

# Efecto del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) sobre perforaciones timpánicas en ratas Long-Evans

## Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on tympanic perforations in Long-Evans rats

Jorge Zúñiga P<sup>1,2</sup>, Juan Cristóbal Maass O<sup>1</sup>, Christian Arriagada A<sup>2</sup>.

### RESUMEN

**Introducción:** La angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos desde una red vascular existente, contempla una secuencia de eventos complejos y es fundamental en el proceso reparativo. Existen múltiples factores estimulantes de la angiogénesis, entre ellos se encuentran factores de crecimiento como el VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular). Debido a su rol reparativo se han utilizado factores proangiogénicos para reparar perforaciones timpánicas.

**Objetivo:** Estudiar el efecto del VEGF sobre perforaciones timpánicas de ratas Long-Evans.

**Material y método:** Se usan 15 ratas adultas, se realizan perforaciones timpánicas bilaterales, se instilan al azar las perforaciones con solución fisiológica y VEGF, se realiza visualización microscópica de los tímpanos a los días 9, 15 y 21 posperforación. Las ratas son sacrificadas el día 21 y se realiza estudio histológico del grosor timpánico.

**Resultados:** No se aprecia un efecto inductivo del VEGF sobre el cierre de las perforaciones timpánicas, se produce un aumento en el grosor timpánico de las ratas tratadas con VEGF.

**Palabras clave:** Angiogénesis, perforaciones timpánicas, VEGF.

### ABSTRACT

**Background:** Angiogenesis is the development of new blood vessels from a pre-existing vascular network. It involves a sequence of complex events, and it is essential for reparative processes. There are multiple angiogenesis stimulating factors, among which are several growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF). Because of their role in reparative processes, proangiogenic factors have been used to repair tympanic perforations.

**Aim:** To assess the effect of VEGF on tympanic perforations of Long-Evans rats.

**Methods:** Fifteen (15) adult rats were used in this study. Tympanic perforations, carried out bilaterally, were randomly instilled with either saline or VEGF, and the tympanic membranes were visualized under a dissecting microscope at 9, 15 and 21 days postperforation. Animals were sacrificed on day 21, and the tympanic width was histologically studied.

**Results:** There was no inductive effect of VEGF on the healing of tympanic perforations. There was an increase in tympanic membrane width in rats treated with VEGF.

**Key words:** Angiogenesis, tympanic perforations, VEGF.

<sup>1</sup>Médico del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

## INTRODUCCIÓN

La angiogénesis consiste en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos desde una red vascular previamente existente, este fenómeno contempla una secuencia de eventos complejos y es fundamental tanto en procesos fisiológicos como patológicos<sup>1,2</sup>.

Entre los primeros podemos citar el crecimiento normal de los tejidos en el desarrollo embrionario, la reparación de las heridas y los cambios endometriales durante el ciclo menstrual.

En el proceso de angiogénesis participan activamente las células endoteliales, ellas migran, proliferan y se ensamblan con firmeza para luego contener la sangre<sup>3</sup>. Normalmente las células endoteliales maduras no se multiplican, constituyendo una población estable que se encuentran en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (o fase de reposo)<sup>4</sup>, pero pueden entrar en el ciclo si se requieren capilares de neoformación durante los procesos de reparación fisiológicos.

En los últimos años se han identificado múltiples factores estimulantes de la angiogénesis<sup>5</sup>, éstos pueden dividirse en tres grupos: el primero formado por factores solubles como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEFG)<sup>6</sup>, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)<sup>7</sup>, y el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), los cuales afectan el crecimiento y diferenciación de la célula endotelial<sup>8,9</sup>; el segundo grupo de factores inhibe la proliferación e incrementa la diferenciación de las células endoteliales, entre ellos están la angiogenina<sup>5</sup>, los factores de crecimiento transformantes (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ )<sup>10-12</sup>; el tercer grupo comprende a citoquinas extracelulares que se unen a la matriz y se relacionan con la proteólisis y contribuyen a la regulación de la angiogénesis<sup>13-15</sup>.

Las perforaciones de la membrana timpánica pueden ser cerradas en los pacientes, utilizando una amplia variedad de materiales, tales como: fascia, grasa, tejido conectivo, papel de arroz y gelfoam.

El tratamiento conservador (no quirúrgico) es especialmente efectivo cuando la perforación es pequeña, reciente y seca.

Algunas veces los tratamientos fallan por una actividad regenerativa disminuida en el margen de la perforación (otitis media crónica)<sup>16</sup>.

El mecanismo de reparación de las perforaciones timpánicas no difiere en rasgos generales de la de otros tejidos y existen estudios que muestran una expresión aumentada de factores proangiogénicos implicados en ella<sup>17</sup>.

En los últimos años, de acuerdo al importante avance en el estudio de los factores de crecimiento y su utilización en el manejo de diversas patologías, han aparecido estudios para cerrar perforaciones timpánicas utilizando factores proangiogénicos.

Se han utilizado con éxito el FGFb, FGFa, EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF $\alpha$ , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), etc<sup>18-23</sup>.

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) es uno de los factores proangiogénicos más importantes, el cual estimula el crecimiento y quimiotaxis de células endoteliales durante la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*<sup>6</sup>.

Debido a la investigación que se está realizando en torno al tema nos parece relevante estudiar el efecto que tendría el VEGF sobre un modelo experimental de perforaciones timpánicas realizadas en ratas Long-Evans.

## MATERIAL Y MÉTODO

Nuestro protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética sobre Investigación en animales dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se usaron 15 ratas Long-Evans adultas, sanas, de aproximadamente 300 grs. Las ratas se mantuvieron en un ambiente adecuado con ciclo artificial de noche-día, alimentadas *ad libitum* con alimento especial para roedores, siendo mantenidas en el vivero del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM).

Del total de 30 oídos, se descartaron 11 por presentar alteraciones preexistentes en la membrana timpánica, tales como otitis media aguda, otitis media por efusión u otitis crónica fibroadhesiva.

Para realizar el procedimiento, las ratas fueron anestesiadas con ketamina 40 mg/kg intraperi-

toneal asociada a xylazina 5 mg/kg. Bajo visión microscópica y utilizando un miringótomo, se realizó una perforación timpánica bilateral de aproximadamente 30% a 40% de la superficie total de la membrana timpánica. Se reavivaron los bordes con ácido tricloroacético.

Al tercer día posterior a la perforación se instilaron en las perforaciones de los oídos al azar con 0,3 ml de VEGF en una concentración de 200 ng/ml (10 tímpanos) o con 0,3 ml de solución fisiológica (9 tímpanos). Se realizaron instilaciones sucesivas los días 3, 9 y 15 posterior a la perforación.

Se hizo un seguimiento microscópico de los tímpanos los días 9, 15 y 21 posterior a la perforación.

El día 21 se sacrificaron las ratas, resecándose sus tímpanos. Estos fueron procesados con técnicas clásicas para estudio histológico (Hematoxilina-Eosina).

Se analizó el grosor de las neomembranas formadas, se utilizó para tal efecto microscopía óptica con aumento 40x, empleando un retículo de 0,5 cm<sup>2</sup> dividido en 10 (2.250 μm<sup>2</sup>).

Para comparar estadísticamente el cierre de tímpanos tratados versus los no tratados se realizó el Test Exacto de Fisher, y para evaluar la significación estadística de las diferencias en el grosor de la membrana timpánica se utilizó el Test de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

Once oídos se descartaron por presentar alteraciones timpánicas preexistentes.

Al realizar el análisis microscópico el día 9 se encontró que la totalidad de las perforaciones tratadas con VEGF no estaban cerradas, y una de las nueve no tratadas se encontró cerrada (no significativo  $p=0,47$ ).

El día 15, cinco perforaciones tratadas se encontraron cerradas, y seis de las no tratadas se encontraban en la misma situación (no significativo  $p=0,64$ ).

El día 21, nueve de las diez ratas tratadas tenían cerrada la perforación, y la totalidad de las ratas no tratadas se encontraron cerradas (no significativo  $p=0,52$ ) (Tabla 1).

Al examen histológico no encontramos diferencias en la reparación de los tímpanos tratados y no tratados, salvo un aumento del grosor de los tímpanos tratados (Figuras 1 y 2).

El grosor promedio de los tímpanos no tratados fue de 25,6875 ±14,582 μm, y el de los tímpanos tratados con VEGF fue de 38,478 ±22,49 μm ( $p$  value <0,0001) (Figura 3).

## DISCUSIÓN

El VEGF aparentemente no tiene un efecto inductor de la reparación de perforaciones timpánicas en ratas Long-Evans, su efecto no se diferenció claramente de las ratas no tratadas (solución fisiológica). Esto podría deberse a que el VEGF no es el factor más importante en la reparación timpánica, rol que si podría ser atribuido al EGF (factor de crecimiento epidérmico)<sup>19,21</sup>.

Tabla 1

|        |             | Con VEGF | Sin VEGF | Test Exacto de Fisher |
|--------|-------------|----------|----------|-----------------------|
| Día 9  | Cerradas    | 0        | 1        | $p=0,47$              |
|        | No cerradas | 10       | 8        | No significativo      |
| Día 15 | Cerradas    | 5        | 6        | $p=0,64$              |
|        | No cerradas | 5        | 3        | No significativo      |
| Día 21 | Cerradas    | 9        | 9        | $p=0,52$              |
|        | No cerradas | 1        | 0        | No significativo      |

Visualización microscópica de los tímpanos a los días 9, 15 y 21 posteriores a la perforación.

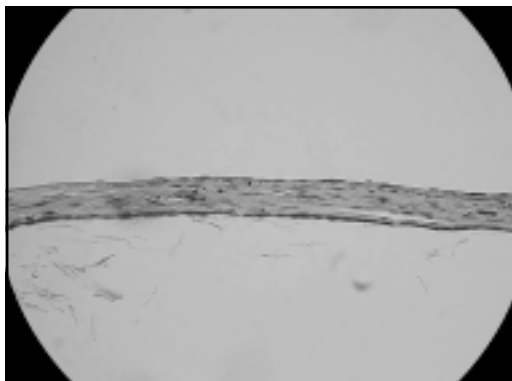


Figura 1. Tímpano no tratado, reseado al día 21. Aumento 40X.

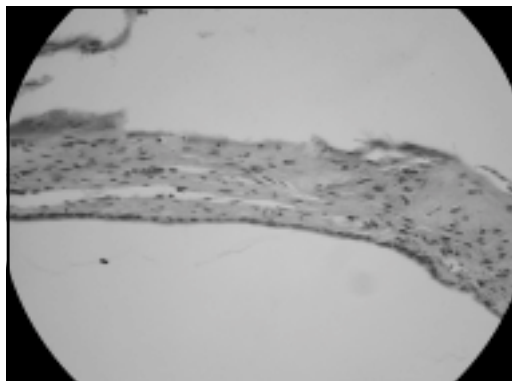


Figura 2. Tímpano tratado con VEGF, reseado el día 21. Aumento 40X.

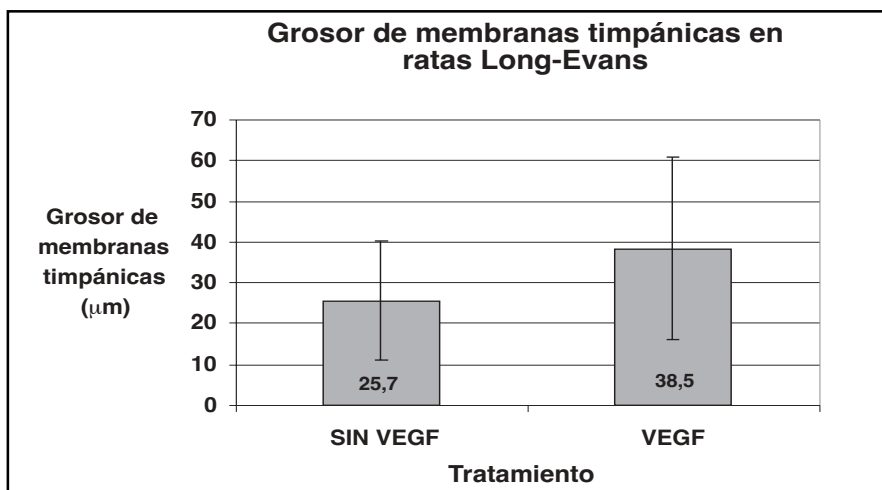


Figura 3. Gráfico que muestra el grosor promedio de las ratas no tratadas v/s las ratas tratadas con VEGF.

Ahora, nuestro modelo experimental presentaba perforaciones de 40% de la membrana timpánica, perforaciones que pueden ser consideradas traumáticas (no crónicas) y esto puede haber influenciado un cierre rápido y total de ambos grupos de experimentación.

Sería interesante adecuar el modelo experimental para reproducir una otitis media crónica y así obtener resultados más cercanos a esta patología.

El rol del VEGF es importante en procesos fisiopatológicos, como la formación del colestea-

toma<sup>24,25</sup>, sin embargo, no hubo desarrollo de ésta patología en los oídos tratados con VEGF.

El VEGF parece producir un engrosamiento significativo de la membrana timpánica durante el fenómeno reparativo, probablemente esto se deba al aumento de vasos sanguíneos en la capa media del tímpano, o por un aumento de la permeabilidad capilar con la consiguiente extravasación de proteínas y producción de edema de la capa media.

Pendiente se encuentra la realización de un estudio inmunohistoquímico para cuantificar la angiogénesis y validar nuestros resultados.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Concurso Anual de Investigación Sociedad de Otorrinolaringología, Medicina y Cirugía de Cabeza y Cuello 2003.

Nuestros agradecimientos al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y al Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por el apoyo constante a la investigación.

### BIBLIOGRAFÍA

1. PLUDA J. Tumor associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24: 203-18.
2. MALONNE H, LANGER I, KISS R, ATASSI G. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutics implications : angiogenic inhibitors. *Clinical & Exp Metast* 1999; 17: 1-14.
3. BREIER G. Angiogenesis in embryonic development-A Review. *Placenta 21, supplement A, Trophoblast Research* 2000; 14: S11-S15.
4. DANEKAMP J. Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metast Rev* 1990; 3: 267.
5. FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931.
6. FERRARA N, DAVIS-SMITH T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
7. SCHWEIGERER L, NEUFELD G, FRIEDMAN J, ABRAHAM JA, FIDDES JC, GOSPODAROWICZ D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 1987; 325: 257.
8. BURGESS W, MACAIG T. The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575-606.
9. CONN G, BAYNE M, SODERMAN D, KWOK P, SULLIVAN K, PALISI T, HOPE D, THOMAS K. Aminoacid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2628-32.
10. SCHREIBER AB, WINKLER ME, AND DERYNCK R. Transforming growth factor-a: A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 232: 1250-3.
11. ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK, SMITH JM, ROCHE NS, WAKEFIELD LM, HEINE UI, LIOTTA LA, FALANGA V, KEHRL JH AND FAUCI AS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-71.
12. PEPPER M, BELIN D, MONTESANO R, ORCI L, VASSALI J. Transforming growth factor b modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cell *in vitro*. *J Cell Biol* 1999; 111: 743-55.
13. FOLKMAN J, INGBER DE. Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 1987; 206: 374.
14. FOLKMAN J, INGBER DE. Inhibitors of angiogenesis: Angiostatic steroids. In: *Angiogenesis Current Commun*. Cold Spring Harbor 1987; pp: 95.
15. MEININGER CJ, ZETTER BR. Mast cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 73-9.
16. HELLSTROM S, SPRATLEY J, ERIKSSON PO, PAIS-CLEMENTE M. Tympanic membrane vessel revisited: a study in an animal model. *Otol Neurotol* 2003; 24(3): 494-9.
17. HOM DB. Growth factors and wound healing in otolaryngology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110: 560-4.
18. KATO M, JACKLER R. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115: 538-47.
19. RAMSAY H, HEIKKONEN E, LAURILA P. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: A clinical trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 113: 375-9.
20. GOLDMAN S, SIEGFRIED J, SCOLERI P, AYDOGEN LB, CASS S. The effect of acidic fibroblast growth factor and live yeast cell derivative on tympanic membrane regeneration in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117: 616-21.
21. GUNERI EA, YILMAZ O, OZKARA E, ERDAG TK, IKIZ AO, SARIOGLU S, GUNERI A. The effects of hyaluronic Acid, epidermal growth factor, and

- mitomicyn in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003; 24(3): 371-6.
22. MA Y, ZHAO H, ZHOU X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(6): 586-99.
23. ISHIMOTO S, ISHIBASHI T, BOTTARO DP, KAGA K. Direct application of keratinocyte growth factor, basic fibroblastic growth factor and transforming growth factor-alpha during healing of tympanic membrane perforation in glucocorticoid-treated rats. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5): 468-73.
24. NAIM R, RIEDEL F, HORMANN K. Expression of vascular endothelial growth factor in external auditory canal cholesteatoma. *Int J Mol Med* 2003; 11(5): 555-8.
25. NAIM R, SADICK H AND HOERMANN K. HGF/SF induces VEGF in human external auditory canal cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131(2): 99.