

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



## TESIS

*Programa de Anatomía y Biología del desarrollo.*

Nombre de la tesis **“Estudio de la angiogénesis inducida por líquido cerebro espinal proveniente de gliomas en membrana alantocoriónica de pollo y su correlación con niveles de VEGF”**

**Alumno: René Letelier Farías**

**Directores: Dr. David Lemus A. Dra. Mariana Sinning O.**



Contenido	
Resumen .....	4
Introducción: .....	6
Angiogénesis y cáncer.....	9
Angiogénesis y Gliomas.....	13
Terapias antiangiogénicas .....	18
Modelos de estudio de angiogénesis .....	21
Hipótesis:.....	24
Materiales y Métodos: .....	27
Obtención de Muestras de Líquido Cerebro Espinal .....	27
Preparación de la membrana alantocoriónica (MAC) .....	29
Instalación de los filtros en la MAC con la sustancia de prueba. ....	30
Muestras para microscopía de luz .....	31
Uso anticuerpos Anti-VEGF .....	32
Conteo de vasos sanguíneos. ....	33
Análisis estadístico y correlación clínico-patológica.....	34
Resultados .....	36
Evaluación de la Angiogénesis según tipo histológico y grado de malignidad .....	39
Resultados de la influencia del tratamiento previo en el grado de angiogénesis inducida .....	41
Resultados del uso de anticuerpos Anti-VEGF en la angiogénesis inducida por LCE de pacientes con glioma.....	44
Discusión de los resultados .....	47
Mecanismos de recidiva tumoral y evasión de las terapias antiangiogénicas.....	53
Mecanismos indiferentes a terapias antiangiogénicas .....	54
Referencias: .....	57
Anexos.....	68

## Resumen

La angiogénesis es un proceso que permite el desarrollo de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Este proceso está implicado tanto en la reparación de heridas, como en procesos patológicos como el cáncer. Es fundamental en la biología tumoral, tanto para el crecimiento como para el desarrollo de la capacidad invasiva de los tumores, en especial en la formación de los gliomas.

Los gliomas son un tipo de tumor primario del sistema nervioso central que se organiza con diferentes grados de malignidad. Entre las características anatomopatológicas de malignidad de los gliomas está el grado de angiogénesis que desarrollan, medido por la proliferación de los vasos presentes en el tumor.

La angiogénesis esta altamente regulada por factores pro y anti angiogénicos, balance que se pierde en la biología tumoral mediante la estimulación por parte de las células tumorales de las vías proangiogénicas. Dentro de estos factores proangiogénicos se incluyen múltiples familias de citoquinas, siendo el más estudiado el “vascular endothelial growth factor” (VEGF), el cual se encuentra en concentraciones muy elevadas, por sobre los niveles fisiológicos, durante la angiogénesis tumoral.

La evaluación inmunohistoquímica de los gliomas ha mostrado una alta presencia de VEGF en el tejido tumoral y dentro del líquido de los quistes que forman algunos gliomas. Además el uso en otras patologías del VEGF como un marcador nos lleva a postular que el liquido cerebro espinal (LCE) proveniente de pacientes con gliomas presentaría una gran capacidad angiogénica mediada por este.

Esto se realizó en un modelo *in vivo* de angiogénesis, la membrana alantocoriónica (MAC) de pollo. Donde se relacionó la capacidad angiogénica del

LCE proveniente de pacientes con patología tumoral con la presencia de VEGF en el LCE.

En la evaluación del grado de angiogénesis inducida por LCE en MAC se observó que efectivamente el LCE proveniente de pacientes con glioma era capaz de aumentar la proliferación de vasos en la MAC de pollo a diferencia de los pacientes sin patología tumoral.

Por otra parte no se observó diferencias en el grado de angiogénesis inducida por el LCE obtenido peritumoral, del obtenido por punción lumbar. Existiendo solo ligeras diferencias en las respuestas angiogénicas según tipo histológico y terapias recibidas previamente.

Además se evaluó si el VEGF era el principal promotor de la angiogénesis inducida por el LCE. Para ello se usó anticuerpos Anti-VEGF en conjunto con el LCE, lo que produjo una disminución de la proliferación de vasos en algunas MAC de pollo, siendo esta significativa solo en aquel LCE con mayor índice angiogénico y no presentó efecto en el LCE no tumoral.. Por lo que el VEGF no sería el único factor proangiogénico del desarrollo de vasos inducido por el LCE tumoral

El establecimiento de esta capacidad angiogénica del LCE proveniente de gliomas y su relación con el VEGF, busca profundizar en la búsqueda de biomarcadores que permitan realizar seguimientos de respuesta a tratamiento o como marcador de actividad tumoral en pacientes con gliomas.

## Introducción:

La investigación en torno al cáncer ha variado en los últimos años, buscando nuevas terapias contra las células tumorales mediante la comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la génesis y en el desarrollo tumoral.

La propuesta de esta tesis consiste en evaluar si el líquido cerebroespinal (LCE) de paciente portadores de gliomas presenta factores angiogénicos liberados por estos tumores con el potencial de obtener en un futuro, marcadores diagnósticos o pronósticos de biología tumoral a través del estudio de este.

Los **“*Tumores malignos*”** ocupan el segundo lugar como causa de muerte en Chile, presentando un aumento desde un 17,3% a un 24,2% del total de muertes en el país entre los años 1993 y 2008 respectivamente (estadísticas INE). En el 2005 los tumores de encéfalo fueron cerca de 1,5% del total de defunciones del país.<sup>20</sup>

En Chile, solo existen aproximaciones sobre la incidencia de tumores cerebrales y el seguimiento de estos casos es muy variado. Sólo un porcentaje muy bajo de ellos puede completar un tratamiento adecuado con radioterapia y quimioterapia. Las estimaciones de incidencia de la OMS para las neoplasias de Sistema Nervioso en Chile son de 2,3 casos por 100.000 habitantes (GLOBOCAN, estimaciones de incidencia de cáncer de la OMS) (ver anexo 1), siendo ligeramente mayor en hombres de 2,7 casos por cada 100.000 habitantes que en

las mujeres con una estimación de 1,9 casos por cada 100.000 habitantes. Existe una falta de centros especializados en neuropatología en nuestro país por lo que las aproximaciones en la frecuencia de los mismos provienen de los registros de diagnóstico anatomopatológico. Las tasas de mortalidad dada por este tipo de tumores malignos se estiman en 1,9 casos por 100.000 habitantes para Chile (ver anexo 1), siendo de nuevo ligeramente mayor en hombres de un 2,3 versus 1,6 casos en mujeres por cada 100.000 habitantes <sup>21</sup>

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) son derivados de células neuroepiteliales, los cuales difieren entre ellos en su comportamiento biológico y en la respuesta a tratamientos. Con el fin de acotar este estudio se evaluarán solo los tumores derivados de células gliales: los gliomas.

Los gliomas se clasifican según su célula de origen y según el grado de malignidad que presentan (la clasificación de malignidad de la OMS establece los grados I, II, III y IV). Según su célula de origen se distinguen principalmente: los **astrocitomas**, que son el grupo más frecuente e incluyen el astrocitoma pilocítico (OMS grado I), astrocitoma fibrilar (OMS grado II), astrocitoma anaplásico (OMS grado III) y el glioblastoma multiforme (OMS grado IV); los **oligodendrogliomas** que representan un 5% de los tumores gliales, que incluyen el oligodendroglioma (OMS grado II) y el oligodendroglioma anaplásico (OMS grado III) y que pueden presentarse también mezclados con células astrocíticas, dando origen a los oligoastrocitomas, que incluyen el oligoastrocitoma (OMS grado II) y oligoastrocitoma anaplásico (OMS grado III); los **ependimomas**, que también

representan un 5% de los tumores gliales; una variedad más escasa que son los **tumores de plexo coroideo** y un conjunto de tumores de origen glial mixto con células ganglionares, los **Gangliogliomas**. Existen a su vez una serie de variedades de menor frecuencia que incluyen tumores de células de origen embrionario y tumores de la región pineal <sup>38, 39</sup>(Ver Anexo 2).

Con el término genérico de "glioma maligno" se incluyen los tumores grado III y IV los que corresponden a: el glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma anaplásico (AA) y el oligodendroglioma anaplásico (OA). Estos tumores tienen en común: su origen glial, una localización predominante supratentorial, la alta capacidad de infiltrar el tejido cerebral circundante y un mal pronóstico. El término de "maligno", en el caso de los tumores de SNC tienen un significado distinto a los tumores de otras localizaciones, pues estos no suelen producir metástasis fuera del sistema nervioso central, pero si presentan un peor pronóstico.

El GBM es el tumor más frecuente y el más agresivo. Mientras que el AA y OA suelen aparecer en edades más tempranas que el GBM, normalmente en menores de 50 años, y tener una sobrevida media entre 2 a 5 años. Los pacientes con diagnóstico de GBM presentan una sobrevida que alcanza en promedio los 15 meses con el uso de radioquimioterapia y el uso de temozolamida como terapia adyuvante (Stupp R, Mason) <sup>1,2,21,22</sup>



## Angiogénesis y cáncer

En un momento inicial del desarrollo tumoral ocurre un desbalance de oncogenes y de genes supresores de tumor lo que lleva a una proliferación excesiva y desregulada de células. Estos tumores sólidos van a crecer hasta conformar una estructura que asemeja a un “órgano” de manera que va a estar compuesto de células cancerígenas, células estromales, células inmunes, y vasos linfáticos y sanguíneos incluidos dentro de una matriz de tejido extracelular<sup>50, 51</sup>. Para lograr y mantener el desarrollo tumoral requieren inducir la proliferación de vasos que permitan nutrir las células tumorales, este proceso fundamental en la biología tumoral se denomina **angiogénesis**.

La angiogénesis es principalmente un proceso fisiológico que induce la formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Es un proceso muy activo durante el periodo embrionario y en la reparación de heridas, sin embargo se encuentra presente también en patologías como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y el cáncer.<sup>3,4,23,24</sup>

La regulación de este proceso está dado por un delicado balance entre factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos. En condiciones fisiológicas se induce la angiogénesis aumentando los factores proangiogénicos por cortos períodos de tiempo. Esto permite fenómenos como la cicatrización y la reparación de tejidos, para luego ser suprimida mediante el aumento de factores antiangiogénicos.<sup>3, 5</sup>

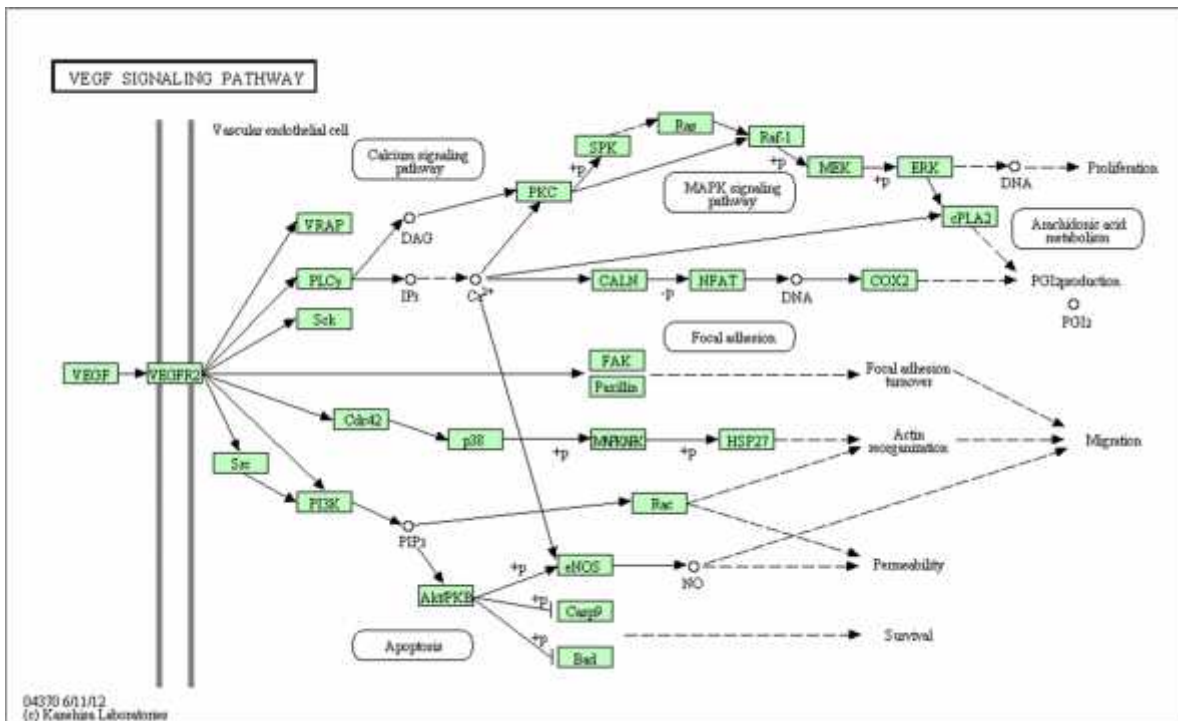
Las células tumorales deben inducir este proceso de angiogénesis para mantener el crecimiento tumoral y la viabilidad de las metástasis. Este hecho fue demostrado por Folkman en 1971, al determinar que los tumores no son capaces de crecer más allá de 3 mm si no provocan la proliferación de vasos.<sup>23</sup>

La angiogénesis es una serie de procesos celulares que culminan con el desarrollo de vasos, pero que se inician con la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos, la proliferación de células endoteliales y el reclutamiento de células circulantes para la formación de estos vasos. Estas células migran mientras proliferan hacia la zona de inducción de angiogénesis; luego se tubulizan y restituyen la membrana basal para restablecer nuevamente el flujo sanguíneo.<sup>6, 7, 8, 9</sup>

Dentro de los factores proangiogénicos más estudiados se incluyen una serie de factores de crecimiento, donde encontramos la familia del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Angiopoyetinas, Factores de Crecimiento Transformante (TGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- ), Interleukinas y varios miembros de la familia del Factor del Crecimiento del Fibroblástico (FGF).<sup>7, 8,9</sup> Además muchos otros factores que controlan e influyen la angiogénesis, incluyendo factores solubles del crecimiento, proteínas relacionadas a membrana, interacciones célula-membrana basal e interacciones célula-célula. Entre estos sistemas de interacción celular, un ejemplo importante son las interacciones Notch, las cuales actúan como un factor

supresor del proceso angiogénico (ver anexo 5 con una tabla de factores pro y antiangiogénicos). 7, 36, 51, 52

Aun más, dentro de los factores proangiogénicos, el VEGF no solo es capaz de inducir la formación de nuevos vasos, sino que además va a participar en otros procesos celulares como son la migración celular, la proliferación celular, la permeabilidad vascular y la mantención en el tiempo de la sobrevivida celular (especialmente de las células endoteliales en los vasos neoformados). Se muestra a continuación un esquema que muestra las diversas vías intracelulares promovidas por el VEGF y su receptor VEGFR2 y como se involucra en diversos procesos para el desarrollo de la angiogénesis (ver anexo 4).



Vías intracelulares promovidas por el VEGF y su receptor VEGFR2. Imagen obtenida desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/83066> biosystems pathway. VEGF signaling pathway in *Homo sapiens* KEGG id hsa04370 (anexo 4)

Aunque las células del tumor inducen la formación de los vasos sanguíneos en un proceso que se asemeja a la angiogénesis fisiológica, la ultra estructura de los vasos es anormal. La neovasculatura está dilatada y sinuosa, y en su mayoría carece de pericitos funcionales. Además las paredes de los vasos del tumor son finas y se pueden componer de células endoteliales y tumorales. Esto hace que estos vasos sean extremadamente permeables, en parte debido a la presencia de fenestraciones y a la carencia de una membrana basal estructurada. <sup>25,26, 33, 34,35, 51</sup>

El principal promotor de la angiogénesis, es la Hipoxia que induce la liberación de Factores inducido por Hipoxia (HIFs), estos factores promueven en las células circundantes la liberación de factores proangiogénicos, principalmente la liberación de VEGF por parte de las células endoteliales<sup>52</sup>.

Este proceso por ende, no involucra solo a las células tumorales ya que la expresión de los factores angiogénicos pueden ser expresados además por el resto de las células circundantes como: pericitos, fibroblastos y monocitos. En los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento de los factores involucrados y de las vías pro y antiangiogénicas (ver anexo IV y V).<sup>4, 52, 58</sup>

El Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), la Angiopoyetina 2 (Ang2), y el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) son los principales actores involucrados en la angiogénesis tumoral, la cual a diferencia de la fisiológica presentan concentraciones más altas de los mismos e incluye la participación de otras citoquinas que normalmente no se encuentran presentes, como la

interleukina-8 (IL-8) que es un factor mediador de inflamación. Esta sobreexpresión de IL-8 estaría involucrada en la expresión de metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2), lo cual induciría una degradación de la membrana basal y el remodelamiento de la matriz extracelular, todo esto facilitaría los procesos de angiogénesis inducidos por el tumor.<sup>31, 32, 52</sup>

Además las vías angiogénicas inducidas por el tumor, presentan patrones anormales dados porque la expresión de factores proangiogénicos se encuentran aumentados y sostenidos en el tiempo, esto evita una normalización de la vasculatura neoformada. En esta liberación sostenida, se ha visto que el VEGF es un factor necesario para la supervivencia de las células endoteliales reclutadas durante el proceso de angiogénesis tumoral, generando además un constante estado de remodelación vascular<sup>52, 53</sup>.

### **Angiogénesis y Gliomas**

En la génesis tumoral de los gliomas, se han determinado 2 vías de desarrollo tumoral. Una vía de novo que tiende a desarrollar en forma primaria tumores de tipo Glioblastoma multiforme y suele darse en pacientes de mayor edad y otra vía que va desarrollando en forma creciente de malignidad tumores derivados de origen glial y que puede avanzar también hasta el glioblastoma multiforme (ver anexo VI). En ambas vías, varios de los factores promotores de proliferación celular y desarrollo tumoral son además factores proangiogénicos como el PDGF.<sup>55</sup>

Los gliomas de alto grado son tumores altamente vascularizados, siendo la presencia de estos vasos de neoformación uno de los criterios diagnósticos de glioblastoma. Cerca de un 86% de los glioblastomas y de un 79% de los astrocitomas anaplásicos presentan inmuno-reactividad positiva para VEGF.<sup>12, 13,19</sup>

Se ha reportado que las líneas celulares provenientes de células Stem cell-like de glioma, consistentemente secretan elevados niveles de VEGF. Estas líneas poblacionales son particularmente importantes en la recidiva tumoral y en la aparición de la resistencia tumoral a la quimioterapia. Además estas líneas celulares menos diferenciadas son altamente eficientes en desarrollar mecanismos de resistencia a terapias antitumorales. Por otro lado, dentro de las alteraciones moleculares expresadas en los gliomas habría una sobreexpresión del receptor de VEGF (VEGFR) en el endotelio presente en estos tumores.<sup>11, 12, 58</sup>

Siendo además demostrado que la densidad microvascular y los niveles de VEGF son marcadores pronósticos independientes de la supervivencia de pacientes con diagnóstico de astrocitoma fibrilar de bajo grado.<sup>10, 11, 12</sup>

El estudio imagenológico de los tumores gliales demostró que existe una asociación positiva entre el volumen sanguíneo microvascular y de captación de glucosa marcada y que estos 2 factores se relacionan con el grado de angiogénesis inducida por los tumores gliales. Y dentro de las características imagenológicas de los gliomas de alto grado, se incluye una alta captación de contraste y un aumento en la perfusión del tumor.<sup>16, 40</sup>

La angiogénesis tumoral se ve iniciada primariamente por el Factor Inducido por Hipoxia 1 (HIF-1), este factor se ve altamente expresado en la periferia de la necrosis intratumoral presente en los gliomas. Esto lleva a la expresión de una gran cantidad de otros genes, particularmente importante es la transcripción de gen del VEGF, que actúa como factor angiogénico primario en el desarrollo de los gliomas<sup>41</sup>. Otros factores proangiogénicos relacionados a los gliomas incluyen al factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).<sup>15</sup>

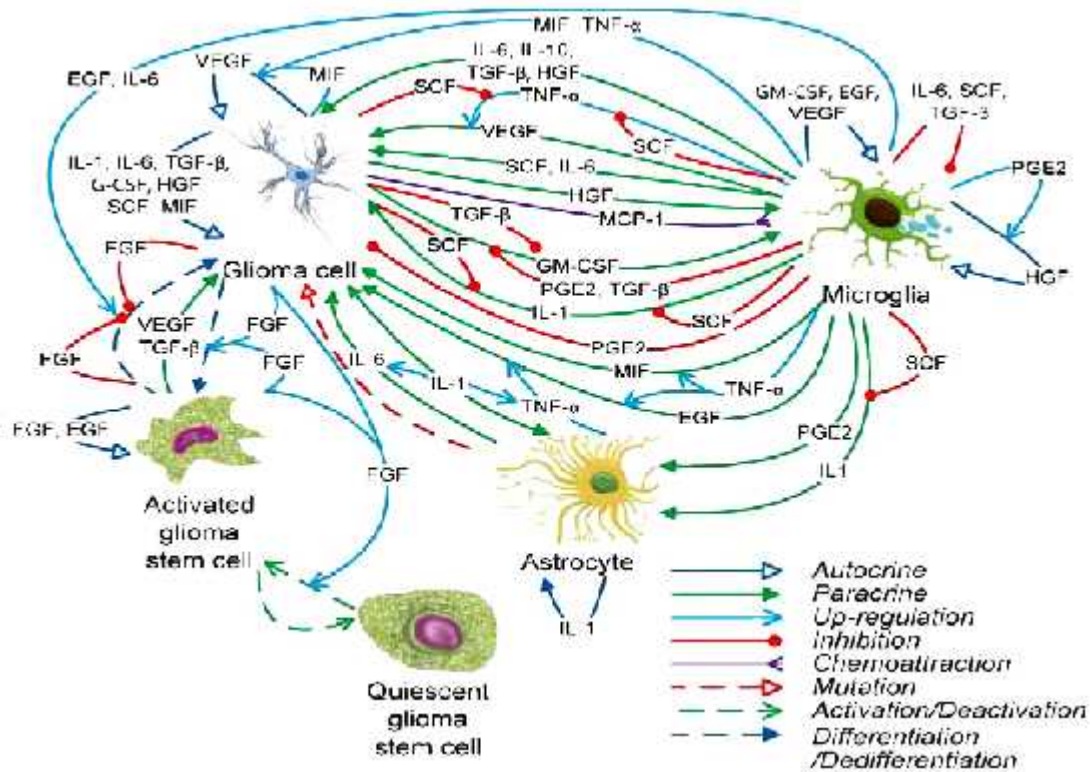
Como hecho anexo, se han reportado altos niveles de VEGF en el componente quístico de glioblastomas, demostrando que es producido localmente y que presenta altas concentraciones en el líquido de los quistes de tumores de cerebro primarios o metastásicos.<sup>13</sup>

A pesar de los esfuerzos en la terapéutica de los glioblastomas estos siguen presentado una alta letalidad. De manera que la respuesta a tratamiento no solo presenta una alta heterogeneidad entre los tipos de tumores gliales y entre pacientes, sino que además los tumores gliales presentan una alta heterogeneidad intratumoral, que es mediada por la diversidad de las poblaciones celulares que la componen.

Las células tumorales gliales presentan una alta interactividad con las células estromales. De manera que son capaces de reclutar a microglías vecinas para facilitar la génesis tumoral mediante comunicaciones paracrinas mediadas

por citoquinas como IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandinas, G-CSF y GM-CSF y factores de crecimiento como EGF, VEGF, HGF y SCF <sup>52,54</sup>.

Estas citoquinas, las cuales son consideradas además factores proangiogénicos, influyen en 3 de los aspectos más importantes de la sobrevivencia tumoral: Angiogénesis (VEGF), Proliferación (EGF) y Migración (MMP-9). Parte de estas comunicaciones e interacciones se muestran en la siguiente imagen <sup>54</sup>:



**Microambiente de comunicaciones celulares en tumores gliales.** Extraído desde : In silico experimentation of glioma microenvironment development and anti-tumor therapy.; Wu Y, Lu Y, Chen W, Fu J, Fan R <sup>54</sup>. Donde se pueden visualizar las vías de comunicación dentro de un glioma mediadas por citoquinas.



De manera tal que podemos sintetizar diferentes vías de la expresión de VEGF en los gliomas, generando una serie de mecanismos que regulan su expresión. Estos serían: <sup>59</sup>

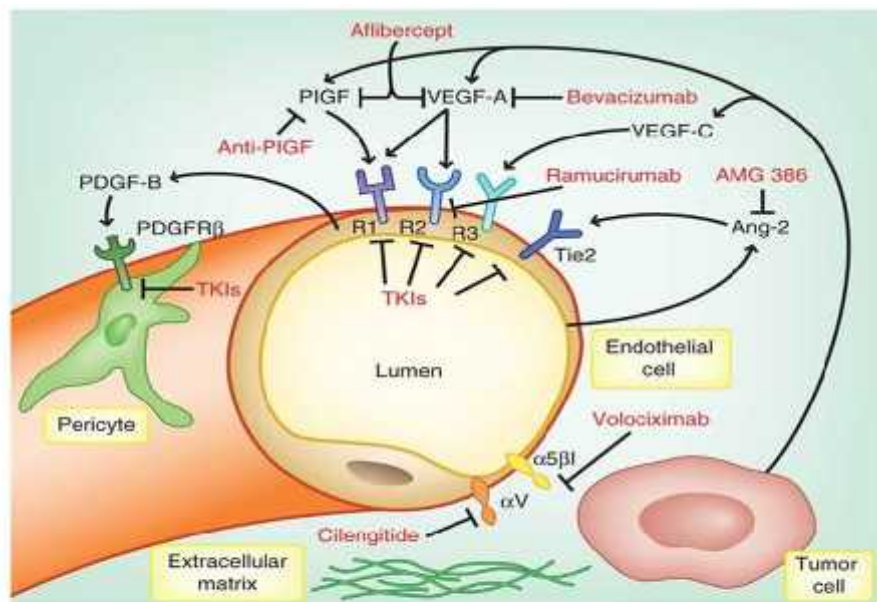
- i. Una disminución de las concentraciones de oxígeno en gliomas en crecimiento inducen una sobreexpresión de Factores inducidos por hipoxia (HIFs) que aumenta los niveles de mRNA de VEGF.
- ii. Señales derivadas de factores de crecimiento activan receptores de factor de crecimiento epidermal EGFR estimulan la expresión de VEGF independiente de HIFs.
- iii. El factor de transcripción FOXM1B se encuentra en altas concentraciones en los Glioblastomas multiformes lo cual estimula también la expresión de VEGF independiente de HIF.
- iv. En ambientes hipóxicos existe una sobreexpresión de la proteína HUR que suprime la degradación postranscripcional del mRNA de VEGF aumentando por ende los niveles de VEGF.
- v. Neurotrofinas derivadas de cerebro pueden aumentar las concentraciones de VEGF mediante un aumento de la expresión de HIF-1 .
- vi. La Kinasa ligada a integrina 1 (ILK1), aumenta la expresión de VEGF por estimulación de la vía mediada por HIF1 .

De manera que la expresión de VEGF presenta vías dependientes o independientes de HIFs. Con este avance en la comprensión de las vías

angiogénicas implicadas en el desarrollo de los gliomas surge el uso de las terapias antiangiogénicas para el tratamiento de estos.

### Terapias antiangiogénicas

Estas terapias surgen para poder enfrentar la resistencia tumoral a la quimioterapia. Dentro de las primeras terapias antiangiogénicas aprobadas para el manejo de los gliomas esta el uso de Bevacizumab (Aprobada por la FDA el 2009 con el nombre de Avastin de Roche). Este corresponde a un anticuerpo monoclonal IgG1 Anti-VEGF-A circulante, que evita la unión con el receptor de VEGF de manera de evitar la activación de las vías proangiogénicas. Sin embargo, existen otras vías de inhibición de la angiogénesis en desarrollo, como se muestra en la imagen a continuación, las cuales ya han comenzado a evaluarse en etapas preclínicas y clínicas (ver anexo 7).<sup>56</sup>



El Bevacizumab es una de las posibles drogas antiangiogénicas, le siguen además otro tipo donde los inhibidores de tirosin kinasa asociados a receptor ya presentan 3 medicamentos en fase II y III para terapia antineoplásica en tumores de SNC (Sorafenib, Cediranib y Sunitinib)<sup>56, 58</sup> Imagen obtenida de: Modeling and predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu<sup>56</sup>

Si bien inicialmente el Bevacizumab se aprobó como terapia para el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón de células pequeñas, el uso de este en la terapia de pacientes con gliomas se encuentra ya en fase III para pacientes con diagnóstico inicial de glioblastoma, en uso concomitante con radioterapia y quimioterapia con Temozolamida.

Actualmente, se utiliza Bevacizumab para el tratamiento de pacientes con recidiva de glioblastoma sólo o en combinación con Irinotecan, con lo cual se logra una supervivencia a 6 meses de un 47% mayor que los controles históricos, cercanos a un 20%. Además se logra reducir el edema cerebral de origen vasogénico presente en los pacientes portadores de este tumor.<sup>41, 42, 47</sup>

Existe eso sí, una gran variabilidad en la respuesta de los pacientes a estas terapias, por lo que la búsqueda de un marcador que nos permita predecir la respuesta es prioritaria. Además, ante la recidiva tumoral muchos pacientes no son reoperados por lo que no es posible disponer nuevamente de tejido cerebral. Esto hace necesario la búsqueda de un indicador de la biología tumoral o de los patrones angiogénicos de los gliomas de una manera más asequible, por ejemplo que esté presente en el LCE o en plasma.

La relación del VEGF y la angiogénesis tumoral en gliomas ha sido estudiada con diversos enfoques como se describió previamente.<sup>13,14</sup>

Presentando que en las líneas celulares de glioma, la expresión del VEGF se correlaciona con la densidad vascular y el peso tumoral (tumorigenicidad), a diferencia por ejemplo de otros factores proangiogénicos como el b-FGF. Además se ha observado una regulación positiva de la expresión de RNA mensajero de VEGF pero no así de del b-FGF o PDGF-b en modelos *in vitro* de gliomas.<sup>15</sup> Con esto se propone al VEGF como el principal factor angiogénico en el desarrollo y formación de los gliomas.<sup>17</sup>

Si bien la angiogénesis es un indicador de malignidad en gliomas y un factor pronóstico de sobrevida en pacientes con gliomas; y el VEGF actúa como el principal factor angiogénico en la biología tumoral de los gliomas. La medición *in situ* del VEGF en el glioma se determina necesariamente mediante la recolección de muestras de tejido. En este sentido el LCE, el cual se encuentra en el ambiente que rodea a las células tumorales del glioma nos permite un mejor acceso a la evaluación del VEGF.

Un biomarcador permite alguna de las siguientes situaciones: la detección temprana y diagnóstica de la enfermedad, y/o es un marcador pronóstico y de seguimiento de enfermedad. De esta forma pueden ser utilizados en la monitorización de respuesta a terapia, evaluar tempranamente la recurrencia de tumores, determinar el tiempo de progresión a malignidad o de sobrevida y establecer el tiempo hacia la progresión o transición tumoral de uno de bajo grado hacia otro de alto grado.<sup>57</sup>

En este sentido las modificaciones del Líquido Cerebro Espinal (LCE) inducidas por patologías asociadas al Sistema Nervioso Central, han sido estudiadas por largo tiempo, donde el ejemplo más claro es en las patologías infecciosas como la meningitis. En el caso de la meningitis tuberculosa se ha demostrado que el incremento en LCE y en plasma de VEGF son una medida de actividad de la enfermedad y su descenso gradual es una medida de respuesta a tratamiento, dando cuenta del VEGF como un biomarcador de enfermedad, este tipo de correlación es la que se espera demostrar en este estudio. <sup>14,19</sup>

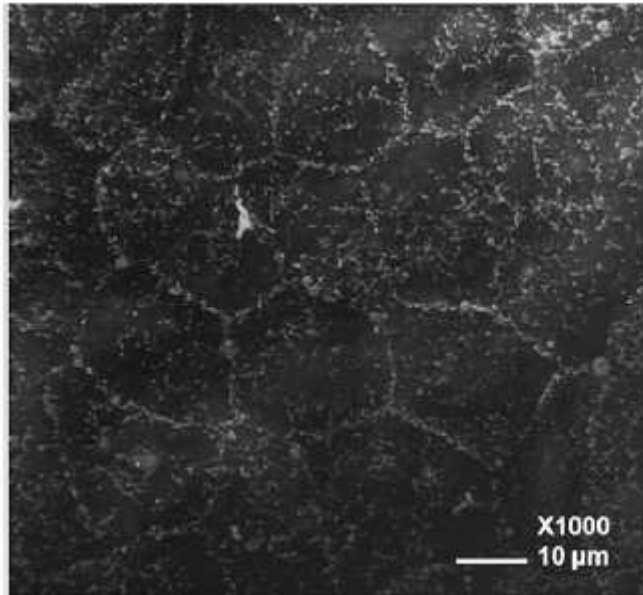
### **Modelos de estudio de angiogénesis**

El desarrollo de modelos de evaluación de angiogénesis ha permitido ir dilucidando algunas de las claves implicada dentro de este proceso a la vez que permite ir evaluando terapias en fases pre clínicas.<sup>25,26</sup>

El modelo de membrana alantocoriónica (MAC) de pollo permite acceder a un modelo *in vivo* de angiogénesis que puede ser alterado por la introducción de factores proangiogénicos o antiangiogénicos. Es un modelo fácilmente reproducible que permite identificar respuestas antiangiogénicas y proangiogénicas y simula la respuesta de los vasos en el ambiente tumoral.

Los primeros ensayos en MAC fueron descritos por embriólogos hace aproximadamente 50 años y fue modificado luego como un modelo angiogénico,

donde el acceso a la MAC permite incluir un filtro de metilcelulosa como vehículo para la instilación de sustancias a evaluar. <sup>26</sup>



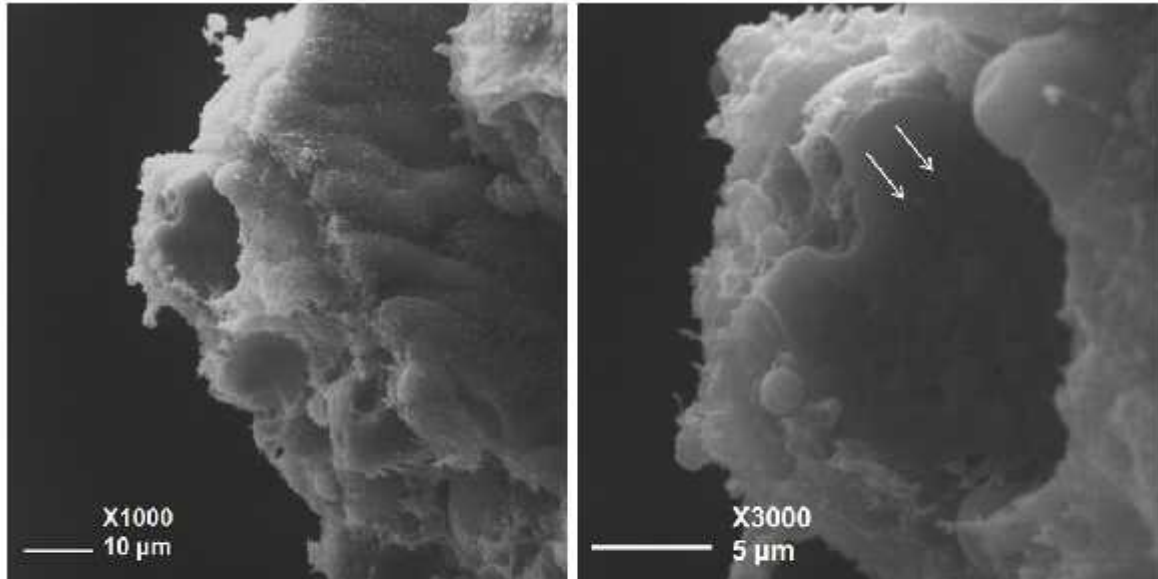
Microfotografía electrónica de barrido de la superficie de la MAC de pollo. Se observan los bordes celulares y pequeñas microvellosidades que recubren este epitelio.

(Imágenes propias)

En este modelo se han evaluado el efecto angiogénico de diversas sustancias como la quinacrina, los antiinflamatorios no esteroideos y los corticoides como la betametasona; en los cuales se demostró que presentaban un efecto antiangiogénico. Efecto que puede ser cuantificado mediante la medición del índice de proliferación de vasos sanguíneos directamente en la MAC (número de vasos por área), el control proangiogénico en estos estudios fue líquido proveniente de un tumor ascítico en ratón de la línea TA3-MTXR, que concentra una serie de factores proangiogénicos. <sup>27, 28,30</sup>

De manera tal que permite establecer no solo evaluación de sustancias pro y antiangiogénicas sino que además como el uso conjunto de estas tendrá un efecto

sobre la proliferación de vasos que corresponderá al balance que se establezca entre ambos tipos de factores.



Microfotografía electrónica de barrido de un corte transversal de MAC de pollo. Se observa en el espesor de la misma los vasos sanguíneos.

Un mayor acercamiento nos permite ver las paredes del vaso sanguíneo y la presencia de fenestraciones (indicadas por las flechas).

(Imágenes propias, ver ampliaciones en anexo)

Se propone determinar en este modelo, si el LCE proveniente de pacientes con gliomas es capaz de inducir una mayor proliferación de vasos en la MAC de pollo lo cual establecería una respuesta angiogénica positiva; lo que llevaría a suponer la presencia de factores proangiogénicos en el LCE. En base a la alta relación del VEGF con los gliomas se supone al VEGF como el más importante factor angiogénico en este tipo de tumor, por lo que la respuesta angiogénica del LCE debiera ser inhibida por el uso de anticuerpos Anti-VEGF.

## **Hipótesis:**

Habiendo encontrado una relación entre los vasos de neoformación y el grado de malignidad de los gliomas y la posibilidad de poder medir la angiogénesis que podría inducir LCE peritumoral se propone que:

Hipótesis:

**El LCE proveniente de pacientes con gliomas es capaz de inducir una mayor grado de angiogénesis en la membrana alantocoriónica de pollo debido a niveles elevados de VEGF.**

Hipótesis I

El LCE proveniente de pacientes con gliomas es capaz de promover la angiogénesis en la membrana alantocoriónica de pollo (modelo *in vivo* de angiogénesis)

Hipótesis II

La mayor angiogénesis inducida por el LCE proveniente de pacientes con gliomas se correlaciona con la presencia de VEGF en LCE.



## **Objetivos Generales:**

Determinar la relación entre los niveles angiogénicos inducidos por LCE de pacientes con gliomas en la MAC de pollo con la presencia de VEGF.

## **) Objetivos Específicos:**

- I. Cuantificar el índice de proliferación de vasos en membrana alantocoriónica de pollo inducida por LCE proveniente de pacientes con tumores gliales como medida de angiogénesis en un modelo *in vivo* Hip I
- II. Comparar el índice de proliferación de vasos en membrana alantocoriónica de pollo inducida por LCE proveniente de pacientes con tumores gliales con LCE proveniente de punción lumbar de pacientes sin patología tumoral ni neurológica Hip I
- III. Relacionar los niveles angiogénicos cuantificados en la MAC medidos en función del índice de proliferación de vasos, con el tipo de tumor glial. Hip I
- IV. Relacionar si la angiogénesis inducida por el LCE proveniente de pacientes con gliomas se relaciona con la presencia de VEGF. Hip II
- V. Determinar si la angiogénesis inducida por el LCE proveniente de pacientes con gliomas es inhibida por el uso de Anticuerpos AntiVEGF. Hip II

VI. Relacionar los niveles de VEGF en LCE con el índice de proliferación de vasos inducido por el mismo LCE en los modelos de membrana alantocoriónica de pollo Hip II

## **Materiales y Métodos:**

### **Obtención de Muestras de Líquido Cerebro Espinal**

El LCE se obtuvo, previo consentimiento informado, de pacientes con diagnóstico de glioma operados en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile reclutados para el Proyecto de Investigación del Concurso Interno para el desarrollo de Líneas prioritarias de Investigación que dirige la Dra. Mariana Sinning, del Departamento de Neurología-Neurocirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, estas muestras se obtendrán en forma intraoperatoria perilesionales o por punción lumbar.

El LCE de control se obtuvo de pacientes neurológicamente sanos que son sometidos a una punción lumbar con el objetivo de recibir anestesia regional. Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

#### **Criterios de Inclusión de Pacientes**

1. Pacientes mayores de 18 años con sospecha clínica o diagnóstico confirmado de gliomas en que se planifique una resección total o parcial o biopsia abierta del mismo.
2. Paciente en condiciones físicas o psíquicas de realizar el procedimiento de consentimiento informado y que consienta con el estudio.

3. Disposición de los Antecedentes médicos, farmacológicos, imagenológicos y anatomopatológicos por parte de los investigadores.

#### Criterios de exclusión

1. Negación del paciente a participar del estudio.
2. Presencia de una contraindicación formal para la realización de Punción Lumbar.
  - a. Presencia de signos o síntomas de Hipertensión endocraneana.
  - b. Compromiso cardiorespiratorio que impida una posición en decúbito lateral prolongado.
  - c. Discrasias sanguíneas.
  - d. Infección cutánea en el sitio de punción.
  - e. Lesión expansiva a nivel de cauda equina.
3. Incapacidad técnica de obtener el LCE durante el procedimiento.

Las muestras se coleccionaran y se procederá a congelarlas a -20°C inmediatamente, manteniendo la cadena de frio. Al momento de procesarlas se alicuotarán para procesarlas en el Modelos de MAC de Pollo y otra parte para el Análisis de VEGF mediante ELISA.

Como controles se utilizará LCE obtenido por punción lumbar realizado a pacientes sin patología neurológica que se someterán a anestesia regional.

Se incluirán en este estudio las muestras obtenidas desde Julio del 2007 hasta Diciembre del 2010 que provengan de pacientes con diagnóstico de glioma.

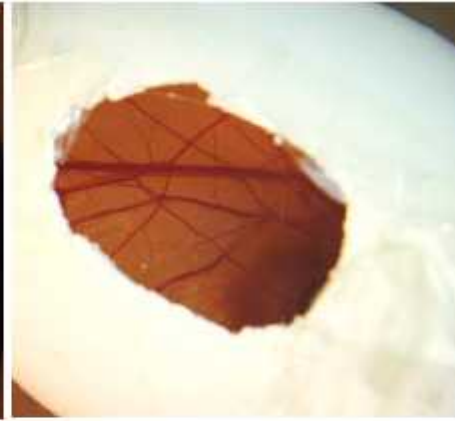
### **Preparación de la membrana alantocoriónica (MAC)**

Se utilizaron huevos fecundados de raza White Leghorn, los cuales fueron incubados en cámaras a 37 °C. A las 48 hrs de cultivo se perfora el polo agudo extrayéndose 2 ml de albúmina con pipeta Pasteur lo cual permite despegar la MAC de la cascara del huevo. Se limpia la superficie del huevo con alcohol yodado y se cubre con cinta adhesiva transparente, el orificio antes mencionado. En la zona dorsal (marcada previamente con los huevos en reposo) se abre una ventana de 2,5 por 2 cm, a través de la cual se eliminan las burbujas tocándolas con un microestilete al rojo para evitar la contaminación. La ventana se sella con cinta adhesiva y el huevo continúa su incubación a 37,8 °C.

Los vasos sanguíneos de la MAC proliferan y se diferencian en un sistema arteriovenoso, dando origen a una rica red de capilares desarrollados en el alantoides bajo el corion.



Imagen de un huevo preparado con cámara abierta para acceder a la membrana alantocoriónica



Se puede ver la presencia de vasos en la membrana alantocoriónica sobre la que se probarán las diversas sustancias

(Imágenes Propias)

### **Instalación de los filtros en la MAC con la sustancia de prueba.**

A los 8 días de incubación, se implantan filtros de metilcelulosa en la membrana alantocoriónica de pollo y se instilan con 10  $\mu$ l del componente a estudiar (LCE). Cada grupo incluirá 5 huevos con alguna muestra diferente de LCE.

- ) Control : Suero Fisiológico.
- ) Grupo Control LCE : LCE de Punción lumbar de paciente sin antecedentes de patología neurológica.
- ) Grupos de Estudio : LCE de pacientes con Tu primario de SNC, de origen glial.
- ) Grupo de Estudio con Terapia Antiangiogénica: LCE de pacientes con Tumor primario de SNC de origen glial + Anticuerpo AntiVEGF en concentración de 50  $\mu$ l/ml

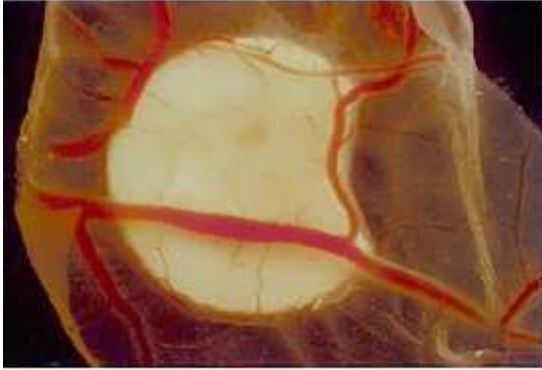


Imagen de la MAC aislada junto con el filtro de metilcelulosa, previo al procesamiento histológico

(Imagen proveniente del archivo del laboratorio del Dr. David Lemus)

### **Muestras para microscopía de luz**

48 horas posteriores a la aplicación de la sustancia a estudiar, se preparan las muestras histológicas.

- ) Fijación: Se fijan las muestras en Formalina (10%) por 48 hrs.
- ) Lavado con formalina y agua destilada.
- ) Deshidratación :
  1. Alcoholes ascendentes: 80° (24 hrs.) – 96° (15 min.) – 100° (15 min.)
  2. Líquido intermedio xilol: 10 min. en cada xilol (3 veces).
- ) Embebido en parafina líquida de 40° y 56° (30 min. cada una).
- ) Inclusión en bloques de parafina a 60°.
- ) Corte y montaje (24 hrs. post inclusión).
  - Corte de bandas de 5 micrómetros con micrótopo. Para estirarlas, se sumergen en agua destilada. Posteriormente, se realiza el montaje en un portaobjetos y se adhieren con albúmina.
  - Se mantienen las muestras por 12 hrs a 37°.

) Desparafinación:

Xiloles: 10 min. en cada xilol (3).

Alcoholes: 100° (3), 97° y 80° (7 min. cada uno).

Lavado con agua corriente por 5 min. y paso por agua destilada de las muestras.

) Tinción:

Alcian- Blue por 8 minutos.

Hematoxilina del tipo Harris, por 4 minutos.

Alcoholes de 80° y de 96° (3 min. cada uno)

Eosina por 30 segundos.

) Deshidratación en alcoholes ascendentes hasta 96° y cuatro de 100° (7 min. cada uno)

) Aclaración en xiloles (3) 10 min. cada uno.

) Se cubren las muestras con cubreobjeto y se sellan los preparados con resina.

### **Uso anticuerpos Anti-VEGF**



Para la segunda experiencia se utilizó anticuerpo policlonal Anti-VEGF A del laboratorio Millipore.

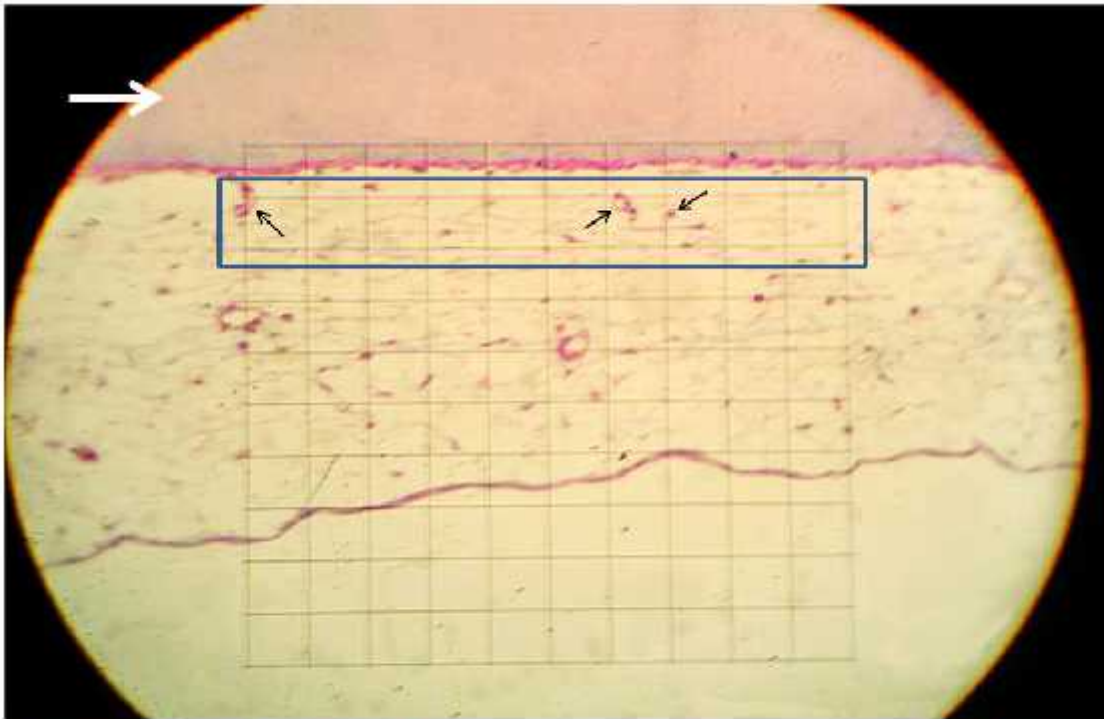
Este anticuerpo es una IgG policlonal de conejo purificada por cromatografía por afinidad empleando una matriz de VEGF de ratón inmovilizado. La solución del Anticuerpo (1mg/ml) fue liofilizada con PBS, a un pH de 7,2 y reconstituido con agua esteril destilada. La concentración neutralizante indicada por el fabricante es de 2 µg/ml, la cual se utilizó en este estudio.

**Preparación:**

- ) Se alicuotaron 500 µl de solución de LCE de pacientes y Anticuerpo Anti-VEGF.
- ) Estas alícuotas se hicieron para 3 LCE de pacientes con patología tumoral uno con alto grado de angiogénesis, uno medio y uno bajo.
- ) Además se preparó una con LCE de paciente sin patología tumoral y uno con Suero fisiológico como controles.

**Conteo de vasos sanguíneos.**

Se realizaron cortes histológicos de cada uno de los grupos con la tinción de rutina antes descrita. Se realiza el conteo capilar bajo microscopio óptico con aumento de 400 x, empleando un retículo graduado de 1 cm<sup>2</sup> dividido en 10 segmentos (lo cual equivale a un área de 9000  $\mu\text{m}^2$ ). El conteo de los vasos se realizó desconociendo el origen de las muestras de manera ejecutarlo en forma ciega. El número de vasos por área determina el índice de proliferación de vasos lo cual se relaciona con la capacidad angiogénica de la sustancia que se evalúa.



Microfotografía a 400X que visualiza la MAC de pollo con la esponja de metilcelulosa (flecha blanca). El área demarcada por el cuadrado azul comprende una serie de la rejilla de conteo que equivale a 9000  $\mu\text{m}^2$  y se visualizan 3 vasos en esa área (flechas negras).

### **Análisis estadístico y correlación clínico-patológica**

Los datos se tabularán en una planilla y se analizarán con la prueba de t-student para 2 muestras poblacionales para análisis de diferencias de los niveles de angiogénesis inducidos en la MAC de pollo por cada grupo.

Los antecedentes clínicos y anatomopatológicos se mantendrán ciegos hasta realizados las experiencias, luego se procederá a correlacionar y comparar los resultados con los antecedentes clínicos de los pacientes de los cuales proviene el LCE y se estudiara mediante regresión lineal la relación entre los niveles de angiogénesis y la cuantificación de VEGF. Se consideraran significativas las diferencias estadísticas cuando el p-value de estas sea menor a 0,05.

## Resultados

Se obtuvo muestras de LCE proveniente de 12 pacientes con diagnóstico por biopsia de glioma (muestras experimentales) y 5 muestras de control de LCE provenientes de pacientes sin lesión de SNC, obtenidas mediante punción lumbar.

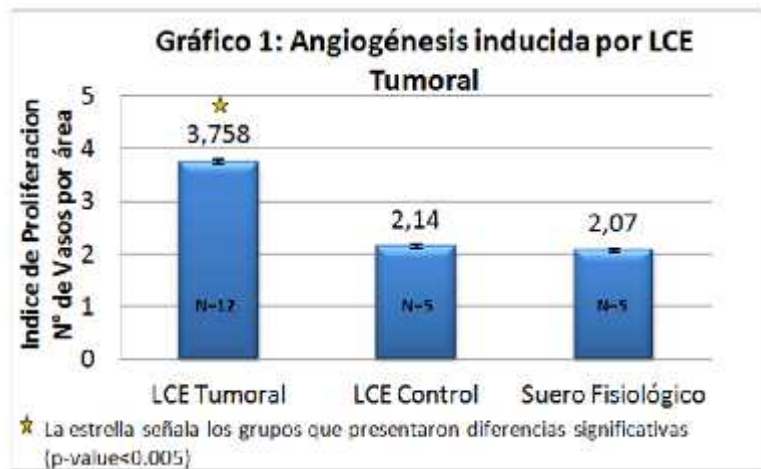
Se clasificó las muestras experimentales de LCE según los distintos tipos de gliomas

- I. Astrocitomas
- II. Oligodendrocitomas
- III. Ependimomas
- IV. Tumores de Plexo coroideo
- V. Gangliogliomas.

<b>Tabla 1: Resumen de pacientes incluidos en el estudio</b>			
	<b>N° pacientes</b>	<b>Media</b>	<b>Error Típico</b>
<b>Gliomas</b>	<b>12</b>	<b>3,758</b>	<b>0,04</b>
<b>Astrocitomas</b>	<b>4</b>	<b>3,693</b>	<b>0,069</b>
Astrocitomas de bajo grado	2	3,675	0,01
Astrocitoma de alto grado y glioblastomas	2	3,712	0,096
<b>Oligodendroglioma</b>	<b>4</b>	<b>3,84</b>	<b>0,069</b>
Oligodendroglioma de bajo grado	3	3,921	0,079
Oligodendroglioma de alto grado	1	3,6	0,141
<b>Tumor de plexo coroideo</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Epéndimomas</b>	<b>1</b>	<b>4,353</b>	<b>0,152</b>
<b>Gangliogliomas</b>	<b>3</b>	<b>3,537</b>	<b>0,075</b>
<b>LCE control</b>	<b>5</b>	<b>2,14</b>	<b>0,0404</b>
<b>Control SF</b>	<b>5</b>	<b>2,07</b>	<b>0,053</b>

La distribución de los pacientes puede verse en la Tabla 1, donde se logró recolectar muestras de 4 tipos de gliomas en el periodo definido, no presentándose ningún paciente con el diagnóstico de tumor de plexo coroideo.

En el gráfico 1 podemos observar que el LCE provenientes de pacientes con gliomas generó un mayor número de vasos sanguíneos por área que las otras



muestras de LCE control y que el Suero fisiológico en la MAC de pollo (mayor índice angiogénico).

De manera que el LCE proveniente de pacientes con patología tumoral presentó una media de 3,758 n° vasos/área (Error Típico, E.T. de 0.044) y el LCE de pacientes sin patología de sistema nervioso central presentó una media de 2,14 (E.T. 0,0404), a su vez, los controles con Suero Fisiológico (SF) presentaron una media de 2,07 (E.T. 0,0534); la diferencia en este índice de proliferación de vasos entre el LCE tumoral con el LCE control y entre el LCE tumoral con el control de SF fueron estadísticamente significativos (p-value < 0,05); entre el LCE control y el grupo control de SF no se presentó diferencias significativas, esto concuerda con el hecho de que en condiciones normales el Sistema Nervioso Central no presenta

la expresión de factores angiogénicos, en este caso el LCE control presenta un valor neutro de angiogénesis, similar al suero fisiológico.

Estos resultados demuestran la hipótesis I, donde las muestras de LCE proveniente de pacientes con gliomas son capaces de promover una mayor angiogénesis en la membrana alantocoriónica de pollo.

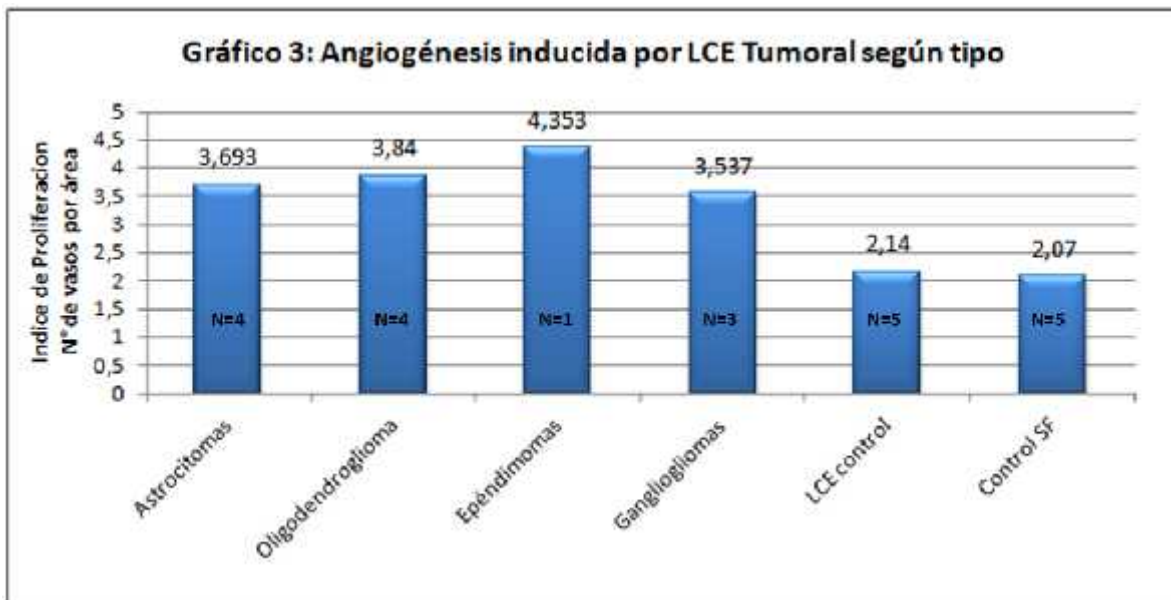
Al evaluar si habían diferencias entre el sitio de obtención de muestras, se observa en el gráfico 2 que el LCE de pacientes con gliomas que fueron



obtenidos por punción lumbar y los que fueron obtenidos directamente del sitio del tumor presentan una media similar, siendo en los primeros una media de 3,73 y en los provenientes de LCE peritumoral de de 3,77; no presentando diferencias significativas entre estos grupos ( $p$ -value 0,58). Este hecho si bien es esperado, es importante pues demuestra que no habría diferencias en el sitio de obtención de la muestra de LCE y estaría dado porque el LCE que se encuentra circulando en el espacio subaracnoideo que rodea al tumor, se encuentra en continuación con espacio al cual se accede mediante una punción lumbar.

### Evaluación de la Angiogénesis según tipo histológico y grado de malignidad

La evaluación del grado de proliferación de vasos sanguíneos según el origen de los gliomas, evidenció una media de 3,693 (E.T. 0,069) para los Astrocitomas y una media de 3,84 (E.T. 0,069) para los oligodendrogliomas. Por otra parte los Gangliogliomas presentaron una media de 3,537 (E.T. 0,075) y la los Ependimomas de un 4,353 (E.T 0,152), En esta comparación, cada tipo histológico de tumor glial presentó un mayor índice de proliferación que el LCE control y el suero fisiológico (Gráfico 3).

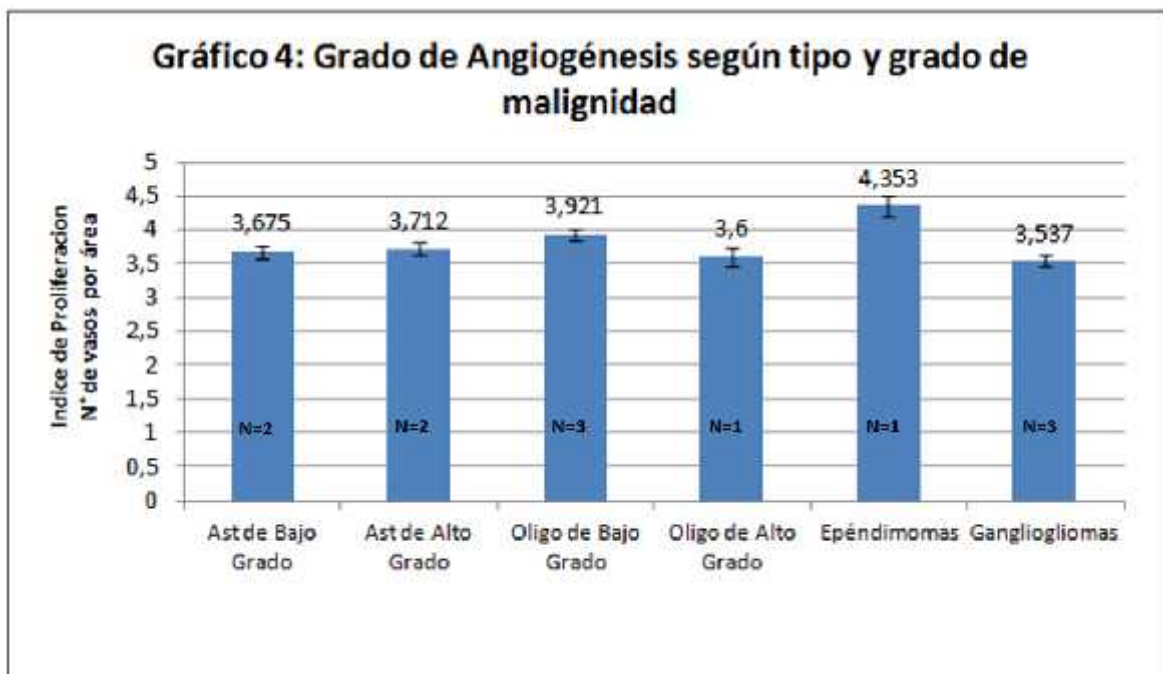


La evaluación según el grado de malignidad o agresividad de los tumores gliales presentó dificultades por el número de pacientes recolectados. En los Astrocitomas, el grupo de los Astrocitomas Pilocíticos o Difusos corresponden a

las etapas que presentan menores características de agresividad, unidos ambos en la categoría de astrocitomas de bajo grado.

Los astrocitomas anaplásicos y los glioblastomas, corresponderían a astrocitomas de alto grado siendo el grupo de mayor agresividad dentro de los astrocitomas. En los oligodendrocitomas, también se agrupan en 2 categorías: oligodendrocitomas de bajo grado y de alto grado, estos últimos corresponden a aquellos que presentaban mayores características anaplásicas. En el caso de los gangliogliomas y los ependimomas no fue posible realizar esta diferenciación.

Al evaluar los perfiles angiogénicos de los distintos tipos de gliomas y las características de agresividad de los mismos, presentaron medias similares como se puede observar en el gráfico 4.





Considerando que el número de pacientes es muy bajo en cada serie el análisis de los resultados dificulta realizar comparaciones significativas, sin embargo llama la atención el menor grado de angiogénesis inducido por el LCE del oligodendroglioma de alto grado, esto puede deberse al tipo de tratamiento percibido previo a la toma del LCE en este paciente. Hechos que se discutirán en la sección siguiente.

### **Resultados de la influencia del tratamiento previo en el grado de angiogénesis inducida**

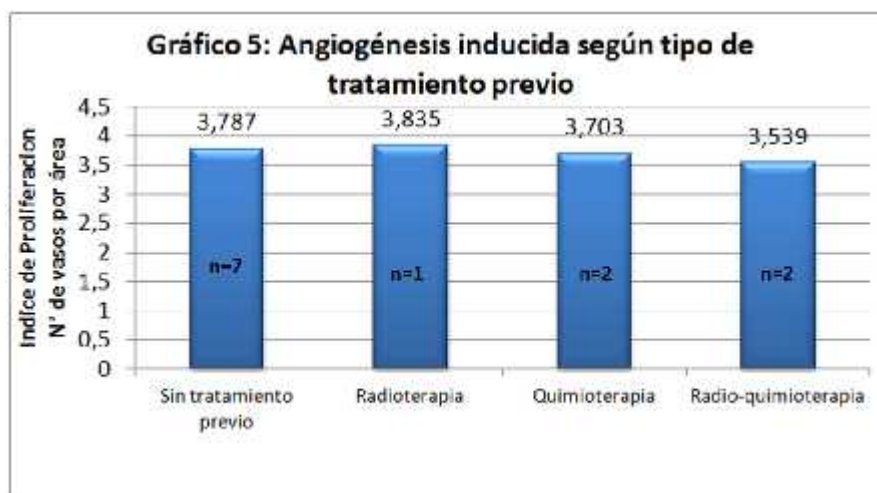
Se comparó el grado de angiogénesis inducido por el LCE proveniente de pacientes que habían recibido tratamiento previo, con el LCE de pacientes nativos a tratamiento.

Se observó que el LCE proveniente de pacientes con gliomas que recibieron tratamiento previo presentaron una media de vasos por área de 3,66 (E.T. 0,059) ligeramente inferior a los pacientes sin tratamiento previo de 3,78 (E.T. 0,059).

Era necesario evaluar el efecto del tratamiento previo al cual fueron sometidos los diversos pacientes en el efecto que tuvo con el patrón angiogénico del LCE, se separaron en 3 grupos: pacientes que recibieron solo quimioterapia previa a la cirugía, otros que recibieron radioterapia previa a la cirugía y un grupo que recibió radioterapia y quimioterapia previa a la cirugía.

El objetivo de esta terapia previa, es poder disminuir el riesgo de recidiva del tumor, disminución del tamaño tumoral y aumentar la sobrevida de los pacientes<sup>43</sup>. Sin embargo, todo tipo de terapia tumoral previa a la cirugía influye en la distribución de las poblaciones celulares y de la biología del tumor lo que supondrá una posible variación también en los comportamientos angiogénicos.<sup>1,2,4,9</sup> La distribución de cada una de las distintas terapias y del grupo sin tratamiento puede verse en la tabla 2.

La media del grupo que recibió radioquimioterapia fue la que presentó un menor grado de proliferación de vasos por área, siendo de 3,539 (E.T. 0,088), algo menor que la media de los otros grupos. Donde el grupo que no recibió terapia previa fue de un 3,787 (E.T. 0,059), el grupo que recibió solo radioterapia de 3,835 (E.T. 0,125) y el grupo que recibió quimioterapia de 3,703 (E.T. 0,0932).

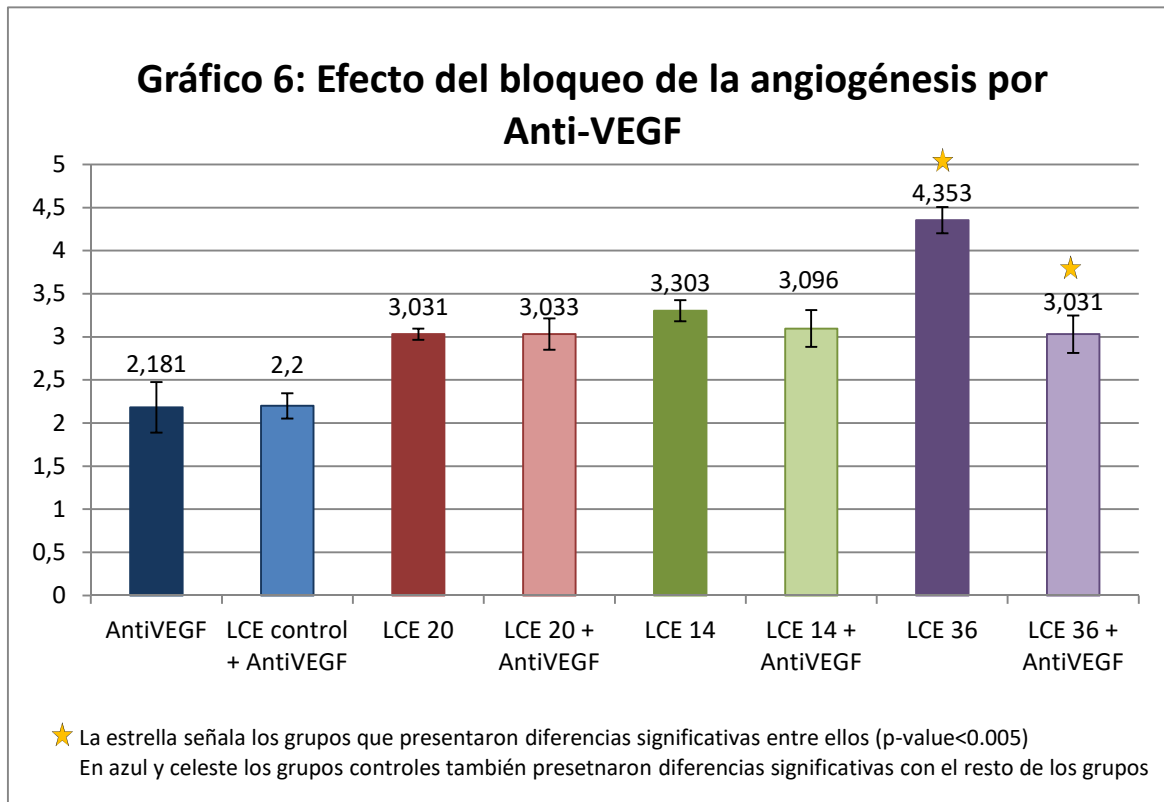


Con esto podemos ver que los tratamientos previos a la extracción de muestras de LCE afectan el comportamiento angiogénico inducido por el LCE en

la MAC de pollo, en este sentido la radioquimioterapia presenta una disminución ligeramente mayor a los otros tipos de tratamiento y menor también que aquel grupo que no recibió terapia previa.

En el caso anterior del gráfico 4, el grupo de oligodendrogliomas de alto grado presentaban como tratamiento previo radioquimioterapia a diferencias de los de bajo grado que o no presentaban terapia previa o solo recibieron radioterapia o quimioterapia, lo que podría haber influido en el mayor grado de angiogénesis expresado en los de menor agresividad.

**Resultados del uso de anticuerpos Anti-VEGF en la angiogénesis inducida por LCE de pacientes con glioma.**



Para realizar esta experiencia se utilizaron muestras de LCE de 3 pacientes con glioma con distintos índices angiogénicos. El LCE 20 corresponde a un paciente con GBM que recibió radioquimioterapia previa y era el que presentaba menor índice angiogénico. El LCE 14 provenía de un paciente con Astrocitoma de Alto Grado que también recibió terapia previa y presentó un índice angiogénico medio, y por último se incluyó en esta experiencia el LCE 36 que provenía de un paciente con diagnóstico de Ependimoma, que no recibió tratamiento previo y que presentaba el mayor índice angiogénico.

En cada uno de estos grupos se bloqueó específicamente el VEGF con un anticuerpo policlonal Anti-VEGF humano, en una concentración de 50 µl/ml (indicado por el fabricante como la concentración neutralizante para muestras de suero). Además se incluyó en esta experiencia un grupo con LCE control + AntiVEGF y un grupo con Suero Fisiológico + AntiVEGF.

Los resultados presentes en el Gráfico 6 muestran que el índice de angiogénesis inducido por el LCE control + Anti-VEGF y el SF + Anti-VEGF son similares al de LCE control y al de SF, no presentando diferencias significativas con estos grupos o entre ellos. De manera que el uso de Anticuerpos Anti-VEGF no presentó un efecto antiangiogénico sobre la MAC de pollo, efecto que era esperado por el uso de un anticuerpo específico contra VEGF humano. Con esto se demuestra efectivamente que las muestras de LCE control no presentan niveles de VEGF en concentraciones que pudieran ser activas angiogénicamente.

Al evaluar el bloqueo del efecto angiogénico de los pacientes con glioma y el uso de anticuerpo Anti-VEGF, solo el LCE 36 de mayor índice angiogénico demostró un efecto antiangiogénico estadísticamente significativo, disminuyendo el índice de proliferación de vasos de 4,353 vasos/área (E.T. 0,152) a un índice de 3,031 (E.T. 0,217) ( $p\text{-value} < 0,005$ ). El LCE 14 de índice angiogénico medio también presentó una disminución desde una media de 3,303 (E.T. 0,123) a una media de 3,096 (E.T. 0,214); sin embargo esta disminución no fue significativa estadísticamente. El LCE 20 no mostró diferencias en el patrón angiogénico

siendo la media inicial de 3,031 (E.T. 0,065) y la media con Anti-VEGF de 3,033 (E.T. 0,181).

Estos resultados demuestran que la angiogénesis inducida por LCE es en parte mediada por VEGF y puede ser inhibida por el uso de anticuerpos Anti-VEGF. Además esta inhibición es mayor a medida que la muestra de LCE presenta un mayor índice angiogénico.

Por otra parte se ve entonces que el índice angiogénico inducido por el LCE de pacientes con Gliomas no depende exclusivamente de VEGF, siendo incluso poco importante en los grupos experimentales con un índice angiogénico menor donde el uso de anticuerpos en no tuvo efecto en inhibir el desarrollo de vasos. Esto se correlaciona con la búsqueda de nuevas terapias antiangiogénicas que se están desarrollando, independientes de VEGF, como los inhibidores de tirosin kinasa asociada a receptores de factores proangiogénicos.

Contestando a la Hipótesis II, los resultados muestran que el VEGF se relaciona parcialmente en forma positiva con el mayor índice angiogénico inducido por el LCE de pacientes con gliomas, siendo el efecto del anticuerpo AntiVEGF más efectivo a mayor índice angiogénico.

## Discusión de los resultados

La investigación actual sobre las características del LCE proveniente de pacientes con gliomas es relativamente escasa. Se han realizado algunas series de análisis del LCE que buscan establecer y cuantificar la expresión de diferentes mediadores angiogénicos que el tumor libera. Dentro de las proteínas identificadas están: VEGF-b, -FGF, Factor de Coagulación VIII, -2 Microglobulina, -defensinas 6 y 7, Osteonectina/SPARC, FGF-14, Atractina, TGF-14, PGE-2, proteína Tau e IL-10 entre otros.<sup>37, 57</sup>

Este análisis mediante técnicas de biología molecular como la electroforesis, si bien localiza efectivamente la presencia de factores en el LCE, que pueden estar involucrados en el desarrollo tumoral no expresan adecuadamente las relaciones que se establecen en la biología del glioma.

La ventaja de utilizar modelos *in vivo*, es que permite realizar inferencias del de ambiente biológico en el cual se está desarrollando el tumor, pues evaluamos el LCE que circula por la periferia del tumor que recoge estos factores angiogénicos. De esta manera en este modelo de evaluación de angiogénesis que es la MAC de pollo se demuestra efectivamente que el LCE, es también una vía mediante la cual los factores proangiogénicos del tumor viajan.

Según se observó en los resultados, los gliomas liberan factores proangiogénicos al LCE, lo que se traduce en un mayor grado de proliferación de

vasos sanguíneos por área en la MAC que fue instilada con el LCE de pacientes con patología tumoral versus el LCE de los controles sanos.

El resultado observado del grado de angiogénesis neutro que presentó el LCE de pacientes sin patología del SNC (LCE control), que fue similar al suero fisiológico y que no se vio afectado por el uso de Anticuerpos Anti-VEGF concuerda con que todo tejido sano presenta un estado de quiescencia endotelial.

Actualmente la evaluación de la biología tumoral y del ambiente tumoral en el cual se desarrollan los gliomas se ha estudiado mediante la evaluación inmunohistoquímica de las biopsias tumorales, la cual provee un detalle importante de parámetros histopatológicos de tumor y que se asocian a una mayor o menor agresividad tumoral, al punto que los pacientes con una mayor densidad vascular en el tumor presentan un menor tiempo de sobrevida que los pacientes sin patología tumoral.<sup>15, 16, 58</sup>

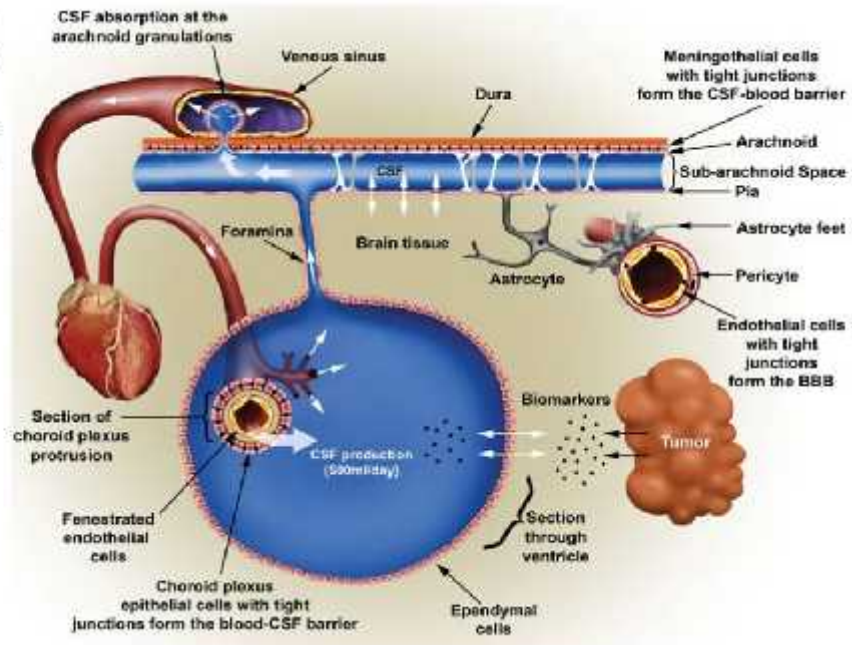
Además el uso de las tecnologías de imagen ha permitido tener una nueva vía de evaluación de los tumores de Sistema Nervioso. El uso conjunto de la Resonancia magnética, el PET-Scan y otros han permitido evaluar *in situ* características morfofuncionales de estos tumores, las cuales también se han asociado con los niveles de agresividad de los gliomas y la sobrevida de los pacientes.<sup>40, 44</sup>



Las líneas de investigación asociadas a los gliomas se encuentran en la búsqueda de marcadores tumorales que sean de fácil acceso y de alta predictibilidad en las asociaciones de agresividad tumoral y factor predictor de supervivencia. Un posible marcador tumoral ha surgido de los estudios de genómica tumoral, con la identificación de la expresión de genes que den cuenta de la variabilidad de las respuestas de los paciente con gliomas a los tratamientos.<sup>45, 46</sup>

Entre estas iniciativas, enmarcadas en la búsqueda de marcadores tumorales, nuestro estudio complementa la información de cómo es el ambiente que rodea al tumor y su relación con el LCE. Se muestra a continuación un esquema que ilustra la relación del tumor con el LCE y los factores secretados por los gliomas.

Se muestra la vía de circulación del LCE, los sitios en que se presenta la barrera hemato-encefálica (BBB) y la secreción de posibles biomarcadores del tumor hacia el LCE.<sup>50</sup>



Como se demostró en este análisis de proliferación de vasos, la presencia de factores angiogénicos da cuenta de una mayor densidad de vasos en la MAC de pollo. Al igual que los estudios en resonancia magnética que permiten realizar estudios del comportamiento *in vivo*, nuestro modelo permite ahondar en cómo se desarrolla o modifica el ambiente angiogénico en el cual crece el glioma, ya sea previo al tratamiento o incluso después. Esto permite un seguimiento del patrón angiogénico del tumor mediante el acceso que facilita la punción lumbar al líquido cerebroespinal.

En este contexto nuestro estudio es principalmente descriptivo. Donde si bien, hemos podido identificar ciertas variables en el comportamiento angiogénico del LCE; particularmente importante como es que a mayor índice angiogénico del LCE mayor impacto presenta el uso de anticuerpos Anti-VEGF.

En este sentido, si bien la serie de pacientes no presentó un número adecuado como para realizar inferencias acerca de patrones angiogénicos según los tipos de tumor o la mayor agresividad de los mismos. Se hace una aproximación a que el tratamiento previo que recibió el paciente el momento de la toma de muestra de LCE, podría ser capaz de alterar la liberación de factores angiogénicos por parte del tumor y a su vez la presencia de estos en el LCE.

La variabilidad en el comportamiento del índice angiogénico según el tipo de tratamiento previo recibido al momento de recolectar el LCE muestra que el uso conjunto de radioquimioterapia podría generar un mayor cambio en el ambiente

angiogénico del tumor, induciendo una disminución en la capacidad angiogénica del LCE proveniente de los pacientes sometidos a esta terapia. Esto concuerda con el desarrollo de las terapias antiangiogénicas para los pacientes con Gliomas y las revisiones de los modelos de tratamiento actuales.<sup>58, 60</sup>

Esto también se relaciona con el mayor efecto del uso de Anticuerpos Anti-VEGF en aquel grupo que presentaba un mayor índice angiogénico y no había recibido terapia previa versus el de menor índice angiogénico que había recibido radioquimioterapia, cuyo índice angiogénico no fue modificado por el uso de AntiVEGF.

La diferencia en la respuesta del tumor entre las terapias puede ser evaluado a dos luces: Por una parte la radioterapia o la quimioterapia que utiliza medicamentos citotóxicos inducen necesariamente un grado de daño celular en el tumor. Este daño celular libera factores de inflamación que como se ha hecho referencia anteriormente, también están involucrados en los procesos de angiogénesis. Sin embargo a nivel biológico vemos que no importa el tipo de tumor glial o el tratamiento recibido, el grado de angiogénesis inducido por LCE tumoral es siempre mayor al del LCE control.

Sin embargo, el daño inducido por la radioterapia o la quimioterapia alteran el comportamiento de las poblaciones tumorales, estos cambios son en parte la base de los patrones de resistencia tumoral a los tratamientos.

Destaca el hecho de que el uso de Anticuerpos Anti-VEGF para el bloqueo del efecto angiogénico del VEGF no hayan logrado reducir el índice de proliferación de vasos inducido por el LCE de pacientes con glioma que presentaron menor índice angiogénico.

Esta respuesta puede explicarse por la segunda forma de comportamiento de los tumores a las terapias antiangiogénicas. Y es que una fracción de los pacientes con cáncer presenta una resistencia a las diversas terapias antineoplásicas incluyendo las nuevas terapias antiangiogénicas. Incluso los pacientes con gliomas pueden presentar una refractariedad a estos tratamientos, lo que conlleva a la recidiva del tumor. <sup>46,47,48, 57, 58, 59,60</sup>

Con la aplicación de las terapias antiangiogénicas en los pacientes con gliomas se han demostrado que habría al menos dos mecanismos de resistencia a las terapias antiangiogénicas por parte de este tipo de células tumorales.

Un tipo de pacientes presenta respuesta a la terapia antiangiogénica pero al cabo de un tiempo existe una recidiva del tumor; el cual suele ser más agresivo, de un crecimiento más rápido y además presentan una mayor densidad vascular (por ende un patrón angiogénico más agresivo)<sup>60</sup>

Y existiría una segunda línea de pacientes con gliomas que no responde al tratamiento antiangiogénico siendo en todo momento refractario a este. No presentan disminución de vasos o de tamaño tumoral o un menor patrón de

vascularización en los exámenes imagenológicos, posterior al uso de terapias antiangiogénicas.<sup>57, 58, 59 y 60</sup>

Los mecanismos implicados difieren según el tipo de resistencia desarrollada:

### **Mecanismos de recidiva tumoral y evasión de las terapias antiangiogénicas**

- ) Activación de vías alternas de angiogénesis: Esta es la principal línea de la recidiva tumoral y una de las explicaciones para que la terapia antiangiogénica sea sostenida en el tiempo y no solo un pulso. Los mRNA de factores angiogénicos encontrados posterior a la inhibición con anti-VEGF son: FGF 1 y 2, Efrinas A1 y A2 (Efna1, Efna2) y angiopoyetina1
  
- ) Mecanismos mediados por células estromales y células progenitoras derivadas de la médula ósea: la angiogénesis tumoral recluta diversos tipos de células para el desarrollo de los vasos sanguíneos, como las células derivadas de Medula Ósea (BDMCs), macrófagos y fibroblastos. Estas células que también participan de la biología tumoral participan en la expresión de otros factores mediadores de angiogénesis como el Factor derivado de Células Estromales 1 (SDF-1), citoquinas varias y proteasas. Estas células presentan interacciones complejas en la formación de nuevos vasos siendo menos reactivas a las terapias dependientes del bloqueo de VEGF, sin embargo se presentan también como una nueva vía de terapias antiangiogénicas.<sup>47,48, 60</sup>

- ) Diferenciación Vascular: En ciertos casos los procesos angiogénicos inducidos por el tumor culminan en vasos sanguíneos bien diferenciados, los cuales no se ven influenciados por el uso de terapias Anti-VEGF.<sup>48</sup> O el tratamiento antiangiogénico que se indica, al bloquear el VEGF facilita la maduración de algunos vasos normalizando su morfología e induciendo su cobertura por pericitos. Los cuales evitan la degradación de vasos por parte de los factores antiangiogénicos<sup>60</sup>
- ) Incremento del perfil invasivo del tumor: un fenotipo invasivo del tumor a diferencia de un fenotipo expansivo presenta una menor expresión de factor inducidos por hipoxia y por lo tanto son células que presentan un menor dependencia de la angiogénesis.<sup>48</sup> Además permite a las células acceder a la vasculatura normal del cerebro que no se ve afectada por las terapias antiangiogénicas <sup>59, 60</sup>

### **Mecanismos indiferentes a terapias antiangiogénicas**

- ) Plétora de factores proangiogénicos: puede existir desde un inicio del desarrollo del tumor una concurrencia de factores proangiogénicos, disminuyendo la sensibilidad a la sola inhibición del VEGF. En este caso hay una concurrencia de múltiples factores proangiogénicos como por ejemplo FGF-1 y 2 y angiopoyetinas.<sup>48</sup> Este hecho ha sido particularmente importante en el desarrollo de las nuevas líneas de tratamiento como los inhibidores de tirosin kinasas asociadas a receptores de factores angiogénicos (como el cediranib).<sup>58, 59, 60</sup>

- J Patrón tumoral hipovasacular: si bien la mayoría de los tumores gliales presentan una mayor densidad de vasos como mediada de malignidad, existen algunas líneas tumorales que no necesariamente inducen una mayor proliferación de vasos. Este tipo de tumor no va a presentar respuesta a terapias antiangiogénicas pues suelen crecer en ambientes hipóxicos.
  
- J Crecimiento de vasos por mecanismos alternos: La angiogénesis induce la formación de vasos a partir de otros preexistentes en un mecanismo de “brote” (sprouting). Sin embargo hay otras vías de desarrollo de vasos como la intususcepción y la vasculogénesis desarrollan nuevos vasos sin necesariamente otros preexistentes, estos mecanismos de desarrollo de vasos sanguíneos presentan vías moleculares alternas donde el VEGF juega un papel menor.<sup>48</sup>

Estos mecanismos explican en parte la refractariedad de ciertos gliomas al tratamiento mediado por anticuerpos Anti-VEGF. Además pueden estar implicados en la respuesta angiogénica que se observó en los grupos tratados con LCE tumoral más Anti-VEGF, los cuales presentaron un si bien presentaron un índice angiogénico mayor que los grupos controles no siempre respondieron al bloqueo de VEGF.

Actualmente, junto con la búsqueda de los marcadores tumorales se avanza en los nuevos tipos de terapia antiangiogénica, desde el bloqueo de miRNA asociados a angiogénesis tumoral, el bloqueo específico de Receptores tirosinkinásas de VEGF y otros más noveles como la incorporación de células progenitoras endoteliales como vectores de terapia génica (Ver anexo 7).<sup>47,48,49, 59,</sup>

60

Se reconoce que la debilidad de este estudio esta principalmente en el **n** de pacientes, el cual llegó a 12. Como se expuso en un principio, la falta de centros dedicados al estudio de patología neuroquirúrgica y la dificultad para conseguir el consentimiento adecuado por parte de los pacientes para realizar este tipo de estudios restringió el poder trabajar con un número mayor de casos. Lo cual hubiese permitido a lo mejor poder realizar un mayor número de cruces y generar nuevas líneas de profundización



## Referencias:

1. Valtonen S, Timonen U, Toivanen P, Kalimo H, Kivipelto L, Heiskanen O, Unsgaad G, Kuurne T. "Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high grade gliomas: a randomized double-blind study". *Neurosurgery* 41(1997):44–48
2. Nelson DF, Curran WJ Jr, Scott C, Nelson JS, Weinstein AS, Ahmad K, Constine LS, Murray K, Powlis WD, Mohiuddin M "Hyperfractionated radiation therapy and bis-chlorethyl nitrosourea in the treatment of malignant glioma-possible advantage observed at 72.0 Gy in 1.2 Gy B.I.D. fractions"; report of the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 8302. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:193–207 (1993)
3. W. Risau, "Mechanisms of angiogenesis", *Nature* 386 (1997) 671–674.
4. J. Folkman, in: V. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds.), "Biologic Therapy of Cancer", J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1991, pp. 743–753.
5. J. Folkman, Y. Shing, "Angiogenesis", *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931–10934.
6. J. Folkman, "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 4–6.

7. P. Carmeliet, "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis", *Nat. Med.* 6 (2000) 389–395.
8. D. Hanahan, J. Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis", *Cell* 86 (1996) 353–364.
9. M. Papetti, I.M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis", *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 282 (2002) C947–C970.
10. Janusz Rak,<sup>2</sup> Joanne L. Yu, Robert S. Kerbel, and Brenda L. Coomber, "What Do Oncogenic Mutations Have To Do with Angiogenesis/Vascular Dependence of Tumors?", *CANCER RESEARCH* 62, April 1, 2002, 1931–1934.
11. Shideng Bao et al, "Stem cell-like glioma cells promote tumor Angiogenesis through vascular endothelial growth factor", *Cancer Research* 2006; 66; (16).
12. Saleem I. Abdulrauf et al, "Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patient with low grade astrocytoma", *J. Neurosurg* 88: 513-520, 1998

13. Stockhammer G. et al. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in brain tumor cysts and correlates with tumor progression", Julio 2000, *Acta Neuropathol*, 100(1):101-5.
14. Shingo Takano et al., "Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor in the Serum and Tumor Tissue of Brain Tumor Patients" Mayo 1996, *Cancer Research* 56, 2185-2190.
15. Hannu Aronen et al., "High Microvascular Blood Volume Is Associated with High Glucose Uptake and Tumor Angiogenesis in Human Gliomas", Junio 2000, *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 2189-2200.
16. Li Dao Ke et al., "The Relevance of Cell Proliferation, Vascular Endothelial Growth Factor, and Basic Fibroblast Growth Factor Production to Angiogenesis and Tumorigenicity in Human Glioma Cell Line"s, Junio 2000, *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 2562-2572.
17. K. H. Plate et al., "Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Cognate Receptors in a Rat Glioma Model of Tumor Angiogenesis", Diciembre 1993, *Cancer Research* 53, 5822-5827.
18. Nuzhat Husain et al. "Vascular endothelial growth factor as a marker of disease activity in neurotuberculosis", 2008, *Journal of Infection*, 56, 114-119.

19. Miyagami Mitsusuke and Katayama Yoichi, "Angiogenesis of glioma: evaluation of ultrastructural characteristics of microvessels and tubular bodies (Weibel-Palade) in endothelial cells and immunohistochemical findings with VEGF and p53 protein", 2005, *Med Mol Morphol* 38:36-42.
20. INE, "Principales causas de muerte en Chile por Regiones 1997-2003 CIE-10" INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS 2006
21. DIAZ T, Violeta et al. "Tendencia de la mortalidad por tumores cerebrales malignos en Chile: Análisis de tasas". *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* [online]. 2006, vol. 44, no. 4, pp. 263-270.
22. Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ a.l. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolamide for Glioblastoma". *NEJM* 2005; 352:987-996, Mar 10, 2005.
23. Folkman, J "Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications". 1971 *NEJM* 285; 1182-1186.
24. Castillo JP, Fuenzalida M, Lemus D, Guerrero A. "Actividad antineoplásica y antimetastásica de la asociación de betametasona, sulindac y oxytetraciclina". *Rev Chil Cancerología y Hematología* 2003; 13:41-48.

25. Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. "Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis?" Trends Parasitol. 2005 Apr; 21(4):169-74.
26. Illanes J, Guerrero A, Fuenzalida M, Dabancens A, Zipper J, Lemus D. "Análisis morfológico del proceso angiogénico en MAC". U. De los Andes, Jornadas de anatomía. 1999.
27. Illanes J, Dabancens A, Acuña O, Fuenzalida M, Guerrero A, López C, Lemus D. "Effects of betamethasone, sulindac and quinacrine drugs on the inflammatory neoangiogenesis response induced by polyurethane sponge implanted in mouse". Biol Res 2002; 35:339-345.
28. Lemus D, Dabacens A, Illanes J, Fuenzalida M, Guerrero A, López C. "Antiangiogenic effect of betamethasone on the chick CAM stimulated by TA3 tumor supernatant". Biol Res 2001; 34:227-236.
29. Molina MC, Ferreira V, Valck C, Aguilar L, Orellana J, Rojas A, Ramírez G, Billeta R, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. "An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis". Mol Biochem Parasitol. 2005 Apr; 140(2):133-40.
30. Zuñiga J, Fuenzalida M, Guerrero A, Illanes J, Dabacens A, Días E, Lemus D. "Effect of steroidal and non steroidal drug son the neovascularization

response induced by tumor TA3 supernatant on CAM from chicken embryo”.  
Biol Res 2003;36:233-240

31. Fox Stephen B, Gasparini Giampietro, and Harris Adrian L, “Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs”, THE LANCET Oncology Vol 2 May 2001, 278-289.
32. Goodsell David S., “The Molecular Perspective: VEGF and Angiogenesis”, Stem Cells 2003; 21; 118-119.
33. Papetti Michael and Herman Ira M., “Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis<sup>2</sup>, Am J Physiol Cell Physiol 282: C947–C970, 2002.
34. Veikkola Tanja, Karkkainen Marika, Claesson-Welsh Lena, and Alitalo Kari, “Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1 VEGFR-1”, CANCER RESEARCH 60, January 15, 2000, 203–212.
35. Ferrara Napoleone & Kerbel Robert S., “Angiogenesis as a therapeutic target”, NATURE, Vol 438, 15 December 2005, 967-971.

36. Aasia O. Rehman & Cun-Yu Wang, "Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis", *Trends in Cell Biology* Volume 16, Issue 6, June 2006, Pages 293-300.
37. Khwaja Fatima W., Reed Matthew S, Olson Jeffrey J., et al. "Proteomic Identification of Biomarkers in the Cerebrospinal fluid (CSF) of Astrocytoma Patients". *J Proteome Res.* 2007 February; 6(2): 559–570.
38. Louis David N., Ohgaki Hiroko, Wiestler Otmar D., Cavenee Webster K. "The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System"; *Acta Neuropathology.* 2007 114:97-109
39. Hendrikus G.J. Krouwer, Richard L. Davis, Michael W. McDermott, Takao Hoshino and Michael D. Prados. "Gangliogliomas: a clinicopathological study of 25 cases and review of the literature". *Journal of Neuro-Oncology* 1993.17: 139-154,
40. Rahul N. Sawlani, Jeffrey Raizer, Sandra W. Horowitz, Wanyong Shin, Sean A. Grimm, James P. Chandler, Robert Levy, Christopher Getch, and Timothy J. Carroll, "Glioblastoma: A Method for Predicting Response to Antiangiogenic Chemotherapy by Using MR Perfusion Imaging—Pilot Study". *Radiology,* 255, 622-628 May 2010

41. Rahman Ruman, Smith Stuart, Rahman Cheryl and Grundy Richard, "Antiangiogenic Therapy and Mechanisms of Tumor Resistance in Malignant Glioma", J Oncol. 2010:251231.
42. Friedman Henry S., Prados Michael D., Wen Patrick Y., Mikkelsen Tom, Schiff David, Abrey Lauren E., Yung W.K. Alfred, Paleologos Nina, Nicholas Martin K., Jensen Randy, Vredenburg James, Huang Jane, Zheng Maoxia and Cloughesy Timothy; "Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent Glioblastoma Multiforme"; JCO October 1, 2009 vol. 27 no. 28 4733-4740.
43. Burton EC, Prados MD.; "Malignant Gliomas"; Curr Treat Options Oncol. 2000 Dec; 1(5):459-468.
44. McKnight TR, Lamborn KR, Love TD, Berger MS, Chang S, Dillon WP, Bollen A, Nelson SJ.; "Correlation of magnetic resonance spectroscopic and growth characteristics within Grades II and III gliomas"; J Neurosurg. 2007 Apr; 106(4):660-666.
45. Riddick G, Fine HA.; "Integration and analysis of genome-scale data from gliomas"; Nat Rev Neurol. 2011 Jul 5
46. Lages E, Guttin A, El Atifi M, Ramus C, Ipas H, Dupré I, Rolland D, Salon C, Godfraind C, deFraipont F, Dhobb M, Pelletier L, Wion D, Gay E, Berger F, Issartel JP.; "MicroRNA and target protein patterns reveal



physiopathological features of glioma subtypes”; PLoS One. 2011; 6(5):e20600.

47. Brastianos PK, Batchelor TT.; “Vascular endothelial growth factor inhibitors in malignant gliomas”; Target Oncol. 2010 Sep; 5(3):167-74.

48. Takano Shingo; “Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation”; Brain Tumor Pathol. 2012 Jan 6 [Epub ahead of print]

49. Jun-xia Zhang, Chun-sheng Kang, Lei Shi, Peng Zhao, Ning Liu y Yong-ping You; “Use of Thymidine Kinase Gene-Modified Endothelial Progenitor Cells as a Vector Targeting Angiogenesis in Glioma Gene Therapy”; Oncology 2010;78:94–102

50. Goel Shom, Duda G. Dan, Xu Lei, Munn Lance L., Boucher Yves, Fukumura Dai and Jain Rakesh K.; “Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other disease”; Physiol Rev. 2011 July: 91(3): 1071-1121

51. Ziyad Safiyyah and Iruela-Arispe M. Luisa; “Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis”; Genes & Cancer, December 2011; vol. 2, 12: pp. 1085-1096

52. Krock Bryan L., Skuli Nicolas, and Simon M. Celeste; "Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil"; *Genes & Cancer*, December 2011; vol. 2, 12: pp. 1117-1133
53. Bergers Gabriele and Song Steven; "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance"; *Neuro Oncol.* 2005 October; 7(4): 452–464
54. Wu Y, Lu Y, Chen W, Fu J, Fan R.; "In silico experimentation of glioma microenvironment development and anti-tumor therapy"; *PLoS Comput Biol.* 2012 Feb;8(2):e1002355. Epub 2012 Feb 2.
55. Extraído de <http://www.genome.jp/kegg/> término de búsqueda: "glioma" KEGG id hsa05214 visualizado el 26 de agosto de 2012
56. Singh Mallika and Ferrara Napoleone; "Modeling and predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu"; *Nature Biotechnology* 30,648–657
57. Khwaja FW, Reed MS, Olson JJ, Schmotzer BJ, Gillespie GY, Guha A, Groves MD, Kesari S, Pohl J, Van Meir EG; "Proteomic identification of biomarkers in the cerebrospinal fluid (CSF) of astrocytoma patients"; *J Proteome Res.* 2007 Feb;6(2):559-70.

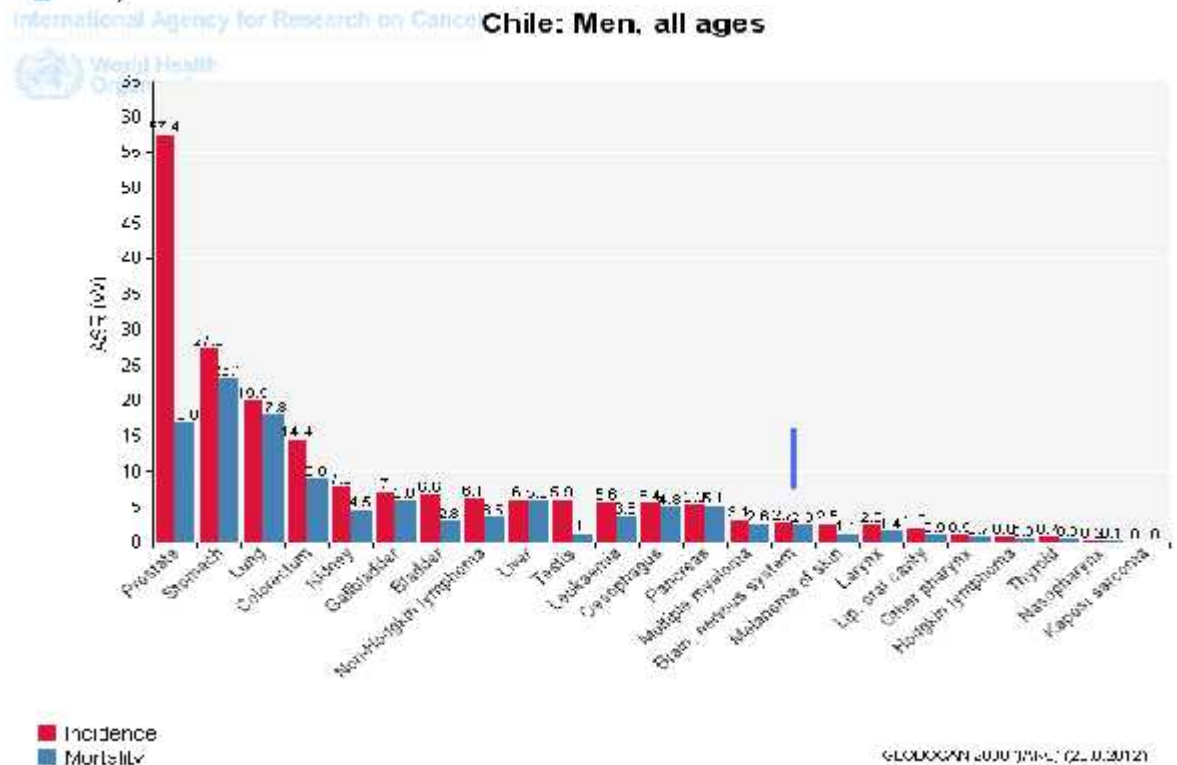
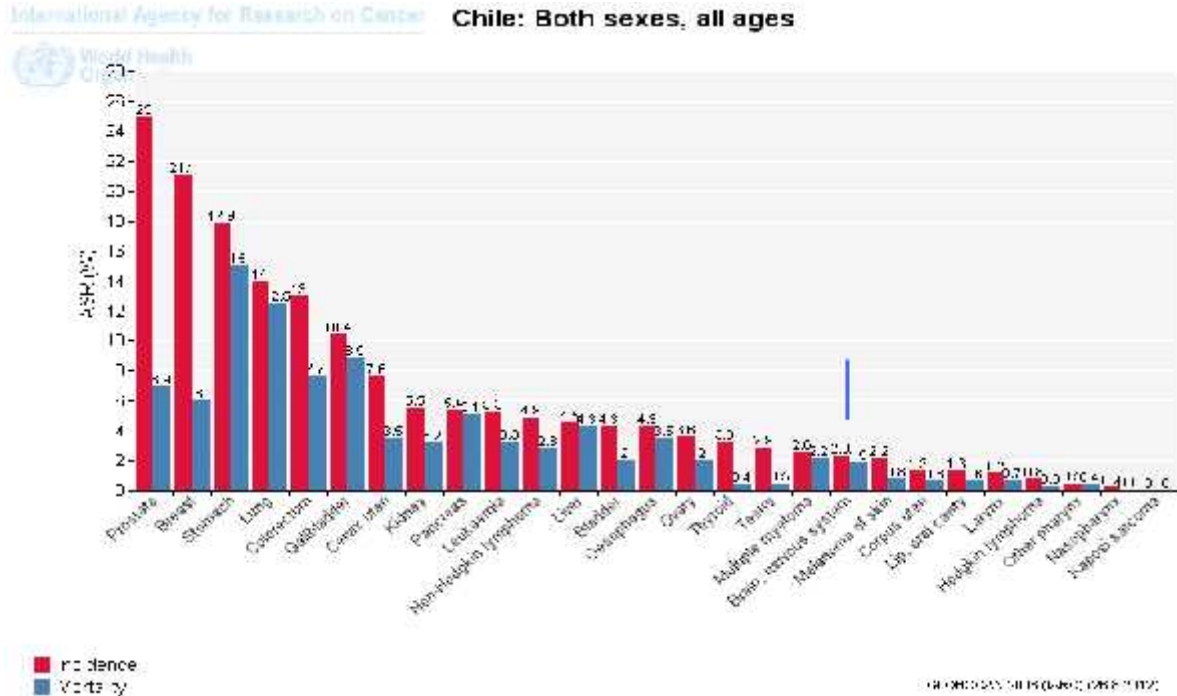
58. Valentina Cea, Carlo Sala, and Chiara Verpelli, "Antiangiogenic Therapy for Glioma," *Journal of Signal Transduction*, vol. 2012, Article ID 483040, 15 pages, 2012.

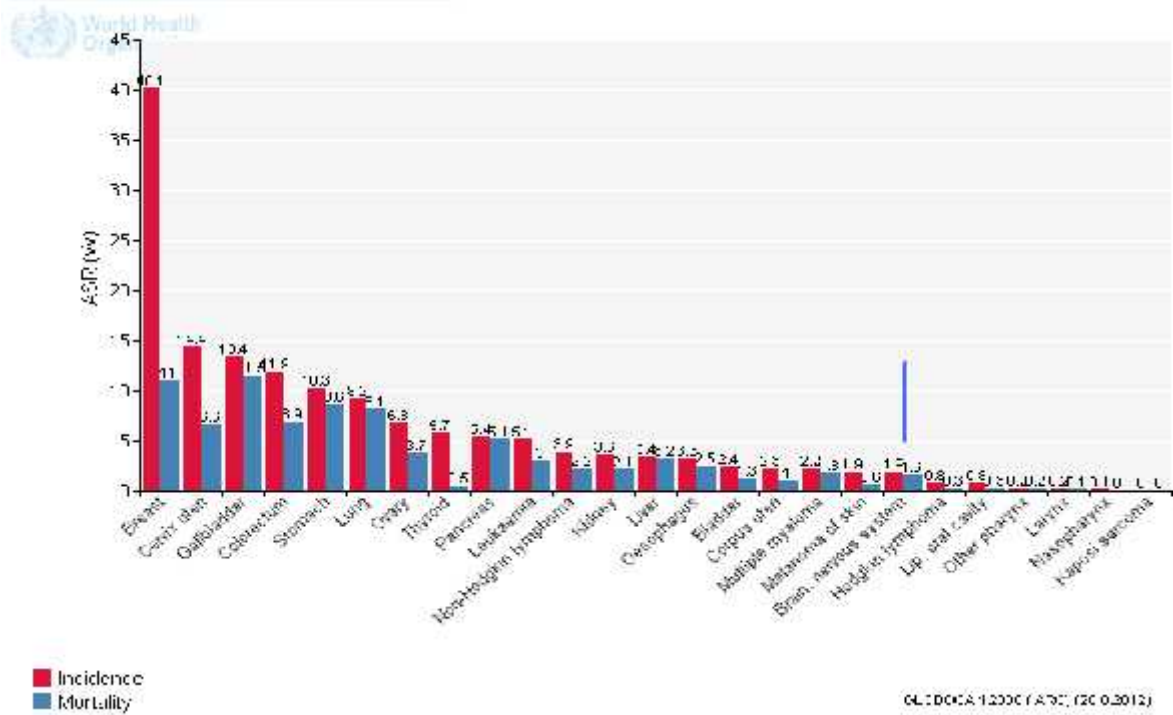
59. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma"; *CA Cancer J Clin*. 2010 May-Jun;60(3):166-93.

# Anexos

## Anexo 1

Gráfico de la tasa incidencia y mortalidad por diagnósticos de tipo de cáncer en Chile. Ambos sexos y separado por género





Fuente: <http://globocan.iarc.fr>, Estimations of Cancer Incidence and Mortality Chile from OMS, acceso a información; Agosto del 2012. Se han marcado con una línea las tasas de incidencia y mortalidad de neoplasias del Sistema nervioso

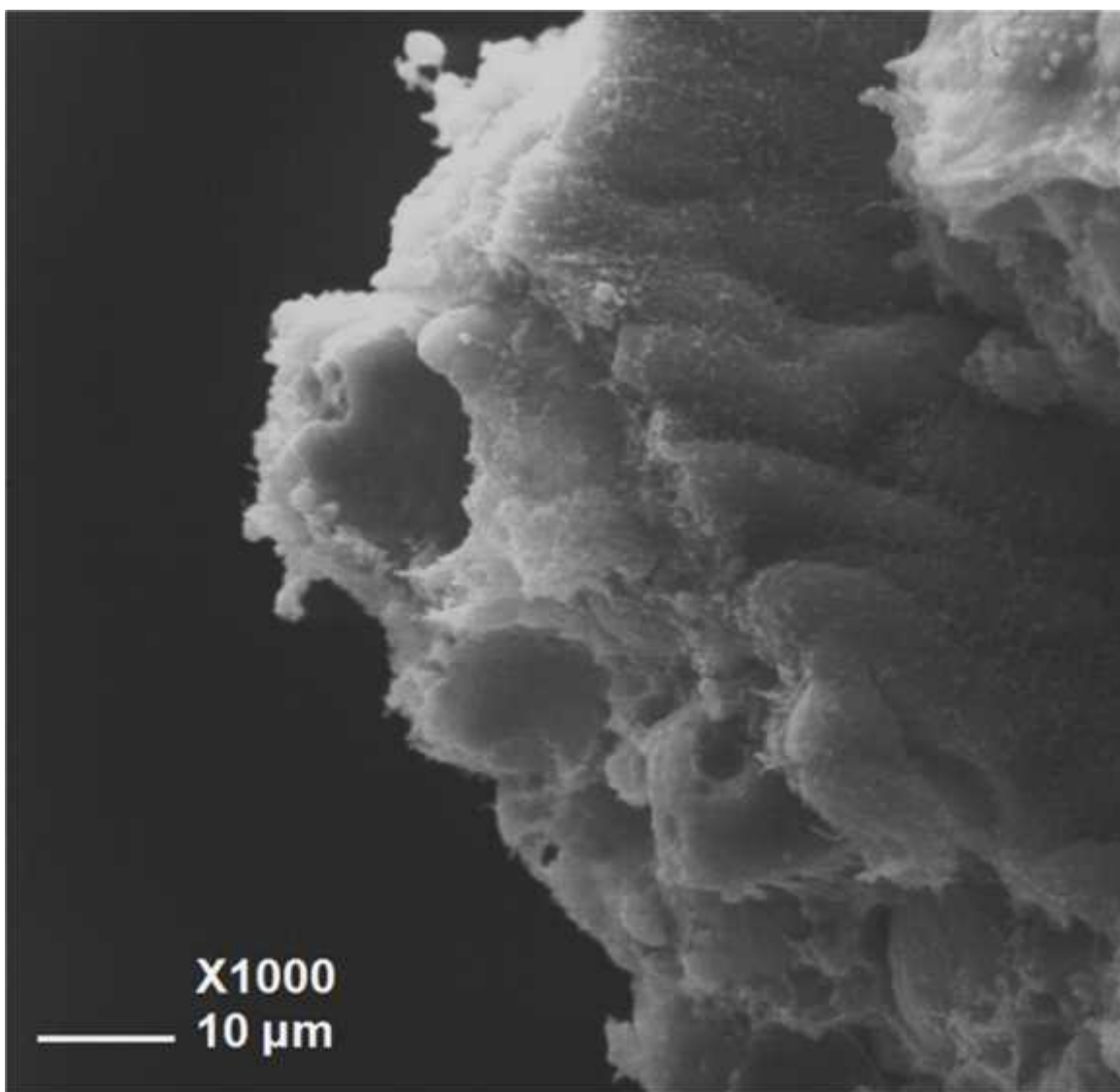
## Anexo 2

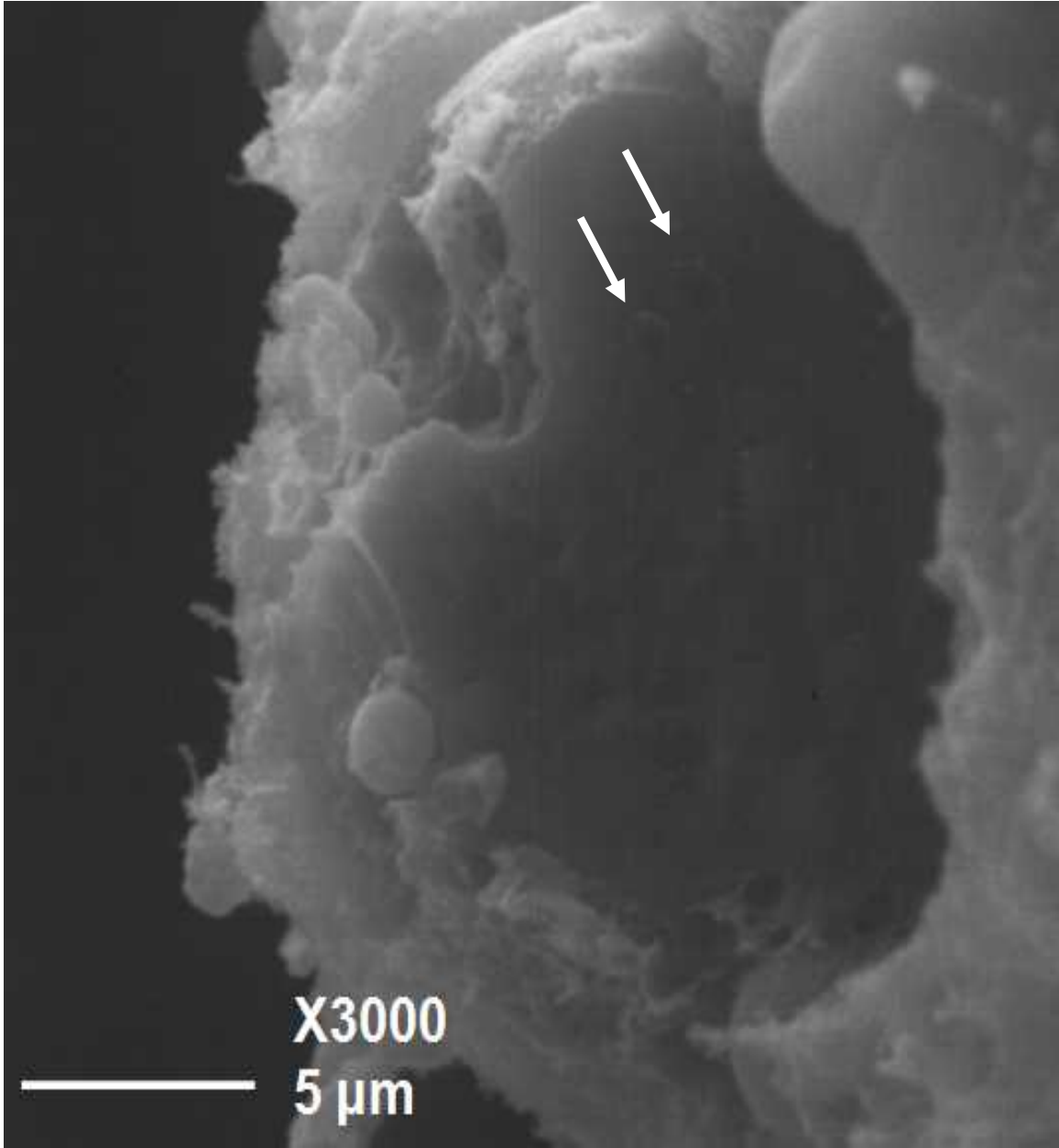
### Clasificación OMS tumores de Sistema Nervioso Central y su clasificación según malignidad<sup>38</sup>

	I	II	III		I	II	III	IV
IV Astrocytic tumours								
Subependymal giant cell astrocytoma	•					•		
Pilocytic astrocytoma	•					•		
Pilomyxoid astrocytoma		•				•		
Diffuse astrocytoma		•				•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•				•		
Anaplastic astrocytoma			•					
Glioblastoma				•				
Giant cell glioblastoma				•				
Gliosarcoma				•				
Oligodendroglial tumours								
Oligodendroglioma		•						
Anaplastic oligodendroglioma			•					
Oligoastrocytic tumours								
Oligoastrocytoma		•						
Anaplastic oligoastrocytoma			•					
Ependymal tumours								
Subependymoma	•							
Myxopapillary ependymoma	•							
Ependymoma		•						
Anaplastic ependymoma			•					
Choroid plexus tumours								
Choroid plexus papilloma	•							
Atypical choroid plexus		•						
Choroid plexus carcinoma			•					
Other neuroepithelial tumours								
Angiocentric glioma	•							
Chordoid glioma of the third		•						
Neuronal and mixed neuronal-gliial tumours								
Gangliocytoma	•							
Ganglioglioma	•							
Anaplastic ganglioglioma			•					
Desmoplastic infantile astrocytoma and	•							
Dysembryoplastic neuroepithelial	•							
Central neurocytoma						•		
Extraventricular neurocytoma						•		
Cerebellar liponeurocytoma						•		
Paraganglioma of the spinal cord				•				
Papillary glioneuronal tumour				•				
Rosette-forming glioneuronal tumour of				•				
Pineal tumours								
Pineocytoma				•				
Pineal parenchymal tumour of intermediate					•	•		
Pineoblastoma							•	
Papillary tumour of the pineal					•	•		
Embryonal tumours								
Medulloblastoma							•	
CNS primitive neuroectodermal tumour							•	
Atypical teratoid / rhabdoid							•	
Tumours of the cranial and paraspinal nerves								
Schwannoma				•				
Neurofibroma				•				
Perineurioma				•	•	•		
Malignant peripheral nerve sheath tumour					•	•	•	
Meningeal tumours								
Meningioma				•				
Atypical meningioma					•			
Anaplastic / malignant						•		
Haemangiopericytoma					•			
Anaplastic haemangiopericytoma						•		
Haemangioblastoma				•				
Tumours of the sellar region								
Craniopharyngioma				•				
Granular cell tumour of the neurohypophysis				•				
Pituicytoma				•				
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis				•				

### Anexo 3

Imágenes obtenidas en el laboratorio de Microscopía electrónica de la Universidad de Chile

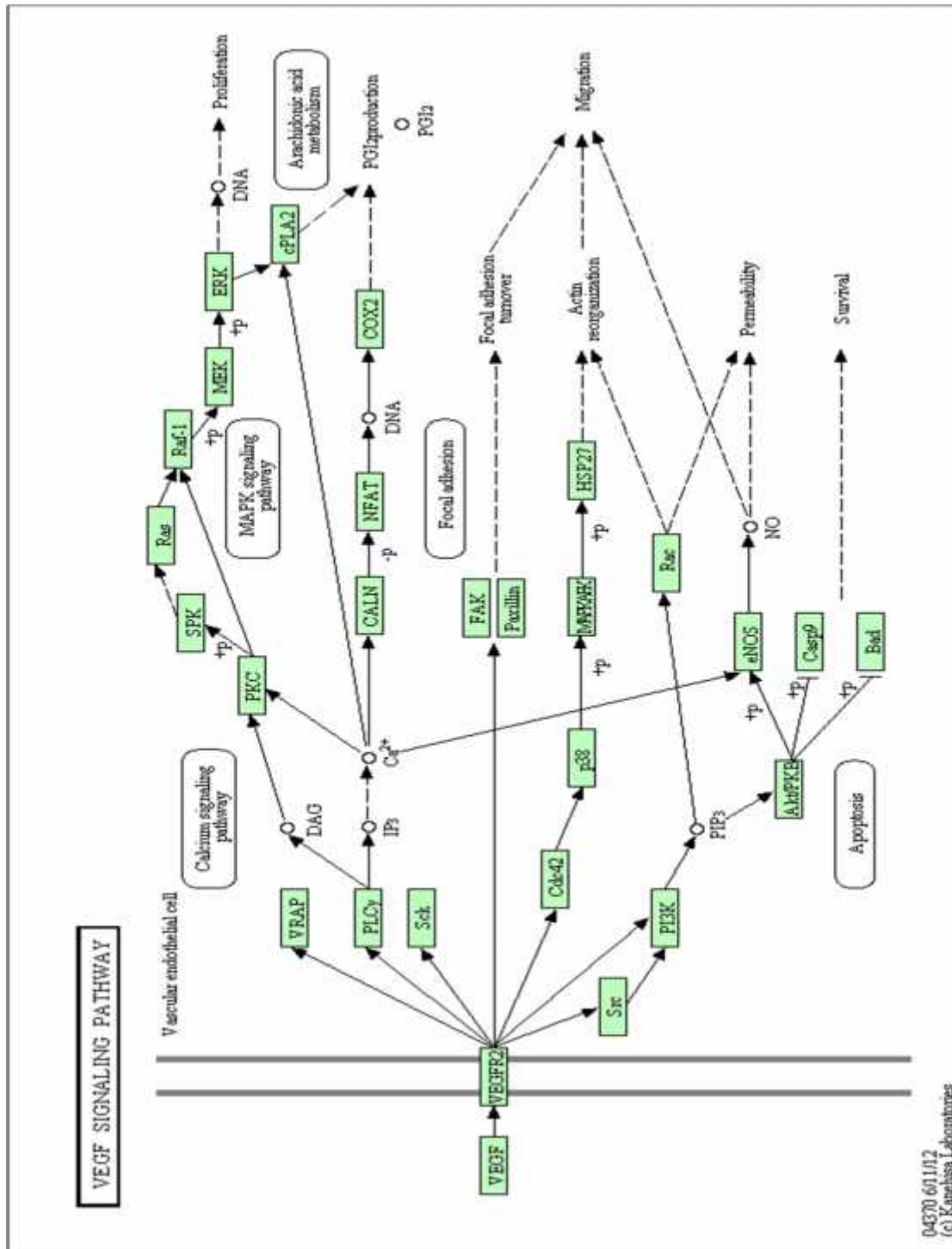






## Anexo 4

Imagen obtenida desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/83066> biosystems pathway. VEGF signaling pathway in *Homo sapiens* KEGG id hsa04370



## Anexo V

**Table 2.** Pro- and Anti-Angiogenic Factors Induced by Hypoxia/Hypoxia-Inducible Factors

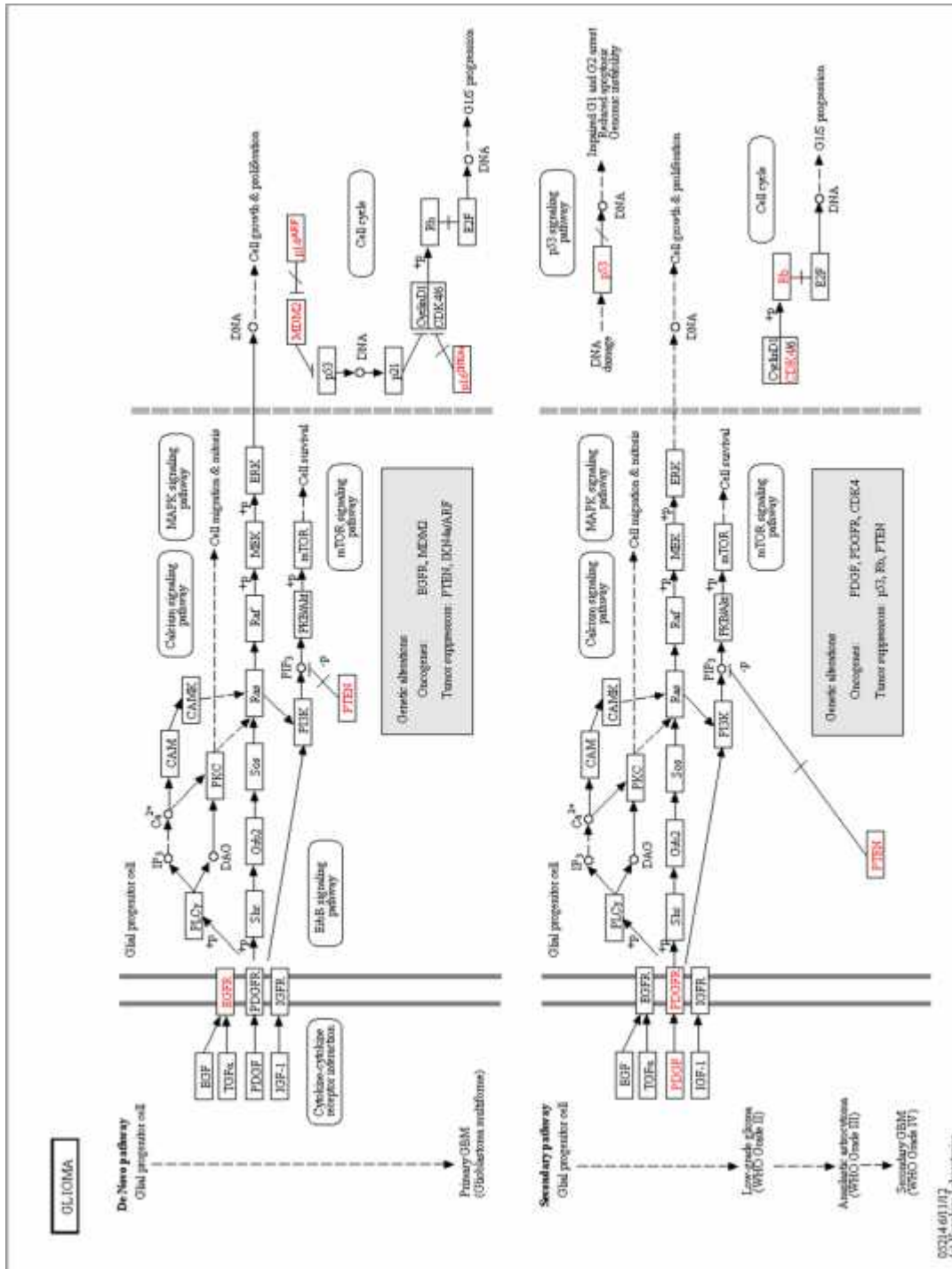
Pro-Angiogenic	Anti-Angiogenic
VEGF Flt-1 (VEGF-R1), Kdr (VEGF-R2)	DLL1-4
Angiopoietin-1/2 (Ang-1/2), Tie-2	Vasohibin-1
ADM	Thrombospondin-1
FGF	Carbonic anhydrase-9 (CA-9)
PLGF	Regulator of G-protein signaling 5
PDGF-B	Angiostatin
SCF	Endostatin
Osteopontin	Canstatin
PAI-1	Interferons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )
MMP, TIMP	
NOS	
COX-2	
Endoglin	
$\beta$ 1B-adrenergic receptor	
Endothelin-1	
Semaphorin 4D	
Integrins, leptin	
Endosialin	
Adenosine A2A receptor	
Oxygen-regulated protein-150	
SDF-1	
Interleukins (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10)	

ADM = adrenomedullin; Ang-1/2 = angiopoietin-1/2; COX-2 = cyclo-oxygenase 2; DLL = delta-like ligand; FGF = fibroblast growth factor; Flt-1 = fms-related tyrosine kinase 1; Kdr = kinase insert domain containing receptor; MMP = matrix metalloproteinases; NOS = nitric oxide synthase; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1; PLGF = placenta growth factor; PDGF-B = platelet-derived growth factor beta; SCF = stem cell factor; SDF-1 = stromal-derived growth factor; Tie-2 = TEK tyrosine kinase endothelial; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGF-R = VEGF receptor.

Extraído desde Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil; Bryan L. Krock, Nicolas Skuli, and M. Celeste Simon; Genes & Cancer, December 2011; vol. 2, 12: pp. 1117-1133

## Anexo 6

Extraído de <http://www.genome.jp/kegg/> término de búsqueda: “glioma” KEGG id hsa05214 visualizado el 26 de agosto de 2012



## Anexo 7

Lista de drogas antiangiogénicas aprobadas o en fase de uso clínico<sup>56</sup>

Drug name	Type	Mechanism of action	Clinical stage	Company
Bevacizumab (Avastin)	Humanized mAb	Blocks VEGF-A binding to receptors	Approved for metastatic CRC, NSCLC, RCC; recurrent GBM	Genentech/Roche (Basel, Switzerland)
Sunitinib (Sutent)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, FLT-3, CSF1R	Approved for metastatic RCC, imatinib-resistant GIST, PNET	Pfizer (New York, NY)
Sorafenib (Nexavar)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, Raf, PDGFRs, KIT	Approved for metastatic RCC, HPOC	Bayer/Onyx (South San Francisco, CA)
Pazopanib (Votrient)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, KIT	Approved for metastatic RCC	GlaxoSmithKline (London, UK)
Vandetanib (Capreisa)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, EGFR	Approved for metastatic medullary thyroid cancer	AstraZeneca (London, UK)
Axitinib (Inlyta)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, KIT	Approved for RCC that failed first-line therapy	Pfizer (New York, NY)
Aflibercept (Zaltrap)	Chimeric soluble receptor	Binds VEGF-A, VEGF-B and PlGF	Phase 3 multiple tumor types	Regeneron/Sanofi-Aventis (Paris)
AGM396	Peptidobody	Binds Angiopoietin-1 and -2	Phase 3 multiple tumor types	Amgen (Thousand Oaks, CA)
Motesanib	Small-molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, KIT	Phase 3 multiple tumor types	Amgen
Cediranib (Recentin)	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, KIT	Phase 3 multiple tumor types	AstraZeneca
Cabozantinib	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFR, cMET, RET, KIT	Phase 3 multiple tumor types	Exelixis (South San Francisco, CA)
Tivozanib	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, PDGFRs, KIT	Phase 3 metastatic RCC	Aveo (Cambridge, MA)
Regorafenib	Small molecule RTK inhibitor	Inhibits signaling of VEGFRs, Raf, PDGFRs, KIT	Phase 3 relapsed CRC and other tumors	Bayer/Onyx
Ramucirumab	Human mAb	Blocks VEGFR-2 signaling	Phase 3 multiple tumor types	ImClone/Lilly (Indianapolis, IN)
Cilengitide	Cyclic peptide	Blocks $\alpha v$ integrins	Phase 3 GBM	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
Volociximab	Chimeric mAb	Blocks $\alpha 5 \beta 1$ integrin	Phase 2 multiple tumor types	PDL/Biogen Idec (Cambridge, MA)
IMC-18F1	Human mAb	Blocks VEGFR-1 signaling	Phase 2 multiple tumor types	ImClone/Lilly
TB-403	Humanized mAb	Blocks PlGF binding to VEGFR-1	Phase 2 multiple tumor types	Thrombogenix/Roche
Anti-EGFL7	Humanized mAb	Blocks EGFL7, a protein implicated in vascular maturation	Phase 2 multiple tumor types	Genentech/Roche

TKI, tyrosine kinase inhibitor; CRC, colorectal cancer; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; GBM, glioblastoma multiforme; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HPOC, hepatocellular carcinoma.

**Tabla 1**

<b>Resumen de pacientes incluidos en el estudio</b>	<b>N° pacientes</b>	<b>Media</b>	<b>Error Típico</b>
<b>Gliomas</b>	<b>12</b>	<b>3,758</b>	<b>0,04</b>
<b>Astrocitomas</b>	<b>4</b>	<b>3,693</b>	<b>0,069</b>
Astrocitomas de bajo grado	2	3,675	0,01
Astrocitoma de alto grado y glioblastomas	2	3,712	0,096
<b>Oligodendroglioma</b>	<b>4</b>	<b>3,84</b>	<b>0,069</b>
Oligodendroglioma de bajo grado	3	3,921	0,079
Oligodendroglioma de alto grado	1	3,6	0,141
<b>Tumor de plexo coroideo</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Epéndimomas</b>	<b>1</b>	<b>4,353</b>	<b>0,152</b>
<b>Gangliogliomas</b>	<b>3</b>	<b>3,537</b>	<b>0,075</b>
LCE control	5	2,14	0,0404
Control SF	5	2,07	0,053

**Tabla 2**

<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>N° pacientes</b>	<b>Media</b>	<b>Error Típico</b>
<b>Sin tratamiento previo</b>	<b>7</b>	<b>3,787</b>	<b>0,0598</b>
<b>Radioterapia</b>	<b>1</b>	<b>3,835</b>	<b>0,125</b>
<b>Quimioterapia</b>	<b>2</b>	<b>3,703</b>	<b>0,0932</b>
<b>Radio-quimioterapia</b>	<b>2</b>	<b>3,539</b>	<b>0,0882</b>