

SOBRE-EXPRESIÓN DEL FACTOR ENDOTELIAL DE CRECIMIENTO VASCULAR EN BLASTOS LEUCEMICOS E IMPLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Over expression of vascular endothelial growth factor in leukaemic blasts and implication for the treatment of acute myeloid leukaemia

Federico Ludwig Herrera Alemán

Klinikum Lüdenscheld, Lüdenscheld, Alemania

RESUMEN. Antecedentes: El factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF) y su receptor celular VEGFR-2 ya han sido implicados en la vía endotelial principal necesaria para la neovascularización tumoral. Aún así, la importancia del sistema VEGF/VEGFR-2 en angiogenesis en tumores hematológicos como la leucemia mieloide aguda (LMA) no ha sido dilucidado. **Pacientes y métodos:** Evaluación de 32 pacientes con diagnóstico nuevo y no tratado de LMA, mediante inmunohistoquímica de biopsias de médula osea, se hizo comparación con 10 pacientes control. **Resultados:** La expresión de VEGF y VEGFR-2 fue significativamente mayor en pacientes con mayor grado de densidad microvascular comparado con aquellos con bajo grado (VEGF: $p=0.024$; VEGFR-2: $p=0.040$) y también mayor que en los controles ($P>0.001$), mostrando correlación con la densidad microvascular de médula osea. Los pacientes que alcanzaron una remisión completa después de quimioterapia mostraron niveles bajos normales de VEGFR-2. **Conclusión:** Se encontró evidencia sobre la aumentada expresión de VEGF/VEGFR-2 en blastos leucémicos, así como la correlación con angiogenesis de pacientes con LMA. Esto sugiere que el sistema VEGF/VEGFR-2 puede ser utilizado como objetivo prometedor en las estrategias de terapia antiangiogénica y antileucémica en LMA. **Rev Med Hondur 2010;78(3):113-168.** **Palabras clave:** VEGFR-2, angiogenesis; leucemia mieloide aguda.

La angiogenesis, un proceso complejo en el cual nuevos microvasos se forman a partir de los vasos preexistentes es un requerimiento absoluto para la viabilidad y crecimiento de tumores sólidos.¹ La información reciente sugiere el involucramiento de angiogenesis en la fisiopatología de las enfermedades tumorales hematológicas. Recientemente varios autores hemos reportado un aumento de la angiogenesis en la médula osea de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA)²⁻¹³ y la normalización de la densidad microvascular en la médula osea en pacientes que alcanzaron una Remisión Completa (CR) después de quimioterapia.³ De similar forma, el aumento de la densidad microvascular de la médula osea ha sido descrita en pacientes con Síndrome Mielodisplásico (MDS) y Mieloma Múltiple⁴⁻⁷ así como la Leucemia Linfocítica en niños y Leucemia Linfocítica de Células B en adultos⁸⁻⁹ y más recientemente el Linfoma no-Hodgkin (NHL).¹⁰

La angiogenesis tumoral depende de la expresión de mediadores específicos que inician la cascada de eventos que guían a la formación de nuevos microvasos.¹¹ Entre estos el Factor Endotelial de Crecimiento Vascular (VEGF) juega un rol importante en la inducción de la neovascularización de tumores sólidos.¹² Se sugiere también que niveles elevados de VEGF contribuyen al pronóstico adverso de pacientes al promover el crecimiento celular, la supervivencia y migración de células leucémicas así como reduciendo la sensibilidad de las células leucémicas a agentes inductores terapéuticos.¹³ La expresión de VEGF está asociada con angiogenesis, la agresividad tumoral o pronóstico pobre en variados tumores humanos incluyendo mama, intestino, pulmón, estómago, riñón y cáncer orofaríngeo.¹³⁻²⁰

El VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), Receptor 1 y 2 del Factor Endotelial de Crecimiento Vascular, son los 2 principales receptores en la vía de la tirosin quinasa que median los efectos biológicos varios del VEGF.¹² Estudios en homocigotos genéticamente alterados sugiere que la expresión de VEGFR-2 es importante para la vasculogenesis y angiogenesis mientras VEGFR-1 podría jugar un rol más en la remodelación vascular.²¹⁻²² Más aun, bloqueando la recepción del VEGFR-2 resultó en inhibición del crecimiento y metástasis tumoral en modelos con animales²³⁻²⁵ y el crecimiento del Glioblastoma fue inhibido en ratones negativamente dominantes para VEGFR-2.²⁶

Por otro lado ya hay datos recientes que sugieren un importante rol del VEGF en tumores hematológicos. Ha sido demostrado que muchas de las líneas celulares leucémicas humanas expresan VEGF.²⁷⁻²⁸ Se ha encontrado que los blastos de la LMA y las células B de la Leucemia Linfocítica Crónica aislados producen y secretan VEGF.²⁷⁻²⁹ Un reciente estudio ha mostrado que la expresión de VEGF está restringida a mieloblastos y elementos mieloides inmaduros en subtipos de MDS³⁰ y el VEGF ha sido encontrado en rangos elevados en pacientes con mielofibrosis idiopática.³¹

Más aun, en una serie de 99 pacientes nuevos diagnosticados con LMA, Aguayo et al³² encontraron que el aumento celular de VEGF es un factor independiente de mal pronóstico en pacientes con LMA. El VEGF del tipo C es otro miembro de la familia de los factores de crecimiento vascular endotelial que es expresado por blastos leucémicos en una proporción significativa de pacientes con LMA.³³

En el pasado se pensó que el VEGFR-2 era expresado exclusivamente por células endoteliales adultas, pero se ha demostrado recientemente que el VEGFR-2 está presente en subseries de células hematológicas pluripotenciales primitivas,³⁴ así como en algunas líneas celulares leucémicas y blastos aislados de pacientes

Recibido 06/2010, aceptado con modificaciones 05/08/2010

Correspondencia: Dr. Federico Ludwig Herrera Alemán, Klinikum Lüdenscheld, Paulmannshöher Str. 14, 58515 Lüdenscheld, Alemania. Correo-E: fludwig05@yahoo.de

con LMA.^{27,28,36} En contraste, Bellamy et al³⁰ no pudieron detectar la expresión de VEGFR-2 en blastos de LMA desarrollando inmunohistoquímica en biopsias de coágulos de médula ósea. Entonces, el rol de la expresión de VEGFR-2 en LMA sigue siendo controvertido.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la expresión de VEGF/receptores-VEGF y su relación con la angiogénesis en la médula ósea de pacientes adultos nuevos, diagnosticados y no tratados por LMA. Además, evaluamos la expresión de VEGF y sus dos receptores en la médula ósea de pacientes después de recibir quimioterapia.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se seleccionó al azar a 32 de 62 pacientes con diagnóstico nuevo de LMA no tratada diagnosticada en la Klinikum Lüdenscheld de Alemania. En dichos pacientes, el grado de angiogénesis de la médula ósea al momento de presentación ya fue publicado previamente.³ Su rango de edad fue de 21 a 78 años. Se utilizó las muestras de médula ósea de dichos pacientes. Se tomó un subgrupo representativo del grupo original de 62 pacientes, haciendo la elección al azar ajustada a la frecuencia de distribución de los subtipos de LMA más comunes de acuerdo a la definición del Grupo Cooperativo Francés-Americano-Inglés (FAB).³⁷ Debido a la poca frecuencia de los tipos MO, M3 y M6 en el grupo original FAB, los mismos fueron excluidos de la elección para evitar sesgos potenciales.

Se utilizó las muestras de 10 controles no seleccionados que fueron tomados de un grupo original de 22 pacientes quienes han sido analizados previamente respecto la densidad microvascular en la médula ósea.³ Estos controles consistieron en pacientes adultos de 17 a 77 años con diferentes enfermedades previamente diagnosticadas pero con morfología medular ósea normal, demostrada por citología y análisis histológico. De todos los pacientes con LMA y los controles se obtuvo una biopsia de médula ósea (cresta ilíaca) para diagnóstico histológico en el día de presentación (día 0). Del subgrupo de 8 pacientes con LMA, se obtuvo biopsias adicionales en el día 16 después de la quimioterapia de inducción (médula ósea hipoplásica) y al momento de la remisión completa. Después de cada biopsia, se obtuvo un aspirado de médula ósea través de punciones separadas con fines de análisis citológicos.

Los resultados de la expresión del VEGF los pacientes fueron comparados con el grado de expresión en biopsias de médula ósea de 10 pacientes con otras enfermedades variadas que tenían una médula ósea de morfología normal. No se usó como control tejidos que fueran de pacientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin o carcinoma de riñón.

Tinción inmunohistoquímica

Las muestras de médula ósea fueron fijadas en paraformaldehído, decalcificadas con EDTA e impregnadas en parafina. Se estudiaron inmunohistoquímicamente cortes seriados (4-µm-grosor) de cada muestra para determinar la expresión del VEGF y sus receptores mediante anticuerpos de conejo policlonales anti-human VEGF. La coloración de inmunohistoquímica fue realizada con la técnica alcalina fosfatasa / antialcalina fosfatasa en doble puente. Los cortes de tejido fueron desparafinados en xilol y rehidratados

en una serie de etanol graduado. Las muestras fueron pretratadas para promover la recaptación antigénica en un microondas a 400W, 2 veces por 7 minutos en 10 mmol/l citrato sódico, pH 6.0. Los anticuerpos primarios fueron agregados durante la noche a 4 grados centígrados. Los pasos subsiguientes fueron realizados de acuerdo a las instrucciones de manufactura (Dako). El substrato fast red (Dako) suplementado con levamisol fue utilizado para revelar la actividad de la fosfatasa.

Como se publicó previamente, los cortes adjacentes de cada una de las muestras de médula ósea procesadas en este estudio fueron previamente teñidas inmunohistoquímicamente con marcadores específicos de las células endoteliales (Factor Antihumano de Von Willebrand y anticuerpos anti-human trombomodulina) para el análisis de densidad microvascular (siglas en inglés, MVD).³ La media de MVD en los 32 pacientes LMA fue de 22.4 (LQ-HQ: 19.2-28.8) microvasos/500x (aumento) y 12.2 (10.6-14.3) microvasos/500x en los diez pacientes control respectivamente. La MVD corresponde al número promedio de microvasos contados en los campos de aumento 500x usando microscopio de luz.³

Análisis de expresión de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2

La coloración inmunológica fue realizada simultáneamente por dos investigadores experimentados usando microscopía de luz. Los investigadores actuaron en ciego respecto de las características clínicas de los pacientes y conteo de los vasos microscópicos en la médula ósea al realizar la evaluación del factor de crecimiento. La expresión de las proteínas VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 fue evaluada en forma semicuantitativa valorando la proporción e intensidad de las células teñidas de acuerdo a métodos publicados, con las modificaciones apropiadas.^{17,38-39}

Primero, se hizo escaneo todo el corte de la médula ósea en aumentos de 100x y 250x y del porcentaje de células positivas teñidas con cada anticuerpo específico dentro de áreas celulares fue estimado de acuerdo a una escala de 3 grados (1 = < 10 % células positivas, 2 = 10-50 % células positivas, 3 = > 50 % de células positivas). Subsecuentemente, la intensidad de la tinción positiva fue evaluada en 3 campos representativos de 500x seleccionados en cada corte después del estudio inicial en aumentos de 100x y 250x. El grado de intensidad de la tinción celular dentro de los campos fue definido de la siguiente manera: 1 = muy escaso o negativo, 2 = < 50 % células con tinción moderada, 3 = > 50 % células con tinción moderada, 4 = < 50 % células con tinción intensa, 5 = > 50 % células con tinción intensa.

Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias (AU). En cada muestra de las biopsias, la expresión de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 fueron evaluadas en dos a tres cortes, procesados y evaluados por inmunohistoquímica en forma independiente y calculando el valor medio. Evaluamos la tinción solo dentro del área celular como ya previamente descrito para el conteo de microvasos en la médula ósea, ya que las áreas no celulares (tejido óseo, grasa, áreas de tejido conectivo y áreas de necrosis) carecen de microvasos, lo que podría entorpecer los resultados y la comparación entre VEGF y sus receptores y el grado de angiogénesis en muestras de médula. Las áreas de tinción adjacente al hueso o tejido conectivo denso fueron excluidas, debido a que la vascularización no es representativa de angiogénesis en estas áreas.³

Cuantificación de la infiltración de blastos leucémicos y los criterios de respuesta a la quimioterapia

Se realizó análisis cuantitativos de la infiltración de blastos leucémicos en aspirados de médula ósea en análisis citológicos de rutina descritos por el grupo colaborativo FAB.³⁷ La remisión completa fue definida como la médula ósea con hematopoyesis normal de todas las líneas celulares con menos de 5 % células blásticas y conteos celulares periféricos como mínimo 1500 neutrofilos/ μ l y 100,000 plaquetas/ μ l.⁴⁰

Análisis de datos

Los datos se presentan como grupos individuales o como mediana, rangos intercuartiles (low quartile-high quartile (LQ-HQ)). La diferencia en la expresión de VEGF, VEGFR-1, ó VEGFR-2 entre grupos LMA y control, así como entre pacientes LMA con densidad microvascular alta y baja fueron analizados con el test de Mann-Whitney Rank Sum, para grupos independientes.^{3,41,42} El test Wilcoxon fue utilizado para comparar la expresión de proteína en la médula ósea de pacientes individuales al momento del diagnóstico y después de la quimioterapia de inducción. Dos valores de P menores de 0.05 fueron considerados significativos, se utilizó correcciones para el número de comparaciones (Bonferroni test) cuando fueron requeridas (datos totales no mostrados).

Aspectos éticos

Todos los pacientes fueron previamente informados sobre el estudio. Se cumplió con todas las regulaciones éticas alemanas para este proyecto.

RESULTADOS

Las características de los pacientes y los controles se describen en el Cuadro 1. El antígeno de VEGF fue consistentemente detectado en cada muestra de médula ósea de pacientes con LMA, así como en los pacientes control. Las áreas de tinción positiva homogénea para VEGF estaban ampliamente distribuidas en las regiones celulares de las muestras de médula ósea de pacientes con LMA al día de presentación. Treinta pacientes mostraron extensiva tinción para VEGF, mientras que solo dos pacientes mostraron áreas limitadas para tinciones de VEGF. En los casos con linfoma

no Hodgkin y carcinoma de riñón, la médula ósea no se encontró involucrada histológicamente (Cuadro 1).

La tinción proteica del VEGF de las 32 muestras de médula ósea de paciente LMA alcanzó un rango de 1.1 a 9.0 AU con un valor medio de 4.2 Unidades Arbitrarias (AU) (LQ-HQ : 3.1-6.1), mientras las muestras en pacientes control (n=10) mostraron tinciones de la proteína VEGF significativamente débil (media, LQ-HQ : 2.9, 2.5-3.3 AU ; Mann-Whitney test, p= 0.01).

La médula ósea de pacientes con LMA se tiñó positivamente para el receptor de membrana celular asociado tirosinquinasa VEGFR-1 y VEGFR-2. Sin embargo, la intensidad de la tinción para VEGFR-1 y VEGFR-2 fue diferente. Nueve pacientes (28 %) presentaron una tinción muy leve o negativa para VEGFR-1 (rango < 1.5 AU). En contraste 31 de 32 pacientes presentaron una tinción fuerte y solo un paciente presentó una tinción débil para VEGFR-2 (rango 1.4 AU). La tinción positiva para VEGFR-2 fue citoplasmática y con acentuación de la membrana. La expresión de proteína VEGFR-1 presentó una distribución heterogénea dentro del área celular en los cortes de médula con un patrón de tinción celular similar a los controles. Un patrón de tinción diferente se observó para VEGFR-2, positiva, en forma uniforme y ampliamente distribuida a través de la región celular en los cortes de médula de pacientes con LMA. En general, se observó más área con tinción positiva para VEGFR-2 que para VEGFR-1.

Congruentemente, la expresión de proteína VEGFR-1 en la médula ósea de pacientes AML mostró rangos de tinción leves (media, (LQ-HQ) : 1.8 (1.4-2.7) AU) sin variación significativa respecto de los resultados mostrados por las muestras control 2.7 (1.6-3.6) AU; Mann-Whitney test, p = 0.224). En contraste, los cortes de médula ósea de pacientes con LMA mostró rangos significativamente elevados para VEGFR-2 respecto del grupo control (media (LQ-HQ):AML, 3.8 (2.3-6.3) AU; controles, 1.8 (1.3-1.9) AU ; Mann-Whitney test (p< 0.001).

La médula ósea de los pacientes con LMA mostró frecuentemente alta infiltración por células blásticas. El porcentaje medio (LQ-HQ) de blastos fue de 83 % (50-90 cel.). Así, la proteína de VEGF y sus receptores fueron detectada en forma consistente en los blastos leucémicos de las muestras de médula ósea. Los rangos medios de tinción (LQ-HQ) para VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en relación a los subtipos LMA-FAB se muestran en el Cuadro 2. Los análisis estadísticos no revelaron diferencias significantes en esta expresión del VEGF, tampoco de sus receptores entre los cuatro subtipos de LMA considerados para análisis.

La expresión de VEGF y VEGFR-2 en la médula ósea mostró estar relacionada a los rangos de densidad microvascular (MVD) en el grupo de pacientes con LMA, así como en toda la población del estudio (32 pacientes con LMA y 10 pacientes control). En contraste, los valores medios para VEGFR-1 no mostraron diferencias significativas entre pacientes con LMA con alta y baja MVD, tampoco en los pacientes control. Más aún, se observó una correlación positiva de la expresión de VEGF en la médula ósea con el grado de MVD (rs = 0.566 para 32 pacientes en LMA y 10 pacientes control, p<0.001). El conteo de microvasos también se correlacionó con los rangos de tinción para VEGFR-2 pero no para VEGFR-1.

De los 32 pacientes con LMA investigados, 22 alcanzaron una completa remisión (CR) después de recibir quimioterapia estandar

Cuadro 1. Características de los pacientes con LMA y los pacientes control estudiados.

	Pacientes con LMA (n = 32)	Pacientes control (n = 10)
Edad (años) ^a	64 (21-78)	54 (17-77)
Sexo (masculino/femenino)	18 / 14	7 / 3
FAB (distribución ^b)	5 M1, 13 M2, 6 M4, 8 M5	-
% blastos leucémicos ^a (médula ósea)	83 % (50-90)	-
Enfermedad	-	Linfoma no Hodgkin, n=1 Carcinoma renal, n=1 Enfermedad no maligna, n=8

^aMediana (rango)

^bFrench-American-British classification for AML³⁷

Cuadro 2. Grados de tinción para expresión de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 según los subtipos de leucemia

Subtipos de leucemia mieloide aguda	Casos	VEGF (AU) ^a	VEGFR-1 (AU) ^a	VEGFR-2 (AU) ^a
M1	5	2.9 (2.2-4.4)	1.4 (1.0-1.5)	5.3 (4.7-5.9)
M2	13	4.0 (3.3-4.9)	2.7 (1.5-3.5)	4.4 (2.9-7.0)
M4	6	6.6 (5.7-7.0)	1.9 (1.6-2.1)	2.7 (2.2-3.8)
M5	8	4.1 (3.7-5.6)	1.8 (1.5-2.2)	3.6 (2.3-4.1)
Pacientes control	10	2.9 (2.5-3.3)	2.7 (1.6-3.6)	1.6 (1.3-1.9)

^alos valores representan media y rango intercuartil de Unidades arbitrarias (AU). Análisis de significancia para todas las diferencias entre los subtipos de LMA.

^bsubtipos de LMA de acuerdo a la clasificación de French-American-British³⁷

de acuerdo a los protocolos AMLCG.⁴³ La expresión de VEGF o sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en la médula ósea de los pacientes al día de presentación no mostraron diferencias significativas respecto de los niveles de los mismos en la médula ósea de los pacientes que no alcanzaron una remisión completa.

Para estudiar el efecto de la quimioterapia en la expresión de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 se tomaron biopsias subsiguientes de ocho pacientes AML en el día 16 después de la quimioterapia de inducción usando el protocolo TAD (dosis estandar de Citabine, daunorubicina y 6-tioguanina)⁴³ y al momento de alcanzar la remisión completa (Cuadro 3). Las comparaciones individuales entre las biopsias tomadas en el día 16 y al día de presentación (día 0) no mostraron diferencias significativas en los rangos de tinción de VEGF ($p=0.09$, Wilcoxon test). La expresión de VEGF persistió elevada en las biopsias de médula ósea tomadas a los pacientes después de alcanzar la remisión completa.

Cuadro 3. Expresión del VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 en el día de presentación y después de la quimioterapia de inducción

Momento	VEGF (AU) ^a	VEGFR-1 (AU) ^a	VEGFR-2 (AU) ^a
Día 0	4.4 (3.2-4.9)	1.3 (1.0-1.3)	4.2 (2.4-6.9)
Día 16	2.9 (2.6-3.9)	1.3 (1.2-1.8)	1.3 (1.2-1.8)
Remisión completa (CR)	4.4 (3.8-5.1)	2.0 (1.5-2.7)	1.3 (1.3-1.3)

^alos valores representan mediana y rangos intercuartiles de unidades arbitrarias (AU). La diferencia en los niveles de VEGFR-1 entre las médulas óseas al día de presentación (día 0) y remisión completa (CR) fueron significativos ($p=0.014$; Wilcoxon test). Los niveles disminuidos de VEGFR-2 fueron significativos al día 16 y al momento de la remisión completa comparado con niveles al día 0 ($p=0.009$; Wilcoxon test). Nivel de significancia aceptada acorde con el procedimiento de Bonferroni fue de $p<0.025$.

DISCUSION

El presente análisis inmunohistoquímico de biopsias de médula ósea ha documentado claramente la expresión elevada de VEGF y su receptor VEGFR-2 en células blásticas leucémicas en pacientes nuevos diagnosticados y no tratados por LMA. En la literatura médica ya se ha reportado antes la expresión de VEGF y VEGFR-2 en células blásticas aisladas de pacientes con LMA, así como en líneas celulares de LMA.^{2, 27,28,32} Nuestro reporte demuestra un incremento significativo de los niveles de VEGF y VEGFR-2 in situ en la médula ósea de pacientes con LMA comparados con pacientes control. Además, la médula ósea del 70 % de los pacientes con LMA mostró 1.5 a 6.0 folios mayor expresión de VEGFR-2 que la media del grupo control.

Estos datos son consistentes con evidencia publicada recientemente sobre la actividad angiogénica aumentada en pacientes con LMA.^{2-4,10,13,32} Los estudios existentes con tumores sólidos en los cuales VEGF y su receptor celular VEGFR-2, implica a la vía endotelial como clave para la neovascularización tumoral.²⁶ En contraste, hay poca información sobre la importancia de estos receptores angiogénicos de los factores de crecimiento endotelial en patología maligna hematológica.

Nuestros hallazgos correlacionan con reportes de proteína VEGF elevada en blastos de LMA primario comparado con células mononucleares normales de médula,²⁷ así como elevación en plasma⁴ y VEGF celular en pacientes con LMA comparados con pacientes control.^{10,13,32} Otros estudios han demostrado que el VEGF inhibe la apoptosis inducida por quimioterapia en células hematopoyéticas al inducir el factor antiapoptótico MCL1,⁴⁴ y que el VEGF estimula la proliferación de células leucémicas in vitro,^{13, 30, 36,38} un efecto mediado a través del VEGFR-2.³⁶ Recientemente, nuestro grupo ha reportado la remisión estable en un paciente con LMA, quien presentaba recaídas refractarias después de regímenes de quimioterapia estándar. El paciente remitió al administrarle SU5416, un inhibidor de los receptores de la tirosinquinasa que hace blanco en el VEGFR-2 y el receptor del factor de células madre (c-kit).⁴⁵

Otros estudios que aplicaron de forma similar una molécula antiangiogénica combinada con un agente quimioterapéutico como la Idarubicina han mostrado buenos resultados en el tratamiento de la LMA.⁵⁹ El SU5416 inhibe los receptores a través de VEGFR-1 igualmente.⁴⁶ Estos datos sugieren que el incremento de la expresión de VEGF y sus receptores en blastos leucémicos juegan un rol importante en la fisiopatología de la LMA. Nosotros observamos células positivas de VEGFR-1 en áreas celulares de médula ósea normal. La intensidad y patrón de distribución de las tinciones no fue diferente en muestras de LMA. Esta observación no parece apoyar un rol importante del VEGF/VEGFR-1 en muestras de LMA y correlaciona con resultados en un modelo de leucemia humana, en el cual anticuerpos monoclonales contra VEGFR-1 humano o murino no tienen efectos en la sobrevivencia de los ratones.⁴⁷

Los niveles de VEGF en la médula ósea se mantuvieron elevados aún cuando nuestros pacientes alcanzaron una remisión completa después de quimioterapia, en contraste con otros estudios donde el VEGF fue encontrado disminuido en pacientes con LMA que alcanzaron una remisión completa y elevados en aquellos que no alcanzaron la remisión completa.¹⁰ Creemos que la diferencia en los resultados se basa en factores relacionados a las células hematopoyéticas progenitoras, incluyendo los eritroblastos que expresan

y liberan VEGF por estimulación con citoquinas *in vitro*⁴⁸ y que han sido identificadas como fuente principal de VEGF en médulas normales.⁴⁹ Estas células podrían contribuir a los elevados niveles de VEGF en la médula ósea regenerativa.

Asimismo, se ha demostrado que los medicamentos citotóxicos inducen la apoptosis endotelial directa e indirectamente en modelos animales.^{50,51} Así, el incremento en la expresión de VEGF/VEGFR-1 en médulas tras remisión completa podría ser importante no solamente para la regeneración de la hematopoyesis sino también para el remodelamiento vascular durante la recuperación de la médula ósea tras quimioterapia intensiva. El hecho que los ratones con deficiencia en VEGFR-1 presentan malformaciones vasculares sugiere que el VEGFR-1 juega un rol en el remodelamiento vascular.^{22,52,53} El tipo de células con incremento de la expresión de VEGFR-1 en pacientes en remisión completa deberá ser definido en posteriores estudios. Aun así, es ya bien conocido que VEGFR-1 es expresado por varias células hematopoyéticas maduras incluyendo células dendríticas y monocíticas.^{54,55}

Las células mieloides positivas para VEGFR-1 activadas han mostrado liberar factores angiogénicos como el VEGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y factor neurotrófico derivado del cerebro, los cuales realzan la formación y estabilidad vascular.^{56,57} Más aún, el reclutamiento de células hematopoyéticas positivas para VEGFR-1 mostró conferir estabilidad a los nuevos vasos

en tumores en un modelo animal.⁵⁸ Todos estos estudios apoyan nuestra hipótesis que la expresión de VEGF/VEGFR-1 en médulas óseas en remisión completa ocurre en las células hematopoyéticas no malignas y contribuyen no solo a la regeneración de la hematopoyesis sino también el remodelamiento vascular después de quimioterapia intensiva citotóxica.

Nuestro estudio ha mostrado que la leucemia mieloide aguda en adultos está asociada con el incremento en la expresión de VEGF y su receptor de membrana VEGFR-2 en la médula ósea. Más aun, VEGF y VEGFR-2 pero no VEGFR-1 fueron relacionados al grado de angiogenesis en la médula ósea. Estos resultados junto con la disminución significativa de VEGFR-2 en pacientes con LMA quienes alcanzaron una remisión completa después de la quimioterapia de inducción, apoyan fuertemente la hipótesis del importante rol del VEGF y VEGFR-2 en LMA. Estos hallazgos sugieren que las terapias haciendo blanco en VEGFR-2 pueden constituir una estrategia novel para el tratamiento de la LMA.

Agradecimiento

A todos los que directa e indirectamente participaron en este proyecto en la parte técnica, así como en los aportes científicos, principalmente a: Dra. Teresa Padró, Sandra Ruiz, Dr. Wolfgang E. Berdel, PhD., Dr. Rolf M. Mesters, y Westfaelische Wilhelm Universitaet Muenster, Alemania.

REFERENCIAS

- Folkman, J., D'Amore, PA., Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-55.
- Herrera F, Contreras CR. Nuevos abordajes en cáncer dirigiendo el factor tisular a blancos vasculares tumorales. *Rev Med Hondur* 2004;72:145-54.
- Padró T, Ruiz S, Bieker R, Bürger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:2637-44.
- Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshouri T, Barlogie B, Koller C, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-45.
- Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortolezzi A, Ferruci PF, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 1999;81:1398-1401.
- Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87:503-08.
- Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13:469-72.
- Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997;150:815-21.
- Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1414-18.
- Negaard HF, Iversen N, Bowitz-Lothe IM, Sandset PM, Steinsvik B, Ostensstad B, et al. Increased bone marrow microvascular density in hematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors. *Leukemia* 2009;23(1):162-9.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
- Wegiel B, Ekberg J, Talasila KM, Jallili S, Persson JL. The role of VEGF and a functional link between VEGF and p27Kip1 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2009;23(2):251-61.
- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3121-28.
- Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2000;18:1423-31.
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-68.
- Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT, et al., Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000;89:475-83.
- Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-63.
- Paradis V, Ben Lagha N, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in renal carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:351-56.
- Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffy BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18:2046-52.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376: 66-70.
- Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:5412-16.
- Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, et al. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth on several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999;59:5209-18.
- Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenig NE. Halting angiogene-

- sis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997;3:1222-27.
26. Millauer B, Schawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367:576-79.
27. Fiedler W, Graeven U, Ergün S, Verago S, Kilic N, Stockschröder M, Hossfeld DK. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;89:1870-75.
28. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59:728-33.
29. Chen H, Treweek AT, West DC, Kathleen JT, Cawley JC, Zuzel M, Toh CH. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181-87.
30. Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, Roxas C, Glinsmann-Gibson B, Frutiger Y, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001;97:1427-34.
31. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, Bagnato S, Stagno F, Giustolisi GM, et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia* 2001;15:976-80.
32. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri Gidel C, Keating M, Giles F, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:3717-21.
33. Fiedler W, Graeven U, Ergün S, Verago S, Kilic N, Stockschröder M, et al. Expression of FLT4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1234-37.
34. Ziegler BL, Valtieri M, Almeida Porada G, De Maria R, Müller R, Masella B, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999;285:1553-58.
35. Katoh O, Tsuchi H, Kawaiishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
36. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000;106:511-21.
37. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-25.
38. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, et al., Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1-KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999;188:369-77.
39. Gobbi H, Dupont WD, Simpson W, Plummer WD, Schuyler PA, Olson SJ, et al. Transforming growth factor- β and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2096-2101.
40. Cheson BC, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, et al., Report of the National Cancer Institute-sponsored Workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990;8:813-19.
41. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
42. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and example. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.
43. Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B, Löffler H, Gassmann W, Haferlach T, et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93:4116-24.
44. Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 1998;58:5565-69.
45. Mesters RM, Padró T, Bieker R, Steins M, Kreuter M, Göner M, et al. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:241-43.
46. Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, Blake RA, Liang C, Hannah AL, et al. Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an antiangiogenesis agent. *Anticancer Drug Des* 2000;15:29-41.
47. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10857-62.
48. Bautz F, Rafii S, Kanz L, Möhle R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells: possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 2000;28:700-6.
49. Tordjman R, Delaire S, Plouet J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, et al. Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood* 2001;97:1968-74.
50. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105:R15-R24.
51. Browder T, Butterfield CE, Kråling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-86.
52. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt1 knock-out mice. *Development* 1999;126:3015-25.
53. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83.
54. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmè D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-43.
55. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996;271:17629-34.
56. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000;102:199-209.
57. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 1999;124:4531-40.
58. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194-1201.
59. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Esteva A, Lopez-Sanchez LM, et al. Additive effect of PTK787/ZK 222584, a potent inhibitor of VEGFR phosphorylation, with Idarubicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2009;37(6):679-91.

SUMMARY. Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor VEGFR-2 have been implicated as the main endothelial pathway required for tumor neovascularization. However, the importance of the VEGF/VEGFR-2 system for angiogenesis in hematologic malignancies such as AML remains to be elucidated. **Patients and methods:** Evaluation of 32 patients with newly diagnosed untreated AML by using immunohistochemical analysis of bone marrow biopsies. **Results:** Expression of VEGF and VEGFR-2 was significantly higher in patients with a high degree of microvessel density compared to those with a low degree (VEGF: $p = 0.024$; VEGFR-2: $p = 0.040$) and the controls ($p < 0.001$). Patients who achieved a complete remission following induction chemotherapy, VEGFR-2 staining levels decreased into the normal range. **Conclusion:** results provide evidence for increased expression of VEGF/VEGFR-2 of leukemic blasts and correlation with angiogenesis in bone marrow of AML patients. Thus, VEGF/VEGFR-2 might constitute promising targets for antiangiogenic and antileukaemic treatment strategies in AML. **Rev Med Hondur** 2010;78(3):113-168.

Keywords: vascular endothelial growth factor receptor-2, angiogenesis; acute myeloid leukaemia.