegar al punto en el que se alcanza el estado de

irreversibilidad. Esta célula tiene todos los atributos propios de una célula maligna, que es su multiplicación, su capacidad de invasión y su capacidad de metastatización.

Es, quiero señalarlo, un mensaje de esperanza y de gran tranquilidad el reconocimiento que hace el Prof. Sanz a la aparición del cáncer en relación con determinados estilos de vida. Es evidente, por tanto, que una prevención, una mejora en la calidad del estilo de vida, como la supresión del tabaco, reducción de la ingesta de grasas, produce una reducción de la enfermedad cancerosa. Por otro lado, también nos ha puesto de manifiesto como la curabilidad del cáncer va proporcional a la rapidez en el diagnóstico, subrayando la importancia del «diagnóstico precoz» para la lucha frente a esta grave enfermedad.

Yo le quiero comentar al Prof. Sanz dos aspectos, uno, que es una pregunta, ¿cuál cree Vd. que es el papel que juega la inflamación en la determinación o en la evolución de las células hacia la célula maligna? Porque ya sabemos que la utilización de antiinflamatorios no esteroideos, tanto los anti-COX-1, como los anti COX-2 se utilizan como relativo éxito, para la prevención de la enfermedad maligna del colon aparecida sobre los pólipos del mismo. ¿Cuál es su idea sobre este aspecto?

La otra pregunta va en relación al tema importante y trascendental, que es el núcleo fundamental de su exposición de esta tarde. Si el cirujano extirpa la zona del colon afectada por el tumor, ¿por qué unos tienen metástasis al poco tiempo y otros no la tienen? Mi pregunta es: cuando el cirujano realiza la extirpación de este tipo de tumor, con estos marcadores de alta malignidad, ¿ya existen las metástasis o las metástasis aparecen posteriormente como consecuencia de reactivaciones de células de alta malignidad en el tracto digestivo?

Le felicito por esta interesantísima comunicación y por el nivel científico que ha alcanzado su grupo, entre los que quiero subrayar la presencia del Dr. Sanz Ortega.

ANGIOGÉNESIS Y VASCULOGÉNESIS CARDÍACA

ANGIOGENESIS AND HEART VASCULOGENESIS

Por el Excmo. Sr. D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO

Académico de Número

Resumen

El primer esbozo de vascularización arterial coronaria se establece en embriones humanos del estadio 14 de O'Rahilly a partir de islas endoteliales que contienen densas formaciones de eritoblastos, que no presentan conexión con la cavidad ventricular dispuestos subepicárdicos. La presencia de este primitivo plexo está en íntima dependencia con la Jalea acelular de Davies y no con el aumento y estructuración del miocardio.

Cada arteria coronaria se desarrolla a partir de dos anlagen: uno distal que los hace a partir de la red subepicárdica, y otro proximal procedente de la evaginación del endocardio de los senos Valsalva.

El período final del proceso de fusión de ambos anlagen y por consiguiente la determinación del patrón vascular coronario, queda establecido en el estadio 20 de O'Rahilly.

Abstract

The first sketch of coronary arterial vascularization settles down in human embryos of the stadium 14 of O'Rahilly starting from endothelial islands that contain dense eritoblastes formations that don't present connection with the cavity ventricular willing subepicardial. The presence of this primitive plexus is in intimate dependence with the Jelly acelular of Davies and not with the increase and structuring of the myocardium.

Each coronary artery is developed starting from two anlagen: one distal that makes it starting from the net subepicardial, and another proximal coming from the evagination of the endocardium of the breasts Valsalva.

The final period of the process of coalition of both anlagen, and consequently the coronary vascular pattern's determination, it is established in the stadium 20 of O'Rahilly.

La regulación del crecimiento vascular es en la actualidad una excitante área de la Biología del Desarrollo; el mecanismo final de la organogénesis vascular se basa en dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. Aunque la angiogénesis es para algunos considerada como determinante en el mecanismo de neovascularización, angiogénesis y vasculogénesis se encuentran integradas en el establecimiento de la vascularización cardíaca en los iniciales estadios diferenciativos del período embrionario.

En la vasculogénesis, los precursores endoteliales se integran y armonizan para formar vasos; los tejidos vascularizados por este proceso generalmente son de origen endodérmico, mientras que el proceso de angiogénesis, que en síntesis consiste en la diferenciación de brotes vasculares a partir de vasos preexistentes que vascularizan tejidos de origen ecto-mesodérmico.

La diferenciación morfológica y bioquímica del corazón acontece de modo rápido en los estadios iniciales del desarrollo. La formación de un corazón tubular es uno de los eventos más precoces de la embriogénesis en los vertebrados con la específica característica que la adquisición de la función precede a la morfogénesis completa; no obstante, el desarrollo cardíaco es el resultado conjunto de múltiples procesos fundamentales que no se pueden entender analizando un único instante determinado; por el contrario, los procesos que determinan y desarrollan la formación cardíaca, son dinámicos, secuenciales, progresivos, interrumpidos e irreversibles. Por ello, la integración e interrelación temporo-espacial de los diferentes componentes cardíacos, define la forma y función de una estructura vascular en modo especial adaptada y en gran modo dependiente en su dispositivo estructural final a específicos requerimientos dinámicos.

La «decisión» molecular en determinar células embrionarias pluripotenciales a una vía cardiogénica, se establece en el inicio de la gastrulación coincidiendo con la presencia de la línea primitiva Orts Llorca, 1963; Jiménez Collado, 1974-1976-1977; García Martínez-Schoenwolf, 1993; Austin y cols., 1994. En las aves, las células mesodérmicas con capacidad diferenciadora a células endocárdicas o miocárdicas, se localizan en la mitad rostral de la línea primitiva con identidad axial en relación del eje antero-posterior. Orts Llorca, 1964; Jiménez Collado, 1981-1986; Inagaki y cols., 1993, inmediatamente por detrás del nudo de Hensen, estructura ésta homóloga a la región dorsal del blastoporo de los anfibios y al que se le reconoce como

«centro organizador de Spemann» (Jacobson y Sater, 1988), ya que esta región o centro, así como el contacto con el endodermo, es necesario y llave constante en los mecanismos del desarrollo para dirigir células mesodérmicas en fase de gastrulación a una vía cardiogénica (Sater y Jacobson, 1990; Nascone y Mercola, 1995). En embriones de aves, cuyo abordaje analítico y experimental es fácil y regulable a la vez que presenta similitud en los estadios iniciales con gran número de vertebrados (Jiménez Collado, 1981), se ha evidenciado cómo en el estadio de línea primitiva —prolongación cefálica el nudo de Hensen libera ácido retinoico (Chen y cols., 1992), morfógeno del que se conoce su influencia sobre los patrones de formación y diferenciación (Dresh y Lile, 1993). La presencia de receptores de ácido retinoico en células mesodérmicas seleccionadas como «linaje cardiogénico» es consistente con el papel que realiza este morfógeno en dirigir o especificar mesodermo a corazón (Smith, 1994). Puesto que receptores de ácido retinoico funcionan como factores de transcripción (Gabas, 1992), es posible que la individualidad genética regule o module parte de este mecanismo aun no dilucidado de la especificación del linaje cardíaco.

Una vez establecido el tubo cardíaco, se configura un proceso morfogénico mediante el cual el miocardio definitivo se organiza (Vivagh y col., 1989; Coffe y Poole, 1991). El tubo endocárdico aparece ya envuelto por epitelio premiocárdico procedente de cada campo de fusión; el contacto y fusión de estos dos epitelios premiocárdicos se establece dorsal y ventralmente, hecho que da como resultante la formación del mesocardio dorsal y ventral, este último —mesocardio ventral— estructura transitoria de función desconocida al contrario que el mesocardio dorsal, del que en gran parte y conjuntamente con mesénquima extracardiaco dará origen al órgano preepicardio, estructura mesotelial localizada entre el esbozo hepático y seno venoso. Es a partir de este proepicardio cuando se origina y establece la vía por la que el mesénquima extracardiaco migrará sobre la superficie del tubo endo-miocárdico para formar el epicardio —futuro pericardio visceral— (Urancken Peeters y col. 1995). El mesénquima epicárdico emigrado contribuye con progenitores —endotelio y músculo liso— en la vascularización coronaria (Poelmann y col. 1993; Mikawa y Gourcier, 1995); por ello, la fusión de los campos o áreas cardíacas no sólo establece el definitivo tubo cardíaco, sino también actúa como fuente de su propio mesénquima vasculogénico.

El tubo cardíaco inflexionado y con dilataciones y estrecheces, estructuralmente aparece configurado en esta fase del desarrollo por dos láminas o formaciones concéntricas —endocardio y epimiocardio—, así como por una matriz extracelular dispuesta no regularmente entre ambas formaciones —jalea de Davies o gelatina cardíaca—, que en los niveles o segmentos aurículo-ventricular y cono-truncal aumenta en contenido. Considerada clásicamente acelular con un papel pasivo en la morfogénesis cardíaca, en la actualidad han sido aisladas alrededor de 50 proteínas en los niveles de mayor condensación mediante electroforesis bidimensional en gel (Runyan y Markwald, 1983), la mayor parte secretadas por el miocardio, lo que sugiere que la gelatina o jalea de Davies representa la membrana basal miocardia (Kitten y col., 1995), incluyéndose entre sus componentes colágenos, fibronectina, hialuronato, fibrina, proteoglicanos, factores de crecimiento. Durante estos estadios iniciales del desarrollo, la estructura del tubo cardíaco es simple, por consiguiente, la presencia de la circulación coronaria es innecesaria; no obstante, el establecimiento del sistema vascular cardíaco se realiza en un período relativamente temprano del período gestacional, caracterizado por la diferenciación de células precursoras —angioblastos—, en elementos formes y células endoteliales. La ulterior definición de tubos endocárdicos se realiza más tardíamente, observándose en la especie humana en la tercera semana, seguida o simultánea con la presencia de la jalea acelular de Davies y formación del epimiocardio.

Las células del tubo cardíaco reciben directamente su nutrición de la cavidad ventricular, cuando el miocardio inicia su trabeculización, no existe una circulación coronaria y es sólo a partir de la cuarta semana cuando los brotes vasculares aparecen constituyendo el primer esbozo de la formación vascular coronaria, proceso, no obstante, aún hoy en día no bien conocido.

Por regla general, en los vertebrados la progresiva trabeculización del miocardio da origen a un sistema sinusoidal o laberíntico (Lewis, 1904), que adquiere la capacidad de representar y establecer un sistema nutriente para los miocitos y jalea de Davies que van incorporándose al primitivo tubo endocárdico; sin embargo, este sistema sinusoidal no constituye en sentido estricto un sistema circulatorio, su estructura sólo permite la difusión de elementos sanguíneos propulsados por las cada vez más frecuentes contracciones y ritmos del miocardio. El desarrollo de canales vasculares se relaciona íntima-

mente con el incremento de la cada vez más compacta capa miocárdica.

Este concepto de sistema sinusoidal temporal seguido del establecimiento y sustitución por circulación coronaria, representa un avance en la escala filogenética, ya que, por ejemplo, en los peces se mantiene el sistema sinusoidal que es progresivamente sustituido en los anfibios, en los que ya la formación trabecular aparece mejor y más definida a nivel ventricular, aunque los vasos de Tebesius, vestigio de la circulación sinusoidal, son constantes a modo de cortocircuitos entre ambas redes vasculares.

La importancia del epicardio en el establecimiento de la microcirculación cardíaca es hoy prácticamente aceptada, habida cuenta que «brotes vasculares» o «nidios vasculares» epicárdicos constituyen la evidencia más precoz del sistema vascular coronario en el hombre y en otros vertebrados y mamíferos.

No obstante, el criterio que los capilares proceden o son formaciones tubulares originadas del endotelio endocárdico se ha mantenido tiempo (Rychter y col., 1971; Voboril, A. y col., 1969; Viragh, S. y Challice, C.E., 1981. Sin embargo, recientemente Mikawa, T., y Fischmann, D., 1992, mediante inyecciones de retrovirus han evidenciado el origen diferente de estas dos formaciones vasculares —endotelio coronario y endotelio endocárdico—, resultados idénticos a los obtenidos por Viragh, S. y col., con el empleo del anticuerpo PH₁ y (Poelmann y col., 1993), mediante el marcaje con anticuerpos en las quimeras pollo-codorniz. En embriones humanos en estadios precoces, Hirakow, R., 1983; Huchchins, G.M., 1988, describen la presencia de conglomerados o islas angioblásticas subepicárdicas a distancia y sin conexión con el lumen ventricular, dispuestas primero a nivel del ápex ventricular y en el surco interventricular y secuencialmente en el surco atrio-ventricular, observaciones éstas que coinciden in loco con la disminución e incluso desaparición de la jalea acelular en embriones humanos de 28 a 30 días.

Relativamente pocos son los estudios realizados sobre la vasculogénesis cardíaca en embriones humanos (Tandler, 1908; Yutama, 1940; Orts-Mari, 1944; Vallejo, 1967; Jiménez Collado, 1970; Sissman, 1970; Cooper y O'Rahilly, 1971; Licata, 1959-62; Conte y Pellegrini, 1984; Hirakoff, 1983; Hubchings y col., 1988, frente a la numerosa información detallada de la organogénesis cardíaca analizada de modo tanto descriptiva como experimental en otras especies de mamíferos, recogidas en síntesis en las amplias y minucio-

sas publicaciones de Cooper y O'Rahilly, 1971; Dehann y O'Rahilly, 1978.

En embriones de 5,5 mm., estadio 14 de O'Rahilly, hemos descrito la presencia constante aunque en número variable de islotes sanguíneos como estructuras aisladas e independientes sin conexión con la luz ventricular a nivel del apex ventricular, surco intraventricular y secuencialmente en el surco atrio-ventricular. Su presencia coincide con la desaparición de la jalea acelular de Davies, hecho éste que destacamos, por cuanto sólo Grover, M.; Hutchins, M. D. y Abigail Kessler-Hanna, M. D., 1988, hacen mención. En efecto, según nuestras observaciones y como consecuencia de haber establecido mediciones de las diferentes capas cardíacas y su correspondencia con el estadio del desarrollo embrionario, llegamos a las siguientes conclusiones.

<i>Estadio O'Rahilly</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Endocardio/ epicardio</i>	<i>Grosor jalea</i>	<i>Grosor miocardio</i>
10	2,5 + 0,8 mm.	98 micras	82 micras	16 micras
11	3,2 + 0,8 mm.	111 micras	89 micras	22 micras
12	3,6 + 0,7 mm.	190 micras	138 micras	52 micras
13	4,9 + 0,7 mm.	128 micras	70 micras	58 micras
14	6,5 + 0,9 mm.	63 micras	14 micras	59 micras
15	7,8 + 1,1 mm.	56 micras	0 micras	56 micras
16	9,6 + 1,5 mm.	79 micras	0 micras	79 micras
17	12,4 + 1,2 mm.	87 micras	0 micras	91 micras
18	15 + 1,5 mm.	99 micras	0 micras	99 micras

Es, pues, evidente en base a nuestras observaciones en las que si bien han sido realizadas las mediciones en tres embriones de cada estadio, existe una precisa correlación y dependencia entre la desaparición de la jalea acelular de Davies y la presencia de los brotes o islas de eritoblastos en la superficie cardíaca.

Estudios mediante microscopía electrónica confirman cómo estas islas o nidos vasculares están formados por células precursoras endoteliales —eritoblastos— (Rongish, B. J., 1994; O Brunick, M., 1972), carácter que es común en nuestros embriones de 5,5 mm., Estadio 14 de O'Rahilly.

Hemos descrito en embriones de 5,5 mm., Estadio 14 de O'Rahilly, la presencia de acúmulos subepicárdicos primero aislados y distantes, densos y sin luz, histológicamente formados por eritoblastos envueltos por una delgada y continua lámina de endotelio, es-

tán situados primero en el surco interventricular y apex que van progresivamente aumentando en número para topográficamente irse disponiendo en dos sistemas o redes, localizados uno en la porción posterior así como anterior y derecha del surco atrioventricular, surco interventricular posterior, superficie diafragmática de los ventrículos y superficie anterior y derecha del ventrículo derecho y bulbus, mientras que al otro sistema o red subepicárdica, menos numerosa y diferenciada, se sitúa en el surco interventricular anterior, pared anterior ventricular y porción anterior e izquierda del surco atrioventricular. En base a esta configuración, que interpretamos como anlage del futuro patrón arterial coronario, denominamos a la primera *red subepicárdica derecha-posterior* al considerar que a partir de ella se establecen las ramas de la arteria coronaria derecha; la segunda red subendocárdica la denominamos *red subepicárdica izquierda-anterior*, al considerar que configura el patrón de distribución de la futura arteria coronaria izquierda.

En embriones humanos de 7,5-8,9 mm., Estadio 15-17 de O'Rahilly, observamos el inicial crecimiento a partir del truncus de múltiples evaginaciones, tanto a nivel aórtico como pulmonar a nivel de las cúspides del primordio de las válvulas semilunares. En embriones de 12,5 mm., Estadio 17 de O'Rahilly, sólo dos de las evaginaciones endoteliales que crecen de las paredes derecha e izquierda aórtica, mantienen y aumentan su ritmo de crecimiento y diferenciación, conectando en embriones de 15 mm., Estadio 18 de O'Rahilly, con los brotes vasculares subepicárdico posterior derecho y anterior izquierdo para así completar el desarrollo binodal de las arterias coronarias.

Existe una observación que consideramos no había sido antes lo suficientemente comentada y es que el mecanismo o proceso de conexión aorta-red vascular subepicárdica, se realiza y establece específicamente en un determinado estadio. En efecto, los embriones de 12 mm., estadio 17 de O'Rahilly, no mostraron evidencia alguna de crecimiento endotelial y, por tanto, contacto de la red subepicárdica prearterial coronaria con aorta; sin embargo, en embriones de 13,5 mm., Estadio 18 de O'Rahilly, asistimos por vez primera siempre y de modo constante al origen selectivo de las evaginaciones de los senos de Valsalva y su aproximación/conexión con el plexo coronario subepicárdico.

No hemos observado fases intermedias en la formación de esta interconexión; existía o no existía conexión, pero no fase puente. Por

tanto, el mecanismo íntimo como la naturaleza anatómica del establecimiento de este proceso permanece aún incierta y especulativa.

INTERVENCIÓN DEL PROF. ESPINÓS PÉREZ

El Prof. Jiménez Collado nos ha expuesto una brillantísima y además bonita comunicación. La iconografía presentada, toda obtenida por él y por su grupo de investigación es realmente excepcional. Le felicito por esto y por los conceptos que nos ha desarrollado.

Después de oír esta comunicación yo no puedo dejar de señalar la *milagrosamente maravillosa organogénesis* que hace que los seres, y concretamente el hombre, se vaya desarrollando a partir de una sola célula fecundada, unión del óvulo y del espermatozoide.

Ha centrado su exposición en el tema de la angiogénesis y vasculogénesis. Yo quiero preguntarle si el concepto y la base de la angiogénesis, tal como lo ha expuesto, referida al miocardio y las ramas coronarias depende fundamentalmente de la multiplicación de las células endoteliales. ¿Son los factores estimulantes de la multiplicación endotelial los principales responsables de la aparición de la red vascular coronaria? Porque, indudablemente, tal como nos lo ha presentado, las células endoteliales, con esa envoltura que poco a poco va apareciendo de fibroblastos, son las que van a modular la estructura vascular coronaria, ¿qué factores son los responsables de este crecimiento y multiplicación endotelial? Le hago esta pregunta porque actualmente, en el campo de la moderna terapia oncológica, está, cada vez, adquiriendo mayor auge la terapia antiangiogénica, por el bloqueo de la formación de nuevos vasos como consecuencia de suprimir la acción de los factores estimulantes de las células endoteliales. En teoría esta terapia, que es totalmente diferente a la destructiva —citolítica— de la quimioterapia, es muy prometedora. Esperemos que pronto pueda llevarse a la práctica, ya que al impedir la formación de neovasos en el tumor conduce a la necrosis del mismo.

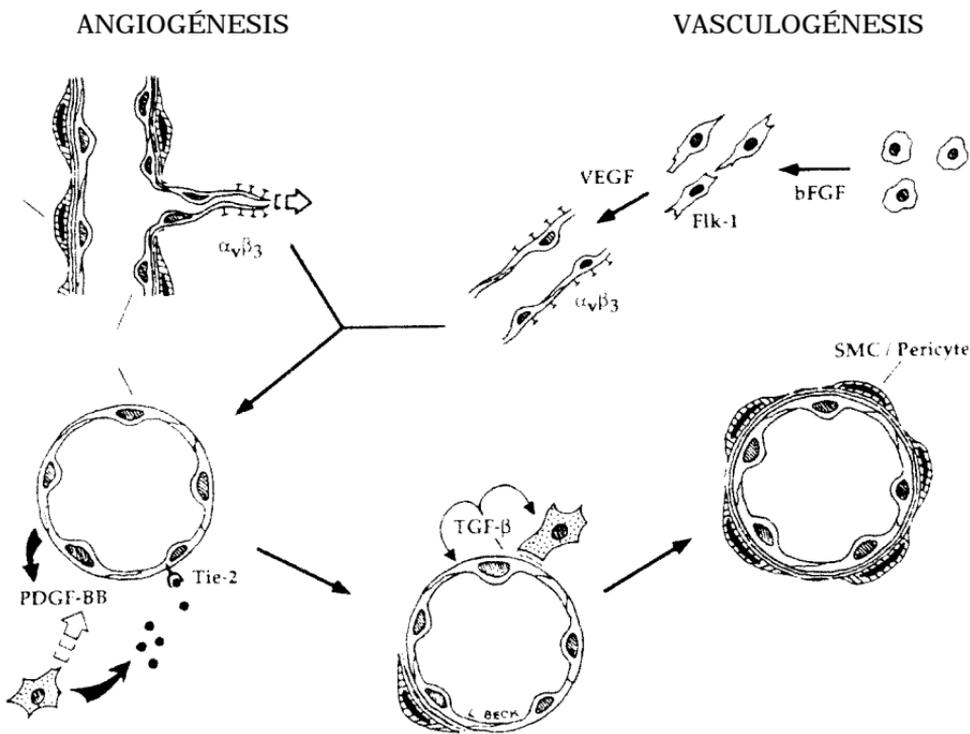
Le felicito nuevamente por esta espléndida y bonita comunicación.

CONTESTACIÓN DEL PROF. JIMÉNEZ COLLADO

Es un hecho constatado que el crecimiento y metastización de gran número de tumores depende de la formación de nuevos vasos y también es sabido que la mayoría de los tumores persisten mudos en el sentido de Cao y O'Reilly 1998 en un estado vascular quiescente, fase que se altera al producirse por factores moleculares no definidos, Folkman 1995, el desequilibrio entre reguladores positivos y negativos de la angiogénesis.

Hoy en día conocemos, apoyados fundamentalmente en las experiencias inmunohistoquímicas de Tomanek y colaboradores, 1996, 1999; Litlaung y Suvasrna 1999, Hoy Ravatska 2001, cómo una específica «célula progenitora» puede diferenciarse a musculatura lisa o célula endotelial según el factor de crecimiento que en su momento actúe, ya que en respuesta a PDGPF-PB se diferencia a musculatura lisa y pericitos, mientras que en presencia de VEGF lo hace a célula endotelial.

No obstante lo anterior y a nuestra aportación en esta línea de trabajo 1997-1999 que en síntesis hemos reflejado en este esquema,



el tema que hoy hemos traído es la determinación de cuatro estadios morfodiferenciativos con caracteres específicos en la organogénesis y diferenciación de las arterias coronarias, teniendo siempre en cuenta que todos y cada uno de estas fases o períodos no son estadios cerrados si por tal consideramos que en ellos se establecen únicamente los hechos a describir; por el contrario, al ser eslabones de una cadena biológica cuya finalidad es estructurar el patrón arterial coronario, necesariamente han de existir caracteres y procesos comunes e integrados.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

Importantes las dos conferencias de hoy, de las que hacen reflexionar profundamente en los conocimientos que uno tiene o ha adquirido. Felicidades a ambos comunicantes.

En primer lugar al Prof. Sanz Esponera que, siguiendo una línea que lleva hace años, y ha presentado aquí alguno de sus importantes trabajos, se introduce en los aspectos importantes de la biología molecular, incluso haciendo participar en ese importante problema de factores proteínicos, de receptores, de la conexión de ello con el genoma, con los genes, con aquellos elementos supresores y activadores que mantienen el crecimiento vascular. El cáncer colorrectal, como otros tumores malignos, constituyen los puntos esenciales de investigación mundial actual de muchas escuelas. Para explicar lo que hasta hace no muchos años para algunos grandes autores se negaba o se discutía, relación pólipo-adenoma-cáncer colorrectal, había magníficos tratados donde eso se discutía severamente; otras personas creían que había una secuencia fundamentada en lo que era la observación histológica, histopatológica, etc...

He leído comunicaciones múltiples sobre antiinflamatorios en relación con estos procesos; por ejemplo, la pentoxifilina, potente antiinflamatorio, tiene mucho que ver en las cuestiones experimentales que he podido leer en factores multietiológicos existen en todo carcinoma, y como incluso los antiinflamatorios tienen que ver en un sentido o en otro sobre la secuencia genoma-genes supresores-genes activadores.

Le felicito por su comunicación interesantísima y fundamentada en un trabajo experimental, de investigación de gran importan-

cia. Es, una vez más, motivo de felicitar al Prof. Sanz Esponera por esta importante actividad.

Si la reflexión de esta ponencia ha sido importante para todos nosotros, no lo es menos la que ha presentado nuestro Secretario, el Prof. Jiménez Collado.

Llegar al recuerdo que teníamos de aquella anatomía que estudiamos con intensidad y entrever en esas magníficas proyecciones con que nos ha ilustrado la influencia de la vasculogénesis, de la angiogénesis, de la génesis vascular y el porqué se hace eso; ésa es la gran pregunta que todos tenemos en nuestra cabeza. El endotelio y el sistema mesenquimal son los que están actuando para la angiogénesis y el desarrollo de las cavidades cardíacas, el desarrollo de las coronarias, que nutre y constituye la base central del mantenimiento y desarrollo de las estructuras cardíacas; por qué mecanismo, qué sustancias son las activadoras permanentes de ese proceso que lleva al final a la constitución maravillosa del corazón, de los vasos de irrigación coronaria, etc...

Confieso que ha sido difícil, por lo menos para mí, el seguir esa explicación, buscando los nexos de conexión entre lo que indicaba el Prof. Jiménez Collado y lo que consideramos en el adulto lo que es la importancia y relación de la circulación coronaria y mantenimiento de la fibra cardíaca.

Gracias a los dos ponentes. Las conferencias han sido extraordinarias. Mi felicitación más sincera a ambos.

Se levanta la sesión.