

Efecto de la betametasona sobre la actividad angiogénica en líquido cefalorraquídeo (LCE) en pacientes adultos portadores de meduloblastomas/PNET

Camila Valdés A.⁽¹⁾, Alejandra Valenzuela A.⁽¹⁾, Mariana Sinning O.⁽²⁾, Carlos Rosas C.⁽³⁾, David Lemus A.⁽³⁾

⁽¹⁾Estudiante de Medicina Universidad de Chile.

⁽²⁾Depto. Neurología, HCUCH.

⁽³⁾Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El estudio fue financiado mediante el proyecto I08/08-2 del Concurso de Iniciación de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile.

SUMMARY

Introduction: angiogenesis is the process of blood vessel formation from a preexisting vascular network, which is augmented in pathological processes such as cancer. Medulloblastoma (MB) and primitive neuroectodermal tumor (PNET), are both embryonic tumors of the central nervous system of high mitotic rate and preferential dissemination via cerebrospinal fluid (CSF). Betamethasone (β -met) is a glucocorticoid with antiangiogenic effect. Material and method: We used the allantochorionic membranes assay (CAM) to measure angiogenesis with 10 μ L of CSF from patients with MB and PNET, realizing a comparative study of the angiogenic effect of β -met at a concentration of 0.08 μ g/mL in situ, CSF of patients which received β -met intravenous and untreated with the drug. The control group corresponds to a sample of normal CSF. Microvascular density in an area of 9000 μ m² was determined. Results: The statistical study (ANOVA) showed significant differences ($p < 0.01$) in the microvascular density compared to experimental groups. The blood vessels average in the different groups were 15, 4 vessels/area (control), 10,2 vessels/area (β -met iv), 17,3 vessels/area (without β -met) and 13 vessels/area (β -met in situ). Discussion: These results suggest a possible antiangiogenic effect of betamethasone in doses used intravenously.

Fecha recepción: marzo 2013 | Fecha aceptación: junio 2013

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis, proceso de formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, es fundamental en el desarrollo de vertebrados como también en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, reparación de tejidos y crecimiento tumoral⁽¹⁾.

La angiogénesis depende del delicado balance entre estimuladores e inhibidores endógenos, además de un trasfondo genético y condiciones del microambiente tisular. Se han identificado una serie de moléculas estimuladoras de este proceso donde destacan el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)^(2,3). Este último es el factor de crecimiento más estudiado hasta el momento⁽⁴⁾, estimulando el crecimiento y quimiotaxis de células endoteliales durante la angiogénesis *in vivo*⁽⁵⁾.

La angiogénesis es un mecanismo crítico en el desarrollo de las neoplasias y se ha establecido una correlación significativa entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos, el tamaño, tipo histológico y grado de malignidad tumoral⁽⁶⁾.

Los tumores embrionarios del Sistema Nervioso Central (SNC) como el meduloblastoma y el tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) son de alta tasa mitótica y de preferente diseminación vía licuoral. Histológicamente son idénticos, pero la diferencia radica en su ubicación anatómica. Se denomina meduloblastoma cuando se localiza en la fosa posterior, usualmente desde el vermis cerebeloso en el techo del cuarto ventrículo y PNET, cuando es supratentorial⁽⁷⁾.

Una técnica ampliamente validada y utilizada en trabajos experimentales para realizar un análisis *in*

vivo del efecto angiogénico es el de la membrana alantocoriónica (MAC) de pollo^(*), gracias a su simplicidad, reproducibilidad y confiabilidad^(8,9).

En estudios previos hemos demostrado que el LCE de pacientes con tumores primarios del SNC induce angiogénesis en el modelo *in vivo* membrana alantocoriónica de pollo (MAC)⁽¹⁰⁾. La betametasona, corticoide frecuentemente utilizado como medida antiedema en los tumores del sistema nervioso central, inhibe la angiogénesis en MAC^(8,11). El trabajo actual busca estudiar el efecto de la betametasona administrada por vía intravenosa previamente en pacientes portadores de esta enfermedad, sobre la actividad angiogénica de líquido cerebro espinal medida en MAC.

MATERIAL Y MÉTODO

Membrana alantocoriónica de pollo (MAC)

Para la obtención de MAC se utilizarán 60 huevos de pollo de raza white Leghorn embrionados, los cuales serán llevados a una cámara de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada. Al tercer día, a los receptores se les abrirá una ventana redonda en el polo agudo de 2,5 x 2 cm, se sellará la ventana con cinta adhesiva y los receptores serán devueltos a la incubadora donde permanecerán una semana siendo monitoreados permanentemente, de modo de retirar los que no sobrevivan.

Los vasos sanguíneos primitivos de la MAC proliferan y se diferencian en arterias y venas hasta el día 8. Así, una red de capilares se origina y ocupa un área particular bajo el corion, mediando el intercambio de gases con el medio ambiente externo. Una rápida proliferación celular endotelial continúa hasta el día 12; posteriormente, su índice mitótico disminuye rápidamente y el sistema vascular

* Illanes J, Guerrero A, Fuenzalida M, Dabancens A, Zipper J, Lemus D. Análisis morfológico del proceso angiogénico en MAC. Jornadas de Anatomía. Universidad de los Andes. Santiago de Chile, 1999.

alcanza su configuración final el día 18, justo antes de la ruptura del cascarón⁽¹²⁾.

Instilación sobre MAC

Después de 8 días de incubación se procederá a retirar la cinta adhesiva, para colocar un disco Millipore® (nitrometilcelulosa) previamente esterilizado (5 mm de diámetro y 0,2 µm de poro) en forma directa sobre los vasos de mayor calibre, para una mayor difusión de los líquidos. Los discos implantados serán instilados con 10 µL de LCE de pacientes asintomáticos en un grupo de huevos (grupo control), y en otros tres grupos se instilarán 10 µL de LCE, proveniente de pacientes portadores de meduloblastoma/PNET, por ser un método accesible para el estudio y búsqueda de mediadores de respuesta y seguimiento, permitiendo la etapificación del tumor. La extracción de LCE se realizó vía punción lumbar 48 horas postresección quirúrgica del tumor y fueron mantenidos a -20° C. La utilización de estas muestras cuenta con la aprobación N° 114 del Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile.

Los grupos experimentales que serán instilados con LCE proveniente de pacientes portadores de meduloblastoma/PNET se diferencian en que el grupo 2 será instilado con 10 µL de LCE de un paciente que recibió betametasona endovenosa en dosis habituales de 4 mg al día previo a la toma de la muestra. En tanto, el grupo 3 será instilado con 10µL de LCE sin tratamiento con betametasona. Dado que una diferencia en el potencial angio-

génico podría ser determinada por otro factor, se agregará betametasona directamente en el modelo MAC en conjunto con el LCE sin tratamiento previo para así evaluar su efecto (grupo 4). La concentración utilizada de betametasona en este caso fue de 0,08 µg/mL, basado en un estudio previo⁽⁸⁾ en el que se determinó la concentración antiangiogénica activa mínima (CAAM) en MAC. Los grupos de trabajo al décimo día a experimentar se detallan en la Tabla 1. Luego, los receptores serán sellados nuevamente con cinta adhesiva. Todo el procedimiento se realizará al interior de una cámara de cultivo para disminuir las variaciones del medio.

Preparación de muestras histológicas

Al décimo tercer día, los discos implantados en los receptores y las MACs adyacentes serán removidos y fijados en formalina para realizarse el corte y tinción con alcian blue (tinción del filtro) y hematoxilina-eosina (tinción de núcleos y citoplasmas, respectivamente) para el estudio histológico.

Conteo de vasos sanguíneos

Se analizará un segmento de MAC que se encuentra adyacente al filtro de nitrometilcelulosa, pues es donde se espera encontrar la mayor respuesta angiogénica al ser un fragmento próximo a la difusión de los líquidos en experimentación.

La densidad microvascular será evaluada como el número total de capilares visualizados en un área

Tabla 1. Caracterización de los grupos experimentales.

Grupos Experimentales	N° Receptores	Tipo LCE β-met.	Tratamiento	Cantidad
1 (C)	12	Normal	No	10µL
2	14	Medbst/PNET	Antes	10µL
3	13	Medbst/PNET	No	10µL
4	12	Medbst/PNET	En MAC 5µL LCE + 5µL β-met.(0,08 µg/mL)	

Leyenda: Medbs = Meduloblastoma PNET = Tumor neuroectodérmico primitivo

Tabla 2. Resultado del conteo de vasos por grupos experimentales.

	Control Grupo 1	Con TTO Grupo 2	Sin TTO Grupo 3	Sin TTO + β-met Grupo 4
N° de valores	39	40	40	33
Mínimo	11	3	12	8
Percentil 25	14	8	15	12
Mediana	15	10	18	13
Percentil 75	17	12	19,8	15
Máximo	21	18	21	16
Promedio	15,4	10,2	17,3	13
Std. Dev.	2,149	3,353	2,544	2,179
Std. Error	0,3441	0,5301	0,4022	0,3794

Leyenda: Detalles del conteo de vasos sanguíneos realizado en forma ciega en una superficie de 9000 μm^2 .
Std Dev: Desviación Estándar. Std Error: Error Estándar

equivalente a 9000 μm^2 (30 μm x 300 μm) desde un ocular reticulado a una distancia de 600 μm del filtro. Para tal efecto se utilizará un microscopio óptico con gradilla con un aumento de 400X, y se realizarán 30 conteos de cada grupo, obteniéndose valores muestrales del número de capilares sanguíneos, utilizando la técnica de “conteo ciego” para obtener un resultado más objetivo y exacto.

Pruebas estadísticas a utilizar

Se obtendrán los conteos de vasos sanguíneos por área promedio para cada muestra, los datos serán tabulados y se utilizará el análisis de varianza ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Tukey, mediante el *software* estadístico GraphPad Prism 5. Los resultados se graficarán en barras, en donde la variable de número promedio de vasos sanguíneos contados en 9000 μm^2 corresponde al eje de las ordenadas y el tipo de muestra de MAC, con las diferentes sustancias a las que será expuesta, representa el eje de las abscisas. Se compararán todos los datos de los grupos entre sí en forma separada.

RESULTADOS

El grupo de MAC expuesto a un LCE control presentó un número de vasos sanguíneos promedio de 15,41 \pm 0,34 vasos sanguíneos/área. Las MAC

expuestas a LCE con meduloblastoma/PNET de paciente con tratamiento previo con betametasona endovenosa (grupo 2) mostraron una cantidad promedio de 10,20 \pm 0,53 vasos sanguíneos/área. Las MAC instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET de paciente sin previo tratamiento con betametasona (grupo 3) presentaron 17,30 \pm 0,40 vasos sanguíneos/área en promedio. Por último, las MAC con LCE con meduloblastoma/PNET de paciente sin previo tratamiento y con la solución preparada de betametasona instiladas *in situ* (grupo 4) mostraron un número promedio de vasos sanguíneos/área de 13,00 \pm 0,38. Estos resultados se detallan en la Tabla 2 y están representados en la gráfica de la Figura 1.

Los datos proporcionados de las pruebas estadísticas con ANOVA, al comparar los distintos grupos entre sí, fueron los siguientes:

Control y LCE sin tratamiento previo con betametasona endovenosa (grupo 1/ grupo 3)

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de vasos sanguíneos promedio del grupo 1 y el grupo 3 ($p < 0,01$), habiendo una mayor cantidad de vasos en las muestras del grupo 3, instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo.

Control y LCE con tratamiento previo con betametasona (grupo 1/ grupo 2)

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el número de vasos sanguíneos promedio del grupo control y el grupo del LCE con meduloblastoma/PNET con tratamiento previo con betametasona ($p < 0,01$), existiendo una mayor cantidad de vasos en el grupo 1.

Control y LCE sin tratamiento previo y con betametasona *in situ* (grupo 1 / grupo 4)

La diferencia encontrada entre los grupos 1 y 4 fue significativa estadísticamente ($p < 0,01$) y la mayor cantidad de vasos sanguíneos promedios se encuentran en las muestras del grupo control.

LCE con tratamiento previo de betametasona endovenosa y LCE sin tratamiento previo (grupo 2/ grupo 3)

Existe una diferencia considerable entre el promedio de vasos sanguíneos del grupo 2 y el grupo 3, siendo ésta estadísticamente significativa ($p < 0,01$). La mayor densidad microvascular se observa en las muestras del grupo instilado con LCE con medu-

loblastoma/PNET sin tratamiento previo con betametasona.

LCE sin tratamiento previo y LCE sin tratamiento previo y con betametasona *in situ* (grupo 3/ grupo 4)

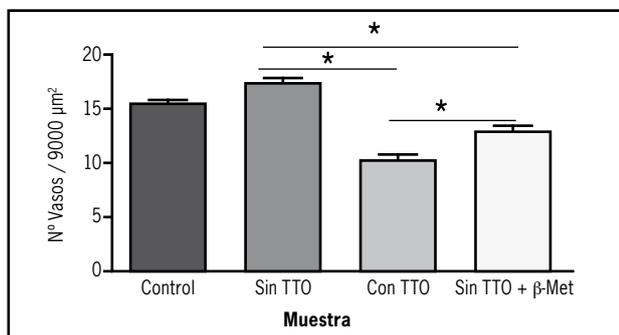
Al comparar la cantidad de vasos sanguíneos promedio de las muestras de los grupos 3 y 4, la mayor cantidad pertenece al grupo 3, instilado con LCE con meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo. La diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

LCE con tratamiento previo de betametasona endovenosa y LCE sin tratamiento previo y con betametasona *in situ* (grupo 2/ grupo 4)

Finalmente se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de vasos sanguíneos del grupo 2 y el grupo 4 ($p < 0,01$), existiendo una mayor cantidad de vasos en las muestras del grupo 4, instiladas con LCE sin tratamiento previo y con solución preparada de betametasona instilada *in situ*.

Las diferencias de los promedios de los vasos sanguíneos de los grupos comparados y la significancia estadística del valor p obtenido se detallan en la Tabla 2.

Figura 1. Densidad microvascular comparada.



Control corresponde al grupo instilado con LCE sano; Sin TTO corresponde al grupo instilado con LCE con Meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo con Betametasona; Con TTO es el grupo instilado con LCE con tratamiento previo con Betametasona; y Sin TTO + β -Met representa el grupo instilado con LCE sin tratamiento previo y Betametasona endovenosa. * estadísticamente significativo según $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican una diferencia que es estadísticamente significativa entre el número promedio de vasos sanguíneos entre las MAC que fueron instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET de paciente con tratamiento previo con betametasona, las instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo y las instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo y con betametasona *in situ*. Esto se logró gracias al correcto seguimiento del

procedimiento en todas las etapas y a un tamaño de muestra lo suficientemente grande como para evidenciar estos resultados.

Lo anterior se apoya además en los resultados de las comparaciones individuales entre los grupos 2, 3 y 4 con el grupo control. Al hacer la comparación entre el grupo 3 de MAC instilada con LCE sin tratamiento previo con betametasona, con los otros tres grupos, en todos los casos se aprecia un alto predominio en la cantidad de vasos sanguíneos promedio por parte del grupo 3. A raíz de esto se concluye que el LCE con meduloblastoma/PNET tiene un efecto angiogénico aumentado al inocularlo sobre MAC, ya que como todos los tumores es dependiente de angiogénesis y presenta una alta vascularización.

En todos los casos la respuesta angiogénica del LCE con meduloblastoma/PNET se ve disminuida al tratarse con betametasona, ya sea de manera endovenosa o *in situ*, lo que muestra que la betametasona tiene un efecto antiangiogénico al aplicarla sobre MAC instilada con LCE con meduloblastoma/PNET. Este glucocorticoide actúa inhibiendo la producción de proteínas proangiogénicas como VEGF y bFGF, la dilatación vascular y la producción de prostaglandinas, evitando de esta manera una serie de etapas que forman parte de la angiogénesis tumoral.

Al realizar una última comparación sobre el efecto del fármaco entre el grupo cuyas MAC fueron instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET previamente tratado y el grupo cuyas MAC fueron instiladas con LCE con meduloblastoma/PNET sin tratamiento previo y con betametasona *in situ* (grupos 2 y 4), se observa que la densidad microvascular es menor en el grupo 2. Esto puede deberse al hecho de que el paciente que había sido tratado previamente con betametasona también recibió otros fármacos que potenciaron el efecto antiangiogénico, como el ketoprofeno⁽¹¹⁾.

En la actualidad el tratamiento del meduloblastoma/PNET se basa fundamentalmente en la resección quirúrgica; sin embargo, la quimioterapia coadyuvante seguirá siendo más importante en niños y pacientes de alto riesgo. Se han realizado estudios, como el Heart Start III y ACNS0334 que mantienen las esperanzas sobre una combinación óptima de drogas mieloablativas.

La dependencia de meduloblastoma/PNET a la angiogénesis en su capacidad de crecimiento y metástasis ha convertido a la terapia antiangiogénica en un arma atractiva en la lucha contra estas y muchas otras enfermedades dependientes de este mecanismo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. Irma Orellana, asistente de laboratorio, por su excelente disposición y ayuda durante todo el proceso y al Dr. Carlos Rosas, académico de la Universidad de Chile, por su colaboración y compromiso en el desarrollo del análisis estadístico del trabajo de investigación además del manejo en la metodología empleada.

REFERENCIA

1. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
2. Barillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P *et al.* The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. *Am Pathol* 1998;152:1161-6.
3. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Kaklamanis L, Barbatis K, O'Byrne KJ *et al.* Focal expression of thymidine phosphorylase associates with CD 31 positive lymphocytic aggregation and local neo-angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1998;18(1A):71-6.
4. Bruce T, Konstantin S. VEGF and tumor angiogenesis. *Einstein QJ Biol Med* 2001;18:59-66.
5. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
6. Lantieri LA, Martín GN, Wechsler J, Mitrofanoff M, Raulo Y, Baruch JP. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue: a possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:392-8.
7. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Reni M, Gatta G, Vecht C *et al.* Adult neuroectodermal tumors of posterior fossa (medulloblastoma) and of supratentorial sites (stPNET). *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;72:165-79.
8. Lemus D, Dabancens A, Illanes J, Fuenzalida M, Guerrero A, López C. Antiangiogenic effect of betametasona on the chick CAM stimulated by TA3 Tumor supernatant. *Biol Res* 2001;34:227-36.
9. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 2001;264:317-24.
10. Sinning M, Letelier R, Rosas C, Fuenzalida M, Lemus D. Angiogenic potential of the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with high-grade gliomas measured with the chick embryo chorioallantoic membrane assay (CAM). *Biol Res* 2012;45:135-8.
11. Zúñiga J, Fuenzalida M, Guerrero A, Illanes J, Dabancens, Díaz E *et al.* Effects of steroidal and non steroidal drugs on the neovascularization response induced by tumoral TA3 supernatant on CAM from chick embryo. *Biol Res* 2003;36:233-40.
12. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 1974;38:237-48.

CORRESPONDENCIA



Dra. Mariana Sinning Opazo
Departamento de Neurología y Neurocirugía,
Hospital Clínico Universidad de Chile.
Santos Dumont 999, Independencia.
Teléfono: 2978 8260
Email: msinning@hcuch.cl