



Gliomas de Alto Grado del Adulto: Biología Molecular (Parte I)

High-Grade Gliomas of the Adult: Molecular Biology (Part I).

*Correspondencia: @leninfapal
Teléfono [593] 099 8023 066

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Fondos: Ver la página 274

Recibido: 10 Octubre 2020
Aceptado: 21 Noviembre 2020
Publicado: 31 Diciembre 2020
Editor: Dra. Katherine García Matamoros

Membrete bibliográfico:

Palacios L, Silva C. Gliomas de Alto Grado del Adulto: Biología Molecular (Parte I). Rev. Oncol. Ecu 2020;30(3):249-279.

DOI: <https://doi.org/10.33821/494>

Copyright Palacios L, et al. Este artículo es distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), el cual permite el uso y redistribución citando la fuente y al autor original.

Lenin Fabián Palacios Paredes*¹ **Carlos Silva**¹

1. Postgrado de Oncohematología, Universidad Católica Argentina.

Resumen

Introducción: Los tumores gliales, dentro de las lesiones neuroepiteliales, son las neoplásicas intraaxiales más comunes. Representan alrededor del 45% de todos los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) y el 77% de todos los tumores primarios malignos del SNC. El promedio de supervivencia media de los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) cuando se utiliza el tratamiento multimodal es de 15-18 meses y de 2 a 5 años con gliomas anaplásicos. Los tratamientos convencionales de los tumores cerebrales incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. El tratamiento quirúrgico representa la primera aproximación para la gran mayoría de tumores cerebrales, sin embargo, la resección total no siempre es alcanzable en relación con la localización del tumor, de vital importancia para preservar estructuras nerviosas o vasculares.

Modalidades de tratamiento agresivas han extendido la supervivencia media, pero la supervivencia a menudo se asocia con un deterioro significativo en la calidad de vida. La eficacia de quimioterapia sistémica está limitada por la presencia de la barrera hemato encefálica (BHE), la que limita el paso de una amplia variedad de agentes anti cancerígenos, la acción de los agentes alquilantes, está limitado por la activación de metil-guanina-metil-transferasa. El advenimiento de los estudios moleculares permite una nueva evaluación de la biología de los gliomas con, un nivel de precisión que promete interesantes avances hacia el desarrollo de terapias específicas eficaces. Las terapias dirigidas bloquean la activación de vías oncogénicas, ya sea a nivel de la interacción ligando-receptor o mediante la inhibición vías de transducción de señales, corriente abajo, inhibiendo así el crecimiento y la progresión del cáncer.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica acerca de los aspectos relacionados con la patogénesis molecular en la progresión de estos tumores en los adultos, y sus potenciales blancos terapéuticos.

Palabras claves:

DsCS: Receptor ErbB-2, Trastuzumab, Neoplasias de la Mama, Quimioterapia Adyuvante, Ado-Trastuzumab Emtansina.

DOI: 10.33821/494

Abstract

Introduction: Glial tumors, within neuroepithelial lesions, are the most common intraaxial neoplastic. They represent about 45% of all primary central nervous system (CNS) tumors and 77% of all malignant primary CNS tumors. The median survival of patients with glioblastoma multiforme (GBM) when multimodal treatment is used is 15-18 months and 2-5 years with anaplastic gliomas. Conventional treatments for brain tumors include surgery, radiation therapy, and chemotherapy. Surgical treatment represents the first approach for the vast majority of brain tumors; however, total resection is not always achievable in relation to the location of the tumor, which is vitally important to preserve nerve or vascular structures.

Aggressive treatment modalities have extended median survival, but survival is often associated with a significant deterioration in quality of life. The efficacy of systemic chemotherapy is limited by the presence of the blood-brain barrier (BBB), which limits the passage of a wide variety of anticancer agents, the action of alkylating agents, is limited by the activation of methyl-guanine-methyltransferase. The advent of molecular studies allows a new evaluation of the biology of gliomas with, a level of precision that promises interesting advances towards the development of effective specific therapies. Targeted therapies block the activation of oncogenic pathways, either at the level of ligand-receptor interaction or by inhibiting downstream signal transduction pathways, thus inhibiting cancer growth and progression.

The objective of the present work was to carry out a bibliographic review about the aspects related to the molecular pathogenesis in the progression of these tumors in adults, and their potential therapeutic targets.

Keywords:

MESH: Receptor, ErbB-2; Trastuzumab; Breast Neoplasms; Chemotherapy, Adjuvant; Ado-Trastuzumab Emtansine.

Free Text: HER2 positive disease, locally advanced HER2 positive, Anti-HER2 treatment, Anti-HER2 double blockade, Neoadjuvant anti-HER2 treatment

DOI: 10.33821/494

Introducción

Las neoplasias malignas primarias del sistema nervioso central (SNC) representan el 1% de todos los cánceres adultos y causan el 2% de las muertes por cáncer en este grupo. Los tumores gliales, son las neoplásicas neuroepiteliales, intraaxiales más comunes, representan el 70-85% de todos los tumores primarios del SNC, con picos de incidencia en niños y entre los 50 a 60 años de edad, con una incidencia combinada en Estados Unidos de 6.36 por 100.000 y mortalidad de 4.22 por 100.000 personas por año [1-3], estimándose un total de 23.380 casos nuevos y 14.320 defunciones para el 2014. [1] (**Figura 1**).

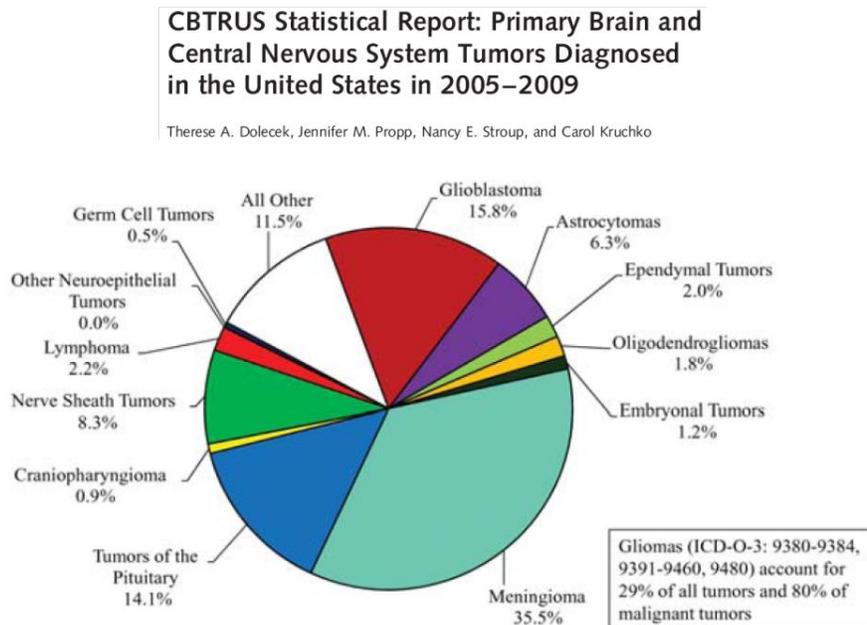
No ha sido identificada una causa subyacente para la mayoría de los gliomas malignos, el único factor de riesgo establecido es la exposición a las radiaciones ionizantes [4]. La

evidencia de una asociación con traumatismos craneales, los alimentos que contienen compuestos N-nitrosos, factores de riesgo ocupacional y la exposición a campos electromagnéticos es inconclusa [4]. Aunque no ha habido cierta preocupación acerca de un mayor riesgo de gliomas en asociación con el uso de teléfonos celulares [5], los estudios más grandes no han demostrado esto [4,6, 7]

Hay evidencia que sugiere una asociación entre factores inmunológicos y gliomas, los pacientes con atopia tienen un menor riesgo de gliomas, y pacientes con glioblastoma que tienen niveles elevados de IgE parecen vivir más que aquellos con niveles normales. La importancia de estas asociaciones no está clara [8, 9].

Polimorfismos genéticos que afectan a la desintoxicación, la reparación del ADN, y la regulación del ciclo celular también han sido implicados en el desarrollo de gliomas. Aproximadamente el 5% de los pacientes con gliomas malignos tienen una historia familiar de gliomas, algunos de estos casos familiares se asocian a síndromes genéticos poco comunes, como son la neurofibromatosis 1 (NF1) y 2 (NF2), la esclerosis tuberosa (TSC1,TSC2), retinoblastoma (RB1), síndrome de Li-Fraumeni (p53), síndrome de Turcot (APC, hMLH1,hMSH2, PMS2) y el síndrome de Cowden o hamartoma múltiple (PTEN), sin embargo, la mayoría de los casos familiares no tienen identificado una causa genética. Los estudios realizados en familiares de primer grado de pacientes con tumores primarios del SNC muestran una gran variabilidad, con un riesgo relativo que oscila entre 1 y 10 [10].

Figura 1. Tumores primarios del sistema nervioso central, diagnosticados en EEUU



Características Patológicas

Los gliomas malignos son tumores histológicamente heterogéneos e infiltrantes que derivan de la glia (astrocitos, oligodendrocitos, o sus precursores) y células ependimarias.

Tabla 1. Clasificación de los Gliomas por la OMS

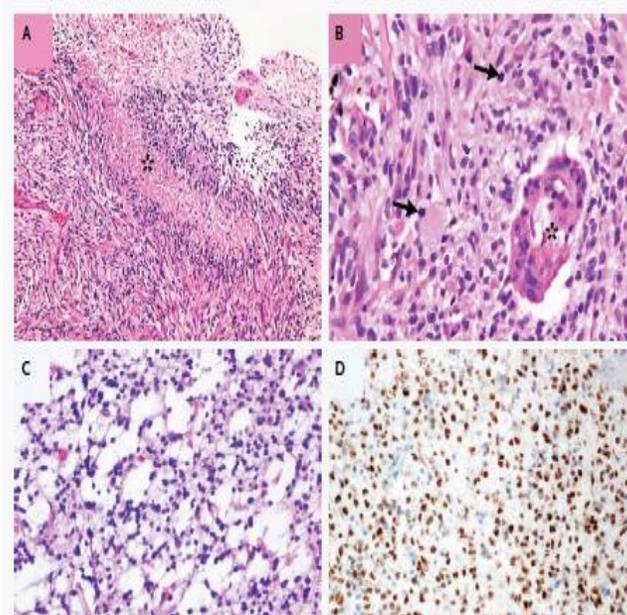
Clasificación del tumor	Grado de la OMS
Tumores astrocíticos	
Astrocitoma Pilocítico	I
Astrocitoma Difuso	II
Astrocitoma Anaplásico	III
Glioblastoma	IV
Tumores Oligodendrogiales y Oligoastrocíticos	
Oligodendroglioma	II
Oligodendroglioma Anaplásico	III
Oliastrocitoma	II
Oliastrocitoma Anaplásico	III
Glioblastoma con componente oligodendroglioma	IV
Tumores Ependimales	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma Anaplásico	III
Tumores del plexo coroideo	
Papiloma del plexo coroideo	I
Carcinoma del plexo coroideo	III
Tumores neuronales o mixtos neuronales-gliales	
Ganglioma	I o II
Neurocitoma Central	II
Paragangliomas Filium terminal	I
Tumor Neuroepitelial Disenbrioplásico	I
Tumores del parénquima Pineal	
Pineocitoma	II
Pineoblastoma	IV
Tumores Embrionarios	
Meduloblastoma	IV
Tumor Neuroectodérmico primitivo Supratentorial	IV
Teratoide atípico	IV
Tumores Meníngeos	
Meningioma	I
Atípico, células claras, cordoide	II
Randoide, papilar o anaplásico (maligno)	III

La glia es un tejido nervioso considerado tradicionalmente como aquel que provee funciones de soporte de neuronas, así como de nutrientes, oxígeno, mecanismos de soporte,

orientación en el desarrollo, funciones inmunológicas y eliminación de residuos. Funcionan como verdaderos socios de las neuronas y están involucrados en complejos procesos, incluyendo la traducción de señales y neurotransmisión [11-13]. La clasificación de la OMS de los tumores del sistema nervioso central, ahora en su cuarta edición, es el estándar universal para clasificar y calificar los tumores cerebrales (**Tabla 1**).

Análisis de diferenciación tumoral, celularidad, atipia citonuclear, actividad mitótica, proliferación microvascular, y necrosis (**Figura 2**), permiten la clasificación del tumor como gliomas de grado I (astrocitoma pilocítico), son benignos con una tasa de proliferación lenta, más común en edad pediátrica, grado II (difusos), incluyen astrocitoma, oligodendroglioma y oligoastrocitoma, se caracterizan por un alto grado de diferenciación celular y crecimiento difuso en el parénquima normal del cerebro y son propensos a la progresión maligna. Las lesiones de grado III (Anaplásico) incluyen astrocitoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico y oligodendroglioma anaplásico, estos tumores muestran una densidad celular superior y una notable presencia de atipia y células mitóticas. Los tumores de grado IV (glioblastoma y gliosarcoma) con el aumento de la agresividad, son los más malignos y también los gliomas más frecuentes, estos tumores presentan proliferaciones microvasculares y necrosis en pseudoempalizada.

Figura 2. Características patológicas de los gliomas malignos.



Los paneles A y B muestran el aspecto histológico de un glioblastoma, caracterizado por pleomorfismo nuclear, celularidad densa y necrosis pseudopalisante (asterisco) (Panel A, hematoxilina y eosina) así como proliferación endotelial vascular (asterisco) y figuras mitóticas (flechas) (Panel B, hematoxilina y eosina). Los paneles C y D muestran las características histológicas de un oligodendroglioma anaplásico, incluida la apariencia típica de halo perinuclear ("huevo frito") (panel C, hematoxilina y eosina) y tinción difusa de Olig2 (Panel D, color marrón). El índice de proliferación se puede cuantificar mediante análisis inmunohistoquímico con el uso de tinción Ki67. (Cortesía de Ali G. Saad, M.D., Departamento de Patología, Brigham and Women's Hospital).

Diagnóstico Molecular

Varias pruebas de diagnóstico molecular se realizan rutinariamente en ciertos especímenes de glioma porque los resultados son útiles ya sea con fines de pronóstico o para predecir una respuesta a la quimioterapia (**Figura 3**). Estos incluyen:

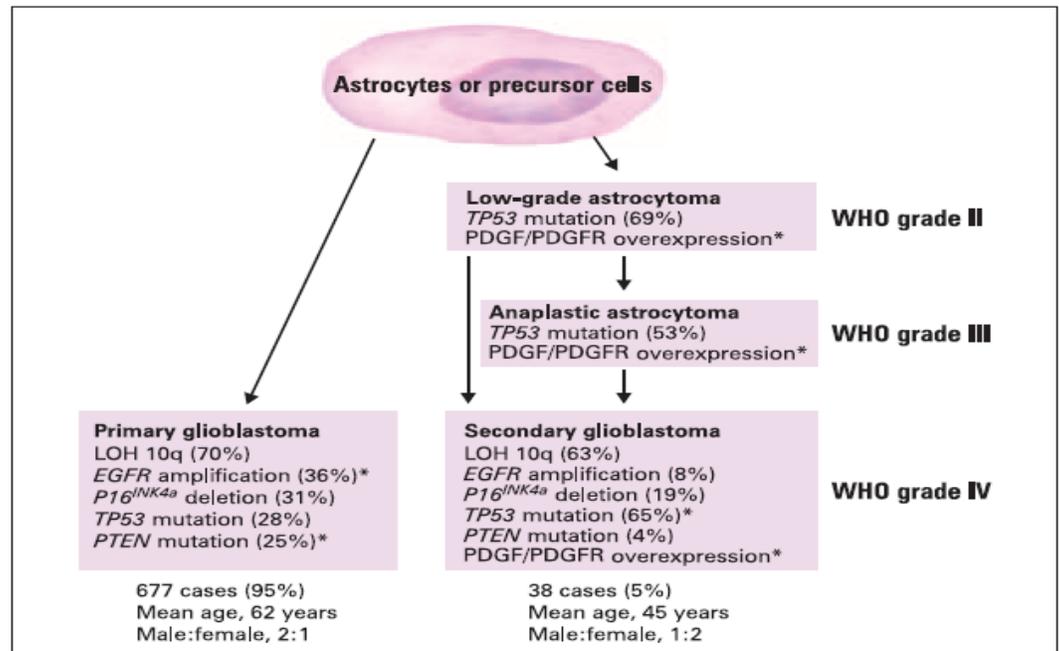
- **Delección 1p 19q** - pérdida alélica del cromosoma 1p y 19q es un potente predictor de la respuesta a la quimioterapia, periodo libre de progresión y la supervivencia global después de la quimioterapia en pacientes con tumores oligodendrogiales [14]. Esos tumores con pérdida 1p y 19q en la fijación de polisomía de los cromosomas 1 y 19 tienen un pronóstico intermedio [14]. Las pruebas para evaluar el estado 1p y 19q se realiza en todos los tumores con diferenciación oligodendrogial porque los resultados podrían utilizarse para influir en las decisiones terapéuticas y la participación en ensayos clínicos. La mayoría de los laboratorios de diagnóstico evalúan el estado 1p y 19q mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), ya que esta técnica proporciona información sobre las pérdidas cromosómicas, polisomías y variación intratumoral. Los oligodendrogliomas se distinguen por su extraordinaria sensibilidad a la quimioterapia, con aproximadamente dos tercios de los oligodendrogliomas anaplásico que responden de manera espectacular para el tratamiento de combinación con procarbazona, lomustina y vincristina (denominado PCV). Desafortunadamente, ninguna característica clínica o patológica de estos tumores permite la predicción exacta de su respuesta a la quimioterapia. Oligodendrogliomas anaplásicos también se distinguen por una constelación única de alteraciones genéticas moleculares, incluyendo la pérdida coincidente de brazos cromosómicos 1p y 19q en el 50% -70% de los tumores.

- **MGMT metilación** - metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT) es una enzima que es responsable de la reparación de ADN tras quimioterapia con fármacos alquilantes. En el curso del desarrollo del tumor, el gen MGMT puede ser silenciado por metilación de su promotor, evitando de ese modo la reparación de daños en el ADN y el aumento de la eficacia potencial de la quimioterapia. metilación MGMT se asocia con una mejor supervivencia en pacientes con glioblastoma y también puede sugerir un mayor riesgo de pseudoprogresión en un paciente con glioblastoma tras quimiorradioterapia inicial [15]. Las pruebas para detectar la metilación del promotor MGMT se lleva a cabo más a menudo usando la reacción en cadena de la polimerasa o la secuenciación de análisis que se pueden detectar específicamente secuencias de ADN metiladas.

- **Mutaciones IDH1 / IDH2** - Las mutaciones en isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y, con menor frecuencia, IDH2, están asociados con una mejora significativamente la supervivencia en pacientes con gliomas difusos a través de una gama de grados histológicos, independientemente de otros factores pronósticos. Tinción inmunohistoquímica para la forma mutante más común de IDH1 (R132) se puede realizar en gliomas difusos, tanto para fines de diagnóstico, para ayudar a distinguir la infiltración de células de astrocitoma en una pequeña muestra de biopsia de gliosis reactiva [16], y para fines de pronóstico. Más mutaciones raras en IDH1 y IDH2 no serán identificados usando este anticuerpo, pero se pueden detectar usando métodos de secuenciación de ADN.

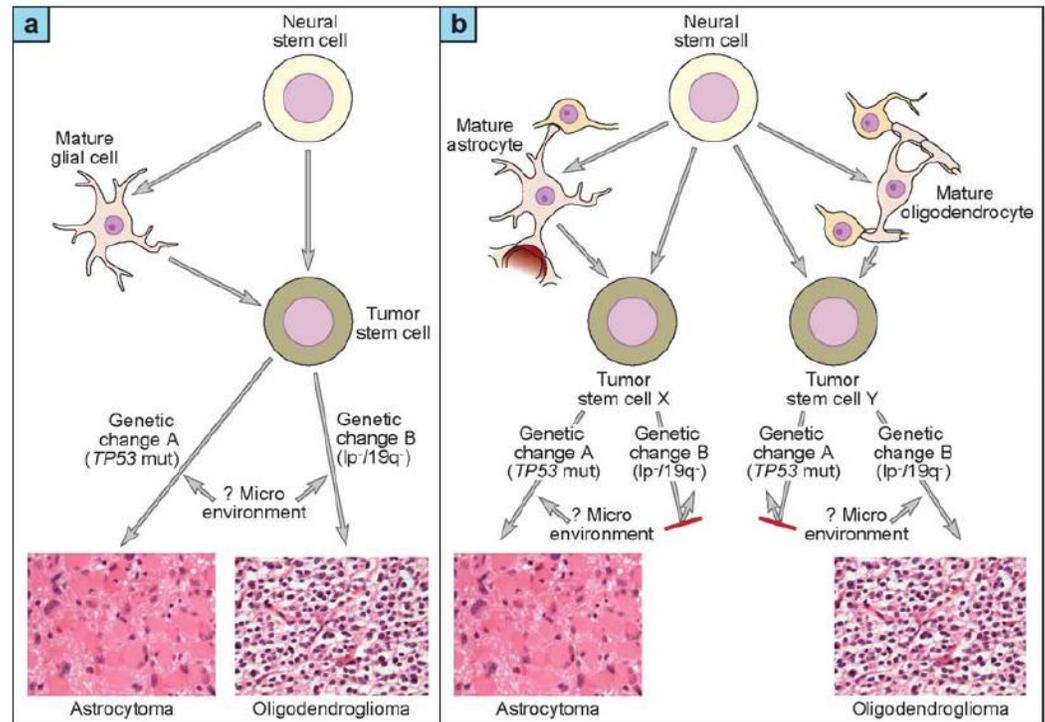
Algunos laboratorios también realizan pruebas de FISH para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de amplificación en las muestras de glioblastoma, aunque la utilidad clínica de estos resultados no se ha establecido completamente. Mientras que un estudio inicial informó que la amplificación de EGFR fue predictivo de respuesta a inhibidores EGFR, erlotinib o gefitinib, en glioblastoma recurrente, otros no han podido confirmar esta asociación o han implicado a otros marcadores como predictivo, como eliminación EGFR variante mutante III (EGFR^{III}) y / o mantenimiento de la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) expresión [15]

Figura 3. Diagnóstico molecular de los gliomas



Célula de origen - Los estudios actuales sugieren que gliomas de alto grado surgen a partir de células progenitoras neurales, pero la etapa precisa de la diferenciación de tales células diana (es decir, las células madre frente a las células progenitoras) no está clara. Gliomas de alto grado contienen células madre tumorales multipotentes que son responsables de poblar y repoblar los tumores (**Figura 4**) [13]. Estas células madre tumorales pueden ser transformadas a variantes de células progenitoras neurales normales. La existencia de estas células madre tumorales puede tener implicaciones terapéuticas, ya que las terapias que no la ablación de las células madre tumorales serán ineficaces en la erradicación del tumor. No obstante, la célula de origen de los gliomas de alto grado sigue siendo incierta, y la posibilidad de que estos tumores surgen de un tipo de célula completamente diferenciada, tal como una célula glial madura, no se ha excluido.

Figura 4, Célula de origen de los gliomas



Patogénesis Molecular

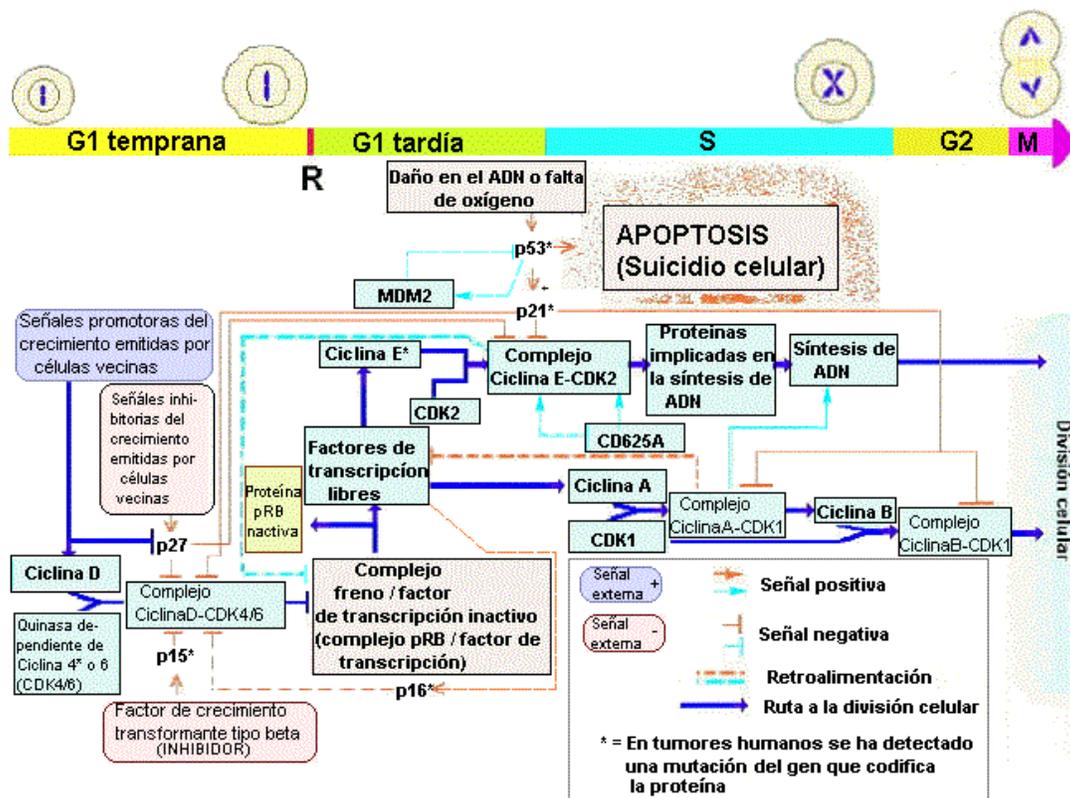
La invasión de células de glioma en el tejido normal se piensa que es un proceso multifactorial, que consiste de interacciones de las células con la matriz extracelular (MEC) y con las células adyacentes, así como de procesos bioquímicos de soporte y de movimiento celular activo. La invasión de células tumorales requiere cuatro etapas distintas: (1) desprendimiento de las células invasoras de la masa del tumor primario, (2) adhesión a MEC, (3) la degradación de MEC, y (4) la motilidad celular y la contractilidad. Sin embargo, el crecimiento de los tumores requiere, además, el reclutamiento de un nuevo suministro de sangre. La angiogénesis, representa un acontecimiento clave en la progresión de los gliomas malignos. La angiogénesis tumoral implica múltiples procesos celulares incluyendo la proliferación de células endoteliales, la migración, la reorganización de MEC y la formación del vaso.

Genética de los gliomas malignos

Los cánceres se originan como resultado de alteraciones hereditarias o somáticas en los genes que controlan procesos biológicos críticos, (Figura 5). La acumulación de tales daños genéticos a través del tiempo permite la supervivencia y la transformación progresiva de las poblaciones de células anormales que eventualmente conducen a la formación de un tumor. En consonancia con su alto potencial maligno, una amplia gama de exposiciones a cambios genéticos bien documentados probablemente contribuyen al fenotipo de los gliomas. Gliomagénesis se caracteriza por varios acontecimientos biológicos, tales como el factor

de crecimiento activado, las vías de señalización de los receptores, regulación hacia abajo de muchos mecanismos apoptóticos y desequilibrio entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Varios receptores de factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), C-Kit, receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y otros receptores de factores de crecimiento, se sobre expresan, amplificado y/o mutado en los gliomas.

Figura 5. Genética de los Gliomas



Característicos de las células de glioma es la pérdida de genes supresores de tumores, que son fundamentales para el crecimiento celular, la diferenciación y la función. El gen supresor de tumores TP53 fue identificado como el principal impulsor del cromosoma 17. Alteraciones en glioblastoma, y otros tumores indicó que p53 juega un papel crítico en el control del daño del genoma en el ADN y puede controlar la detención del ciclo celular para permitir la reparación del ADN o puede desencadenar la apoptosis de la célula alterada. [7]. Actúa como un activador transcripcional y reprime la transcripción de otros genes, tales como IL-6, c-fos, c-jun y otros oncogenes. Los niveles de p53 incrementan en fases G1 y S del ciclo celular. Las células transfectadas, con el gen normal p53 bloquean su crecimiento en G1, suprimiendo el pasaje a la fase S. La expresión del p53 causa apoptosis. Los efectos de su mutación son la pérdida de la regulación del ciclo celular, a través de la inactivación de p16 ink-4a, la súper expresión de la quinasa dependiente de ciclina 4 Cdk4 y Cdk6 y de ubiquitina ligasa Mdm2 y Mdm4. Un mecanismo similar se crea después de la mutación de retinoblastoma (Rb), un gen supresor de tumor. Probablemente, TP53 es un gen responsable

de la progresión de gliomas de bajo a alto grado, pero su mutación es un evento temprano. Muchas líneas celulares de glioma expresan mutaciones de p53. La forma mutada de p53 tiene un papel crucial en la regulación de la neo vascularización. Este induce aumento de los niveles de VEGF y FGFβ a través de una activación de la transcripción de los genes correspondientes. La supresión de NFKBIA (encoding nuclear factor of κ-light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-α), un inhibidor de la vía de señalización de EGFR, promueve la tumorigénesis en glioblastomas que no tienen alteraciones de EGFR. NFKBIA a menudo está ausente pero no mutado en GBM [8].

Mutaciones del receptor de factor de crecimiento epidérmico incluyen amplificaciones, mutaciones puntuales y deleciones, la alteración más común es la supresión de la variante III del dominio extracelular (EGFR-vIII) [9]. El receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y sus ligandos PDGF-A y PDGF-B son también comúnmente sobre expresados en algunas células de glioma, aumentando la posibilidad de la activación autocrina o paracrina [10]. Otros genes RTK, tales como erbB2, y MET, también se han encontrado mutados en GBMs[9]. RTK media el crecimiento celular y la proliferación a través de efectores como Ras y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La actividad de estas proteínas está estrechamente regulada, sobre todo por los supresores tumorales NF1 y PTEN. El supresor de tumores PTEN regula negativamente la vía PI3K por desfosforilación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) de nuevo a fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) [11].

Clásicamente, GBM ha sido descrito como resultado de punto final a partir de dos vías principales de gliomagénesis [12-13]. GBM primario muestra la amplificación del EGFR, deleción o mutación de homocigotos de quinasa dependiente de ciclina (CDK, inhibición de p16INK4A / (CDKN2A), alteraciones en genes supresor de tumores PTEN en el cromosoma 10, y deleción en el gen INK4a con la pérdida de p14 y p16 [18, 19]. La progresión de astrocitomas de bajo a alto grado implica la inactivación o mutaciones del gen supresor de tumores TP53 y la elevada expresión de ligandos y receptores de PDGF, además se asocia con deleción del cromosoma 10 y 19, relacionados con el gen PTEN.

PTEN es un regulador negativo de la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K),[20] una importante vía de señalización celular que estimula la proliferación en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento. Curiosamente, sólo 1 copia del gen está mutada en los tumores, lo que sugiere que las mutaciones no resultan en una simple pérdida de función. La mutación es muy específica y conduce a un único cambio de aminoácido (arginina 132 por lo general se convierte en histidina) en el sitio activo IDH1, por lo que la enzima pierde su capacidad de catalizar la conversión de isocitrato a α-cetoglutarato, esto podría tener un efecto oncogénico indirecto a través de la activación de la vía del factor inducible por hipoxia, [21] un paso crítico en la adaptación metabólica de los tumores para el crecimiento anaeróbico y para la formación de nuevos vasos sanguíneos a través del proceso angiogénico.

Estudios realizados con biopsias seriadas de gliomas, revelaron que la mutación de IDH1 siempre se encuentra antes de la mutación TP53 o, en caso de oligodendrogliomas, antes de que sus deleciones típicas de los cromosomas 1p y 19q. La mutación de IDH1 es bastante específica, ya que es extremadamente rara en gliomas de grado I, tumores no glioma del cerebro y en otros tipos de cáncer. Los estudios sugieren que IDH1 mutante

pierde su actividad enzimática normal en los tumores mientras que gana una nueva actividad pro-oncogénica, que conduce a la producción de un onco-metabolito [13, 22, 23].

Sobre la base de sus perfiles de expresión de genes, La Red del Genoma del Cáncer Atlas (TCGA) clasifican a los GBMs, en cuatro subtipos llamados: pro neural, neural, clásico, y mesenquimales [9]. Basados en el estado de expresión de genes y mutaciones en EGFR, NF1, IDH1 y PDGFA, encontrándose que la respuesta a las terapias era diferente para cada subtipo, lo que sugiere que el tratamiento personalizado basado en alteraciones genómicas podría conducir a un resultado más favorable para esta enfermedad [24].

Biología Molecular de la invasión del Glioma

Los eventos celulares y moleculares que inician y promueven el desarrollo de glioma maligno no se entienden completamente. Los gliomas muestran un patrón único de invasión y, salvo raras excepciones, no producen metástasis fuera del cerebro. Para invadir, las células de glioma normalmente migran a estructuras anatómicas distintas. Estas estructuras incluyen la membrana basal (MB) de los vasos sanguíneos, el espacio subependimario, la glial limitante externa, y en paralelo y en intersección con tractos de fibras nerviosas, en la sustancia blanca.

La invasión de células tumorales en el tejido normal se piensa que es un proceso multifactorial, que consiste en las interacciones celulares con la MEC y con las células adyacentes, varios tipos de células tienen por objeto el movimiento activo durante las diversas etapas del desarrollo embrionario, durante la cicatrización de la herida, y en el curso de las respuestas inmunes. Esta actividad innata está regulada de una manera muy rígida, lo que sugiere la reaparición de un fenotipo móvil en las células de cáncer como resultado de la pérdida o el cese de los controles inhibitorios normales [25].

Los factores críticos en la invasión de las células tumorales, incluyen el desprendimiento de células de la masa del tumor primario, la síntesis de componentes de MEC por las células tumorales y las células mesenquimales, la liberación de componentes degradantes de la MEC para la remodelación de espacio intersticial, y la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular de glioma, específicas de MEC.

El desprendimiento de la invasión de células de glioma de la masa del tumor primario implica varios acontecimientos, incluyendo, la desestabilización y la desorganización de las uniones mediada por cadherina que mantienen la masa primaria juntos, pérdida de expresión de molécula de adhesión celular neural, que promueve la adhesión a la masa tumoral primaria a través de la unión hemofílica, la escisión de CD44, que ancla la masa primaria a la MEC por metaloproteinasas.

Cadherina, la súper familia de moléculas de adhesión están asociados con la invasión del glioma, forma uniones adherentes y puede funcionar como supresores de crecimiento del tumor y la invasión, están vinculadas a la actina del cito esqueleto a través de cateninas, estableciendo de ese modo las líneas moleculares de comunicación a otras uniones célula-célula y uniones célula-sustrato [26]. Durante la progresión del glioma la disminución de la función cadherina se correlaciona con la desdiferenciación, metástasis y mal pronóstico

[26]. Debido a su participación en procesos como la diferenciación morfológica y la inhibición por contacto del crecimiento y de la motilidad, las cadherinas pueden funcionar como supresoras del crecimiento tumoral y la invasión [25].

El segundo paso es una disminución en la expresión de la conexina 43, Conexina 43 es la proteína de unión más abundante en el SNC y se expresa principalmente en astrocitos [27]. La comunicación celular es importante en el control del crecimiento y la diferenciación. El aumento de la malignidad de los especímenes de glioma se correlaciona con una reducción en la formación de uniones comunicantes in situ, así como la reducción de la expresión de la conexina 43 [28].

El tercer evento es la escisión de CD44, que ancla la masa primaria a la MEC, por la metaloproteinasa ADAM. CD44 es una glicoproteína trans membrana que pertenece a la súper familia de receptores de inmunoglobulina, que interactúa con ácido hialurónico como su ligando. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD44 disminuyen la invasión intra cerebral de células de glioma in vivo y a través de matrices in vitro [29]. CD44 puede ser escindido por ADAM 10 y 17, y tanto los componentes escindidos extracelulares e intracelulares de CD44 promueven la migración celular [30].

Las integrinas

Las integrinas son receptores de superficie celular de transmembrana heterodiméricas que juegan un papel clave en la diafonía entre la célula y su estroma circundante, regulan la adhesión celular, la migración, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia durante condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la inflamación y el cáncer. Tras la unión a ligandos extracelulares (proteínas de matriz tales como colágenos, lamininas, fibronectinas y vitronectinas), las integrinas activan las vías de señalización corriente abajo, incluyendo PDGFR, EGFR y VEGFR.

Contienen dos cadenas distintas, llamadas subunidad α (alfa) y β (beta), éstas penetran en la membrana plasmática y típicamente tienen dominios citoplásmicos muy cortos de aproximadamente 40-70 aminoácidos. Fuera de la membrana plasmática, cadenas α y β sobresalen a una longitud de alrededor de 23 nm, una región es utilizada para formar enlaces a la MEC. Una subclase la llamada dominio-alfa A por lo general forma colágeno ($\alpha1\beta1$, y $\alpha2\beta1$), otras pueden actuar como moléculas de adhesión entre célula y célula (familia $\beta2$ integrina).

La integrina $\alpha v\beta3$, que se une a la fibronectina, la vitronectina y tenascina-C en MEC, se cree que desempeñan un papel central en la invasión glioma, el aumento de expresión conduce a un aumento de la motilidad en células de glioma con una disminución concomitante en la sensibilidad a la apoptosis [31].

Los glioblastomas comúnmente muestran una mayor expresión de varias integrinas con sus ligandos a lo largo de la MEC: $\alpha v\beta3$ y $\alpha v\beta5$ (receptores de vitronectina y tenascina), $\alpha5\beta1$ (receptor de fibronectina), $\alpha2\beta1$ (receptores de colágenos), y $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha6\beta1$ y (receptores de lamininas). Numerosos estudios se han centrado en la familia de las integrinas alfa v. Las integrinas $\alpha v\beta3$ y $\alpha v\beta5$ son marcadores de malignidad y la influencia de una variedad de procesos en la progresión del glioblastoma in vivo, incluyendo la proliferación, la apoptosis

y la angiogénesis. En consecuencia, las integrinas se han considerado como un objetivo terapéutico prometedor en el cáncer. Anticuerpos monoclonales e inhibidores de integrina están siendo investigados por su potencial actividad terapéutica en diversos tipos de tumores. Cilengitide, un antagonista de integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, extiende la supervivencia de ratones al retrasar el crecimiento del tumor y se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el glioma maligno recurrente (2). Esta estrategia está en fase de desarrollo clínico, en Glioblastoma avanzado. [32].

En las biopsias de glioblastoma, laminina-111 es altamente expresado en los vasos sanguíneos del tumor y dentro del tumor cerebral, es uno de los sustratos más permisivos para la adhesión y la migración de células de glioma in vitro. Además junto con integrina $\alpha v\beta 3$, protegen de la apoptosis a las células que migran [33].

La integrina $\alpha 6\beta 1$ juega un papel importante para la regulación de las células de glioma iniciadoras en el nicho perivascular, media la interacción de estas células a la laminina, proporcionando el anclaje necesario dentro del nicho perivascular. [32] Disminución de los niveles de la proteína integrina $\beta 1$ in vivo probablemente afecten a las interacciones de las células del glioma con componentes de MEC, lo que lleva a la reducción de la migración a lo largo de las membranas basales vasculares.

Proteasas

Son enzimas proteolíticas extracelulares que son esenciales para las propiedades invasivas de los tumores malignos [34]. Las barreras a la invasión no aparecen como restrictivas dentro del parénquima del SNC y sustratos de matriz responsables de impedir la migración tumoral no han sido identificados. Sin embargo, hay una fuerte evidencia de que la expresión de proteasas específicas de la matriz extracelular promueve el comportamiento invasivo en gliomas [35]. Estos incluyen las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), la cascada de activación del plasminógeno uroquinasa-dependiente, y catepsina. La expresión de MMPs es inducida por diferentes factores como EGF, TGF- β , PDGF, y varios mediadores de la inflamación, incluido TNF α e IL-1 β .

B. Wild-Bode et al. [36] encontró que la MMP-2 y MMP-3 y MMP-2 / MMP-9, tienen actividad correlacionadas con la migración de células de glioma y la invasión. Inducen expresión de inhibidor tisular de metaloproteinasas-3 (TIMP-3), un supuesto inhibidor de la actividad MMP, se ha demostrado para suprimir la infiltración y también para inducir la apoptosis en líneas celulares de cáncer. MMPs juegan un papel importante en la invasión tumoral del cerebro humano, probablemente debido a un desequilibrio entre la producción de MMPs y el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) por las células tumorales.

Las metaloproteinasas de matriz comprenden una gran familia de endoproteinasas dependientes del zinc, colectivamente capaces de degradar todos los componentes de MEC. Se conocen un total de 23 familias [37]. Su función es degradar diferentes componentes de la proteína de la MEC y de las membranas basales, por lo tanto que son esenciales para la interacción de las células individuales con el entorno y para el desarrollo y la función de los organismos multicelulares [38].

Entre los diversos sustratos de MMP incluimos colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas y otros componentes de MEC como tenascina, fibronectina y laminina, que a menudo también son sustratos que muestran expresión específica del tumor [39].

Las actividades proteolíticas de las MMPs influyen en los procesos esenciales celulares como la proliferación celular, la migración y adhesión, así como muchos eventos fisiológicos fundamentales que implican la remodelación tisular, tales como la angiogénesis, el desarrollo del hueso, cicatrización de heridas, y la involución uterina y mamaria [40].

MMP o matrixinas se sintetizan como zimógenos, proenzimas inactivas (pro-MMP), con el ion zinc, esenciales para la actividad MMP, oculto por un residuo de cisteína-sulfhidriilo situado cerca del extremo C-terminal del péptido. La activación de la pro-enzima comienza a metabolizar la interacción cisteína-zinc, de esta manera expone el sitio catalítico. La enzima totalmente activa se genera por escisión proteolítica del dominio pro-péptido de la enzima intermedia parcialmente activa [50]. Una vez activa, las MMP están reguladas por interacciones con los inhibidores endógenos incluyendo α 2-macroglobulina, trombospondina-2 e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) [37].

Un segundo sistema proteolítico que interactúa con MMPs es la vía de la activación del plasminógeno uroquinasa. Este sistema incluye la uroquinasa (también conocido como activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, uPA), el receptor de uroquinasa (uPAR), y plasminógeno. La uroquinasa se secreta como una sola cadena, proenzima inactiva que se activa por escisión tras la unión a su receptor de superficie celular uPAR, este a continuación convierte el plasminógeno en plasmina, una serina proteasa que promueve la migración celular por la degradación de proteínas de matriz extracelular, la activación de otras proteasas de la matriz y la activación de los receptores de la superficie celular que transducen la señalización intracelular para la migración. La plasmina activa de la proteasa del receptor activado 1 (PAR1), que normalmente se expresa en astrocitos humanos, se activa en muchos tumores malignos incluyendo GBMs, y se asocia con un aumento de las propiedades invasivas [41].

En co-cultivos de los gliomas malignos y astrocitos reactivos, más actividad UPA y uPAR se deriva de los astrocitos reactivos, mientras que el plasminógeno se expresa en mayores cantidades por las células de glioma [42]. Los niveles de mRNA de uPA y su actividad enzimática son más altos en los astrocitomas anaplásicos humanos y GBMs que en astrocitomas de bajo grado y el cerebro humano normal y los niveles de mRNA de uPA tienen una correlación inversa con períodos de supervivencia [43].

Las catepsinas

Son una familia de proteasas de cisteína lisosomal. Estas proteasas se sintetizan como proenzimas inactivas que son activadas por la actividad autocatalítica iniciado por un pH bajo o por otras proteasas incluyendo la catepsina D, uPA, y la pepsina. Reguladores naturales de catepsinas son las cistatinas, que son fundamentales, en sus propiedades inhibitoras. Catepsinas son secretadas en el espacio extracelular donde se degradan componentes de la matriz extracelular requeridos para las propiedades invasivas en la enfermedad neoplásica. Mejor estudiado por su papel en la tumorigénesis del glioma y la invasión son las catepsinas B, D, H, L y S. Cada uno de estos subtipos de catepsina tiene

mayores niveles de proteína en los astrocitomas de alto grado que los tumores de bajo grado o cerebro normal y actividades enzimáticas, en general, se correlacionan con la expresión de la proteína [44, 45]. El papel de las catepsinas en la invasión tumoral ha sido apoyado por el hallazgo de que las células tumorales en el borde de la invasión de los gliomas expresan altos niveles de catepsinas, especialmente la catepsina B [46].

La matriz extracelular

La MEC afecta a numerosas funciones y procesos en el cerebro. Durante el desarrollo del cerebro, la MEC modula la migración de células gliales y neuronales precursoras, guía el crecimiento axonal, la formación de sinapsis y la proliferación celular. ECM es una red compleja de diferentes colágenos, proteoglicanos, ácido hialurónico, laminina, fibronectina, y muchas otras glicoproteínas, incluyendo enzimas proteolíticas implicadas en la degradación y remodelación de la ECM [47]. Las funciones desempeñadas por la MEC en la transformación neoplásica son complejas. La matriz extracelular existe en dos formas: la matriz intersticial que ocupa el espacio intercelular y la MB más especializada, que es una delgada lámina de matriz extracelular subyacente en el epitelio. MEC proporciona el microambiente de las células y sirve como un andamio de tejido, guiando la migración celular durante el desarrollo embrionario y la reparación de heridas.

Proteínas de la MEC tales como fibronectina, laminina o colágeno forman redes distintas de proteínas que muestran la variación específica de tejido en la composición y arquitectura. Cambios en estos componentes de ECM modulan el crecimiento del tumor cerebral, la proliferación y la invasión, a pesar de las interacciones específicas y mecanismos exactos son desconocidos.

Los ligandos extracelulares que se anclan a estas adherencias incluyen laminina, fibronectina, vitronectina, y varios colágenos. Adherencias focales pueden ser considerados tanto como sensores de fuerza y como sitios que se originan fuerzas del citoesqueleto a través de microfilamentos anclados de haces de actina. Adhesiones focales tienen componentes que contienen moléculas fosforiladas de tirosina.

Miembros de la superfamilia de Ig constan de tipo similar a inmunoglobulina y fibronectina III dominios implicados en la adhesión homofílica y heterofílica célula-célula y. La superfamilia incluye una variedad de moléculas de adhesión celular (CAMs) con especificidades de unión a ligandos distintos, incluyendo ICAM (intercelular), NCAM (neural), Ep-CAM (epitelial), L1-CAM, VCAM (vascular), ALCAM (leucocitos activados), y JAM (molécula de adhesión de la unión), entre otros. Las cadherinas son proteínas transmembrana que consisten en varios dominios cadherina repetidas en tándem que median contactos homofílicos célula-célula dependiente de calcio.

La superfamilia cadherina cuenta con un total de más de 100 miembros diferentes, con E (epitelial) y N-cadherina (neuronal) que más se expresa en los tejidos epiteliales y neuronales, respectivamente [47]. Por convención, los componentes de ECM se clasifican bioquímicamente en las proteínas (colágenos fibrilares), glicoproteínas (fibronectina, lamininas, tenascinas), y varias clases de proteo-glicanos (Sulfate- heparán, Sulfate- de condroitina, Sulfato- de dermatano, sulfato de queratano y proteoglicanos). Estos últimos consisten principalmente de las grandes (GAG) cadenas de glicosaminoglicanos, unido

covalentemente a las proteínas del núcleo extra-celulares o unidas a la membrana. En contraste con otros tejidos, el ECM en el SNC carece de proteínas fibrilares en condiciones fisiológicas. En cambio, el ECM neural es rico en glicoproteínas y proteoglicanos. Se ha estimado que el ECM neural representa aproximadamente el 20% del parénquima CNS [48]. La MEC del cerebro se deposita principalmente por astrocitos y oligodendrocitos y comprende un estimado de 20% del volumen del cerebro en los adultos.

Los principales componentes de ECM son el ácido hialurónico (HA), tenascina R, y lecticans, que interconectan entre sí de forma no covalente y forman redes moleculares que llenan el espacio intercelular. HA es un glicosaminoglicano lineal no sulfatado, de alto peso molecular que, debido a su capacidad de retención de agua, controla el alto contenido de agua del intersticio cerebro. Tenascinas y lecticans, en conjunto contribuyen a la organización tanto de la MEC y la interacción célula-matriz. Los gliomas malignos contienen cantidades más altas de HA que los gliomas de bajo grado *in situ* e *in vitro*. Las tenascinas (TN) son una familia de grandes proteínas de la MEC multiméricas que consisten en módulos estructurales repetidos incluyendo factor de crecimiento epidérmico (EGF), repeticiones de fibronectina de tipo III, y un dominio globular compartido con los fibrinógenos. Las TN están presuntamente involucradas en la morfogénesis de muchos órganos y tejidos [49, 50]. La original tenascina descubierta fue TN-C, en parte debido a su sobreexpresión en los tumores. TN-C aparece inicialmente durante el desarrollo de células de la cresta neural embrionaria, y está presente durante la organogénesis del cerebro y la médula espinal, que se correlaciona con los fenómenos del desarrollo, tales como la proliferación celular, la migración, y la remodelación de MEC. Un aumento de la expresión TN-C se detectó entre las células tumorales, alrededor de las células individuales como una red fibrilar, y alrededor de los canales vasculares [51]. Una relación directa entre la presencia de TN-C y el grado de malignidad de los gliomas se ha informado ya que se expresa 5 veces mayor en GBM en comparación con AA y 10 veces mayores en comparación con el astrocitoma pilocítico juvenil [52, 53]. La tenascina R, otro miembro específico de la familia tenascina del cerebro, es un homotrímero con ambos sitios de unión de la integrina lectican y la formación de un puente de adherencia entre el ECM y células. Lecticans son moléculas de proteoglicanos que contienen sitios de unión con HA y tenascina R y por lo tanto actúan como moléculas de enlace en las redes de proteínas de proteoglicanos-glicosaminoglicanos. La fibronectina (FN) es un miembro de una familia de glicoproteínas que muestran muchas funciones biológicas, incluyendo la adhesión normal de las células, el crecimiento y la migración, está involucrado en muchos procesos celulares, incluyendo la reparación de tejidos, la embriogénesis, la coagulación y la migración / adherencia de células. Tanto disminución de la expresión y la degradación elevada de FN han demostrado ser responsables de algunos de los cambios morfológicos observados en los tumores y líneas celulares derivadas de tumores. Knott et al., encontraron que cuando los tejidos normales del cerebro fueron invadidos por glioma, los componentes de ECM tales como LN, FN y colágeno tipo IV pueden estar disponibles y que las células tumorales pueden expresar integrinas específicas, dependiendo del cambio del medio ambiente interior, para interactuar con estos componentes de ECM, y mejorar la invasión de células tumorales [54].

Angiogénesis

Angiogénesis fisiológica, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es un proceso afinado estrictamente regulado. El equilibrio local entre los inductores e inhibidores de la angiogénesis es esencial en la determinación de la generación o no de nuevos vasos. Cada vez que este equilibrio es perturbado, la angiogénesis excesiva ocurre de forma patológica. La angiogénesis es un proceso que desempeña un papel esencial en el desarrollo del cáncer. La coagulación y la inflamación también juegan un papel importante en la tumorigénesis. Aunque una gran cantidad de moléculas puede actuar como inductores de la angiogénesis tales como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleucina-8 (IL-8), los principales factores de crecimiento específicos para el endotelio vascular incluye a los miembros del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las familias de angiopoyetina.

La neovascularización en tumores cerebrales se correlaciona directamente con su agresividad biológica, el grado de malignidad y recurrencia clínica e inversamente con la supervivencia post-operatorio. Entre todos los tumores sólidos, GBM es el más angiogénico, visualizando el más alto grado de proliferación vascular e hiperplasia de las células endoteliales. Tal intensa vascularización podría ser responsable de la edema peritumoral, una de las características patológicas de GBM [95]. La vasculatura de los gliomas es estructuralmente y funcionalmente anormal y se correlaciona con el edema vasogénico, que conduce al aumento de la presión intersticial, y la entrega heterogénea de oxígeno y drogas [55].

Neoangiogénesis puede cuantificarse después de la operación en los tumores cerebrales por la evaluación en muestras quirúrgicas de la llamada densidad de los microvasos (MVD), que refleja el número de vasos por mm² dentro de las secciones histológicas representativas. En concreto, MVD se evalúa en secciones de tejido fijado en formol y embebidos en parafina mediante inmunohistoquímica estándar; Los anticuerpos contra varios marcadores endoteliales, tales como el Factor VIII, CD31, CD34 y endoglina, se pueden usar para la cuantificación de MVD, con diferente sensibilidad y especificidad. [56]. Además, cuando MVD se evaluó mediante el uso de la endoglina como un marcador de la angiogénesis, parece estar correlacionado significativamente a la fracción de crecimiento y el grado histológico de los meningiomas, y que ha demostrado tener un impacto pronóstico en la supervivencia y la recurrencia del riesgo global de estas neoplasias [56]. Por lo tanto, se recomienda el uso de anticuerpos anti-endoglina en lugar de la de los anticuerpos pan-endoteliales para la cuantificación de la angiogénesis en los tumores cerebrales. Además, la demostración de la expresión de endoglina en los vasos del tumor también puede abrir perspectivas terapéuticas. De hecho, se ha demostrado recientemente que los anticuerpos monoclonales contra la endoglina son capaces de inducir la regresión del crecimiento tumoral a través de la inhibición de la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis en sí [57].

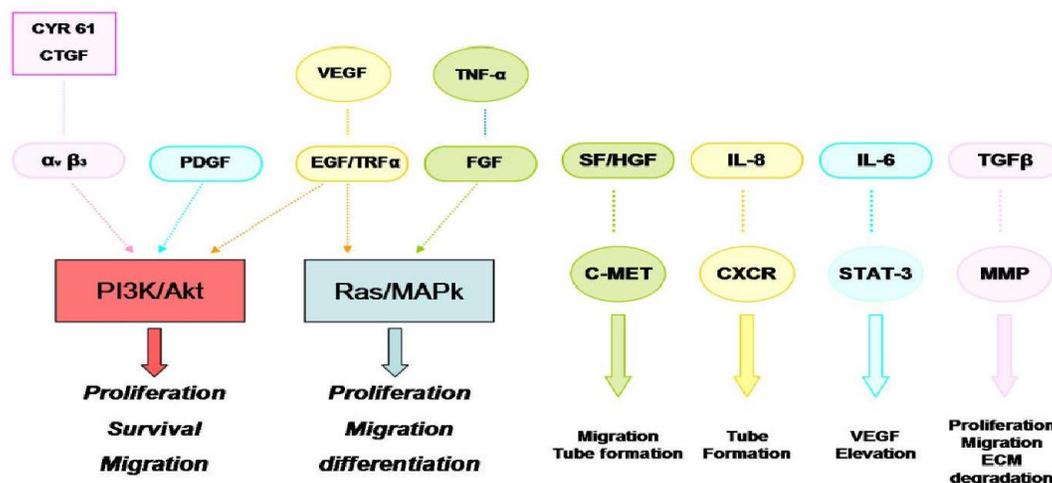
En una primera fase, las células de glioma se acumulan alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales existentes una vez iniciados los procesos astrocíticos, lo conduce a la interrupción del contacto normal entre las células endoteliales y la membrana basal [58]. Las células endoteliales afectadas expresan angiopoyetinas resultantes en la

desestabilización de la pared del vaso y la disminución de la cobertura de pericitos. Las angiopoyetinas son factores de crecimiento endoteliales y su vía de transducción de señal pasa a través de los receptores tirosina quinasa. En particular, Ang-1 y -2, han sido implicados en la angiogénesis del glioma [59]. Ang-1 media la activación de Tie2, necesaria para la estabilización, la remodelación y maduración de los vasos sanguíneos, promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral y se asocia con un aumento del número de vasos altamente ramificados. Ang-1 induce la fosforilación de Tie2 y la subunidad p85 de PI3K y aumenta la actividad de PI3K en una forma dependiente de la dosis, que conduce a la supervivencia de células endoteliales a través de la señalización de Akt. Además, Ang-1 estimula la migración de células endoteliales a través de una activación de PI3K dependiente de quinasa de adhesión focal (FAK), que tiene un papel clave en la regulación de los cambios dinámicos en la organización del citoesqueleto de actina durante la migración celular. El efecto biológico de Ang-2 puede depender de nivel de VEGF. En presencia de VEGF endógeno, Ang-2 promueve la dilatación de los vasos, la remodelación de la lámina basal, proliferación y migración de células endoteliales, y estimula la germinación de nuevos vasos sanguíneos. En ausencia de la actividad de VEGF, Ang-2 se convierte en anti-angiogénica mediante la promoción de la muerte celular endotelial y la regresión de los vasos [59]. El aumento de expresión de Ang-2 en la microvasculatura del GBM aparece temprano durante la angiogénesis glioma. Ang-2 y la expresión de Tie2 están ausentes en la vasculatura cerebral normal pero se inducen en el endotelio del tumor antes de su regresión. El tratamiento de glioma derivadas de xenoinjertos celulares de ratón con una forma dominante negativa de Tie2 se traduce en una disminución significativa en el crecimiento del tumor [60]. Por lo tanto, Ang-2 representa un punto de control para Ang-1 / angiogénesis mediada por Tie2 [61]. En el crecimiento del tumor cerebral que es posible observar dos fases vasculares. En la primera, los vasos son vasos cerebrales nativos, que son captados por las células tumorales, mientras que en la segunda fase, es cierto que ocurra una neovascularización resultante de los vasos existentes. Durante el período de transición entre estas dos fases, se produce la de expresión de factor inducible por hipoxia HIF-1, lo que resulta en la secreción de VEGF y en la inducción de neovascularización. En el estadio IV, la angiogénesis adyacente a la zona necrótica se activa en respuesta a un aumento de la expresión de HIF-1 α y VEGF. Para la germinación del vaso es esencial la deposición de matriz proangiogénica. Esto implica la ruptura de la membrana vascular basal y la matriz extracelular a través de la acción de la cathepsina B, metaloproteasas de la matriz y otras enzimas así como la expresión de proteínas de la matriz tales como fibronectina, laminina, tenascina-C y vitronectina [62]. La degradación de la membrana basal del vaso y MEC circundante, lo que también facilita la invasión de las células endoteliales, es una parte integral del proceso angiogénico en curso. Las enzimas de la familia de metaloproteinasas de matriz que degradan componentes de ECM constan de cuatro grupos de acuerdo con sus sustratos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y MMP asociadas a la membrana. Gelatinasas-A (MMP-2) y gelatinasas-B (MMP-9) son altamente expresados en los astrocitomas, y sus niveles de expresión, especialmente los de MMP-9, se correlaciona con el grado histológico de tumor. La expresión de MMP-2 y MMP-9 es fuertemente inducidos por la hipoxia, y estas dos moléculas parecen tener un efecto sinérgico sobre la degradación de la membrana basal [63]. Los inhibidores de las MMP se llaman inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), que se componen de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Las interacciones entre estas proteasas y sus inhibidores juegan un papel importante en la morfogénesis celular, la angiogénesis, la remodelación de tejidos, reparación de tejidos,

metástasis tumoral, cirrosis, y la artritis. Después de ruptura de la membrana basal, las células endoteliales proliferan y migran hacia las células tumorales que expresan compuestos pro-angiogénicos. Además de la migración de las células endoteliales, la migración de pericitos es una parte importante de la formación de vasos del tumor, ayuda en el establecimiento de una nueva membrana basal [64].

El descubrimiento del factor 1 inducible de hipoxia (HIF-1) y la observación de que la expresión de HIF-1 α en pseudoempalizada, en las áreas necróticas tumorales, inducida por hipoxia era concomitante con la expresión de uno de sus genes diana, VEGF, estableció un enlace biológico entre la hipoxia y la angiogénesis [65]. El activador más potente de los mecanismos angiogénicos en los tumores cerebrales es la hipoxia tisular. En la hipoxia, los heterodímeros α / β , se unen a una secuencia de pentanucleotide (RCGTG) en los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) de genes objetivo. Se supuso que el microambiente hipóxico (1-2% O₂) es causado por el aumento del consumo de oxígeno de la hiperplasia y / o hipertrofia y la entrega de oxígeno disminuido debido al aumento de la distancia de difusión para contribuir a la cambio angiogénico. VEGF, que regula el edema del tumor y la formación de vasos sanguíneos, es un ejemplo de un gen regulado por un HIF-1. La angiogénesis es esencial para el desarrollo, la curación de heridas, regeneración de órganos o tejido, pero también es parte de los procesos patológicos, tales como el cáncer y ciertas retinopatías. Se trata de un proceso de múltiples pasos intrincado y temporalmente ordenado que implica un gran número de genes. Muchos de estos genes son inducidos directamente por HIF-1 α , como síntesis de óxido nítrico, factores de crecimiento angiogénicos y vasculares y los genes que regulan el metabolismo de la matriz (receptor del activador del plasminógeno; urokinasetype uPAR) [66]. En un estudio reciente, se ha demostrado que la SN38, el metabolito activo de CPT11, exhibió un efecto antiangiogénico. SN38 inhibió HIF-1 α y VEGF mRNA y expresión de proteínas de células de glioma de una manera dosis y dependiente del tiempo [67]. Los tejidos tumorales tratados con CPT11 exhibieron disminución de la expresión de la proteína HIF-1 α y de pimonidazol, que eran indicativos de zonas de hipoxia por inmunohistoquímica.

Figura 6. Mediadores de la angiogénesis en los Gliomas.



En el fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) / Akt y Ras / mitogen-activated-proteín-quinasa (MAPK) convergen muchos factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF). Estas vías modulan importantes procesos celulares en la angiogénesis, incluyendo la proliferación endotelial celular, la supervivencia, migración, invasión, la formación del vaso y la degradación de la matriz extracelular. / CXCR = C-X-C, = Receptor de quimiocinas, CYR6.1 = inductor angiogénico rico en cisteína 61, CTGF = factor de crecimiento de tejido conjuntivo, EGF = factor de crecimiento epidérmico, FGF = factor de crecimiento de fibroblastos, HGF = factor de crecimiento de hepatocitos, IL-6 = interleuquina-6, IL-8 = interleucina-8, MMP= metaloproteinasas de matriz, PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas, PI3K = fosfatidil inositol 3 quinasa, SF = factor de dispersión, TGF- α = factor de crecimiento transformante alfa, TGF- β = factor de crecimiento transformante beta.

Mediadores de la angiogénesis en los gliomas

La angiogénesis en los gliomas está mediada por la liberación de citoquinas angiogénicas por las células tumorales. Numerosas, diferentes citoquinas se han identificado hasta el momento que son capaces de inducir la angiogénesis (**Figura 6**). Esta producción de citoquinas es el resultado de la sobreexpresión de factores angiogénicos a través de alteraciones genéticas o bien es provocada por la hipoxia.

VEGF, vías y receptores.

La familia de los factores de crecimiento VEGF y sus receptores son los mediadores más importantes de la angiogénesis. La familia VEGF incluye seis glicoproteínas que se hace referencia como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, y el factor de crecimiento placentario. El VEGF actúa como un importante factor de permeabilidad vascular y como un promotor mitógeno / de supervivencia para células endoteliales [67, 68]. VEGF-A y sus receptores son la mejor vía de señalización caracterizada en la angiogénesis y se une a dos receptores tirosina quinasa (RTK) - VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR, Flk-1) [69]. Se conviene generalmente que VEGFR-2 es el principal receptor de la mediación de los efectos mitógenos, angiogénicos y de permeabilidad de VEGF-A. La evidencia reciente ha sugerido que VEGFR-1 participa en la hematopoyesis y en el reclutamiento de monocitos y otras células derivadas de médula ósea para promover la angiogénesis tumoral [70]. Además, VEGFR-1 está implicado en la activación de MMPs asociadas con la degradación de la matriz y en la producción de factores de crecimiento de células endoteliales. La expresión génica de VEGF-A está regulada por la hipoxia, mediada por el factor de transcripción HIF y el producto del gen supresor de tumor von Hippel-Lindau (VHL). Otros factores de transcripción capaces de regular positivamente la transcripción de VEGF incluyen el ETS-1 proto-oncogén y STAT-3 que activan muchos genes implicados en la angiogénesis, incluyendo aquellos que regulan VEGFR-1 y VEGFR-2, β_3 integrina, algunas MMPs y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). ETS-1 se expresa con más frecuencia en GBM [71]. VEGF promueve la proliferación endotelial a través de la activación de la vía de las MAPK. VEGF también aumenta la permeabilidad vascular a través de la cascada de señalización de MAPK por la reordenación de los complejos de cadherina / catenina y el aflojamiento de las uniones adherentes entre las células endoteliales [72]. El VEGF-A es secretado por las células tumorales así como por el estroma y células inflamatorias. VEGF-A se puede vincular en la matriz extracelular a través de la interacción con los proteoglicanos

o glicosaminoglicanos. La expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 está regulada en las células endoteliales en gliomas. La activación de VEGF-A provoca la diferenciación de células endoteliales, induce la proliferación celular y la formación de un nuevo vaso [73]. Los ligandos para VEGF3 (VEGF-C y D) se expresan de múltiples tipos de células que rodean los vasos angiogénicos, lo que sugiere la existencia de una nueva vía de señalización paracrina pro-angiogénicas en estas neoplasias. Además de los factores de transcripción, la expresión de VEGF probablemente, se correlaciona con muchos otros factores de crecimiento y sus receptores específicos, incluyendo factor de crecimiento transformante (TGF) - β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) -B, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos básico (FGF). La activación de MAPK / ERK está asociada con la inhibición de la vía de Jun-N terminal quinasa (JNK) en la mediación del efecto anti-apoptótico de VEGF. La vía PI3K / Akt es de importancia central en la señalización de VEGF. VEGFR-2 Activado media la fosforilación de Akt, que inhibe de forma potente la apoptosis de células endoteliales interfiriendo con diversas vías de señalización. Akt también promueve la migración de células endoteliales, y aumenta la expresión de HIF, lo que lleva a una mayor expresión de VEGF [74]. El resultado final de la señalización de VEGF en los tumores es la producción de vasos sanguíneos inmaduros, altamente permeables con el consiguiente mantenimiento deficiente de la BHE y el edema del parénquima [75, 76]. Alternativamente, el efecto angiogénico del VEGF puede ser mediado a través de integrinas, α 1 β 1, A2B1 y avb3, que promueven la migración celular, proliferación y remodelación de la matriz.

Receptores de los factores de crecimiento de fibroblastos

La familia de las proteínas de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores se sobreexpresan en varios tipos de cáncer. La unión de FGF a su receptor provoca transfosforilación y activación de tirosina quinasa intrínseca, lo que resulta en la transducción de señal. Tanto FGF ácido (aFGF) y el FGF básico (bFGF) están sobre regulados en el GBM [77] y son responsables de la resistencia de las células endoteliales a la apoptosis. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) se expresa por las células vasculares y, focalmente, por las células tumorales. Los receptores de bFGF incluyen FGFR1, expresado por las células tumorales y las células endoteliales tumorales y la FGFR2 expresado sólo por las células tumorales. El efecto antiapoptótico de bFGF está mediado por el aumento de expresión de Bcl-XL y Bcl-2 a través de la vía de señalización MEK-dependiente.

Familia PDGF

PDGF-B y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGFRB) tienen papeles importantes en el desarrollo y la diferenciación de la pared del vaso [78]. PDGF es un mitógeno para múltiples células de origen mesenquimatoso y neuroectodérmico que actúa a través de los receptores α y β de PDGF. PDGF-B se requiere para el reclutamiento de pericitos y la maduración de la microvasculatura. PDGFR- β se expresa en células endoteliales de tumores astrogliales y la expresión de PDGF se correlaciona con la malignidad astrogliar y la actividad angiogénica.

PDGF contribuye indirectamente a la angiogénesis tumoral actuando como un estímulo mitogénico y quimiotáctico potente para la angiogénesis asociada células estromales, tales

como células musculares lisas o pericitos. Sin embargo, los efectos de PDGF sobre la angiogénesis están mediados en parte por VEGF. Los efectos angiogénicos de PDGF están mediadas a través de la señalización de PI3K / Akt, MAPK / ERK y STAT3 [79].

Moléculas de la cascada inflamatoria

Las moléculas de la cascada inflamatoria, actúan indirectamente sobre la angiogénesis a través de la modulación de la expresión de factores angiogénicos directos. La interleuquina-8 (IL-8) es un potente quimioatrayente. Pero los datos recientes sugieren que tiene un papel fundamental en la angiogénesis tumoral y la progresión glial. Se ha demostrado niveles altos de expresión de PGES-1 (prostaglandina E sintasa 1) y la IL-8 en células de gliomas malignos y células microgliales, fuertemente correlacionados con el grado del tumor. [80]. La expresión de citoquinas inflamatorias como IL-8 se observó por primera vez en el astrocitoma de bajo grado en las zonas tumorales perivasculares. En los gliomas malignos, IL-8 se localiza más en las células carentes de oxígeno que rodean las áreas de necrosis. Los macrófagos se sabe que producen altos niveles de IL-8, que tiene una actividad tumorigénica, mediante la inducción de crecimiento tumoral y la angiogénesis; IL-8 es una citoquina quimioatrayente en respuesta al microambiente tumoral. Las células tumorales en pseudoempalizada secretan HIF que induce secreción de IL-8. Sobre la base de los resultados preliminares, se ha demostrado el papel de la IL-8 como mediadores cruciales de la angiogénesis dentro de la vía HIF-1 α y la diafonía entre los altos niveles de la hipoxia inducida por HIF-1 α y la expresión del VEGF.

Las isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) catalizan la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Mientras que la COX-1 se expresa de forma ubicua en una amplia gama de tejidos, la COX-2 es inducible de citoquinas. COX-2 se expresa en células de glioma humano donde su expresión se correlaciona con la malignidad, siendo más alta en el glioblastoma. La eficacia anti-angiogénica de los inhibidores de COX-2 se explica actualmente por primera vez por regulación a la baja de VEGF, lo que resulta en el bloqueo de proliferación de células endoteliales y la inducción de apoptosis de las células endoteliales y la segunda por la inhibición de la función de la integrina y la señalización.

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) es una citocina proinflamatoria potente con un papel bastante complejo en la supervivencia de las células endoteliales y la migración. Tiene impacto sobre la supervivencia de células endoteliales y la migración a través de su receptor de TNF 1 y 2, que ambos se expresan en las células endoteliales.

La membrana tipo 1 de la matriz de metaloproteinasas (MT1-MMP) expresada por la célula germinar endotelial, es regulada hacia abajo cuando estas entran en contacto con los pericitos, induciendo la expresión del factor tisular inhibidor de las metaloproteinasas-2 (TIMP-2) en las células endoteliales y TIMP-3 en los pericitos, inhibiendo el fenotipo proteolítico en las células endoteliales [81]. También se requiere de MT1-MMP en la superficie celular endotelial para el paso siguiente en la cascada de la angiogénesis por jugar un papel en la formación del lumen. La luz del vaso está cerrada herméticamente por las células endoteliales adyacentes unidas por uniones estrechas y adherentes.

Muchos otros factores proangiogénicos están regulados por incremento en los gliomas y este aspecto podría explicar el fracaso de muchas estrategias terapéuticas

antiangiogénicas en el manejo de los gliomas. TGF- β y sus receptores son altamente expresados en los gliomas malignos, especialmente en áreas de hiperplasia vascular y alrededor de regiones necróticas. En células de glioma, el efecto angiogénico de TGF- β es probablemente mediado a través de la mayor expresión de VEGF. TGF- β también promueve la angiogénesis a través de la vía de señalización de integrina. TGF- β regula positivamente la expresión de la integrina $\alpha\beta 3$ que, a su vez, se une a MMP-2, lo que conduce a la degradación de la MEC y la invasión celular endotelial mejorada [82].

La Microglia

Los tejidos de glioma obtenidos por resección quirúrgica contienen también una cantidad considerable de células no transformadas. La mayoría de estas células son macrófagos asociados al tumor (MAT) [83-84]. Los Macrófagos residentes del cerebro se denominan microglia. Estas células invaden el cerebro en el desarrollo temprano y se diferencian en microglia ramificada. Esta microglia asociada a tumor muestra una morfología ameboidea, comparte muchas propiedades con los macrófagos que se encuentran en tejidos no neuronales, incluyendo la sangre, es posible que la microglia asociada al glioma sea reclutada de novo a partir de la población residente microglial en el cerebro, o, alternativamente, migrar hacia los tumores cerebrales de la periferia. Badie y Schartner [85] De esto, concluyó que los macrófagos se encuentran principalmente dentro de los tumores, mientras que la microglia se detectó en todos los tejidos del cerebro. Quimioatrayentes de microglia asociados a tumor incluyen proteína quimiotáctica de monocitos-3 (MCP-3), factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), factor estimulante de colonias granulocíticas. (G-CSF), y factor de crecimiento del hepatocito. [86-87].

Los MAT pueden promover la progresión del cáncer a través de varios mecanismos, entre ellos la promoción de la angiogénesis, la inducción del crecimiento del tumor, y la mejora de la migración de las células tumorales y la invasión. El estrés hipóxico en la masa tumoral conduce a la expresión de moléculas inflamatorias, que promueven el reclutamiento de macrófagos, seguido por conversión en el fenotipo M2. MAT son capaces de modular e inducir neovascularización y funciones relacionadas con la formación de estroma. Cuando se activan los TAM, en respuesta a estímulos específicos, estas células pueden expresar un repertorio de sustancias que promueven la angiogénesis. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos ácidos (aFGF / FGF1), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF / FGF2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento transformante- α , factor de crecimiento-1 similar a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento- β tumoral (TGF- β) y otras monoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina-1, interleucina-6, interleucina-8, la sustancia P, prostaglandinas, interferones y trombospondina que son liberadas por las células tumorales conduce a la activación de los macrófagos y tienen la capacidad de influir en el proceso angiogénico [88].

La angiogénesis también se ve facilitada por proteasas derivadas de MAT liberados en los tumores, como la proteólisis extracelular es un requisito absoluto para la nueva formación de vasos sanguíneos. MAT se ha informado que se correlaciona con el potencial

metastásico de una variedad de cánceres humanos, y que también se han demostrado ser una fuente importante de la MMP-9 [88]. Así MAT tienen la capacidad de afectar a cada fase del proceso angiogénico, incluyendo la degradación de la matriz extracelular, proliferación de células endoteliales y la migración de células endoteliales. TAM también puede secretar proteasas lisosomales de tipo cisteína y una amplia variedad de factores de crecimiento que pueden estimular el crecimiento del cáncer.

Los neo vasos tumorales son generalmente desorganizados y propensos a destruirse, lo que resulta en áreas de perfusión inadecuada y la hipoxia. Además, la proliferación rápida de células tumorales en algunas áreas puede superar la tasa de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, causando más áreas hipóxicas [89]. El nivel de MAT en los tumores parece estar afectado por la hipoxia, números de MAT son generalmente más altos en los tumores que contienen altos niveles generales de hipoxia, como se ve en los carcinomas de mama humanos primarios y varios tipos tumores en animales de experimentación.

Esto es provocado por la hipoxia sobre regulación de factores de transcripción tales como factores hipoxia inducible, HIF-1 α y HIF-2 α . MAT responde a la hipoxia hasta la regulación de una amplia gama de genes que codifican proteínas que promueven la proliferación, invasión y metástasis de células tumorales, así como la angiogénesis tumoral. Los genes que codifican para M-CSF están sobre expresado en algunos tumores humanos, y elevados niveles de M-CSF se correlacionan con un alto número de TAM y de mal pronóstico [90]. Los macrófagos hipóxicos son probable que promuevan el comportamiento invasivo y / o metastásico de las células tumorales mediante la liberación de factores pro-invasivos tales como el factor inhibidor de macrófagos [91]. Estos modulan las actividades en las células tumorales, incluyendo la estimulación de la motilidad. [92]. Esto puede implicar efectos indirectos, como la liberación del factor inhibidor de macrófagos estimulados de la matriz de la metaloproteinasa 9, que a su vez degrada componentes de la membrana basal y la matriz extracelular, lo que aumenta la motilidad de las células tumorales.

En un modelo de cortes de cerebro de ratón en cultivo, la invasión y el crecimiento de células de glioma se comparó entre las rebanadas normales y con depleción de microglia. La invasión de células de glioma se redujo significativamente en el tejido con microglia reducida en relación con el control [93]. El impacto de la microglia en la migración glioma podría relacionarse con la producción de metaloproteasa de tipo 1 por la microglia en respuesta a factores solubles liberados a partir de células de glioma. Células de glioma también liberan metaloproteasas 2 que está totalmente activados por MT1-MMP liberado de la microglia. La consiguiente degradación de la matriz extracelular se ha postulado para mejorar la invasión de células de glioma en el parénquima cerebral. La importancia de la microglia para el crecimiento del glioma se justificó aún más luego de estudios en animales en los que la microglia se depletó. El agotamiento in vivo de la microglia se logró utilizando el modelo de ratón CD11b-HSVTK. Siete días después de la inoculación intracerebral de glioma, ganciclovir (un sustrato específico para la timidina quinasa viral HSVTK) se infundió a través de mini-bombas en el área del tumor durante otros 7 días. El tratamiento con ganciclovir condujo a una disminución considerable de la microglia y una reducción del 80% en el volumen de glioma [93].

CD68 es un anticuerpo monoclonal murino que marca a los monocitos y macrófagos humanos. El antígeno reconocido por CD68 está ausente en la microglia en reposo, pero es

fácilmente detectada en la microglia fagocítica, las células perivasculares y los macrófagos cerebrales. En un estudio reciente, se ha evidenciado la presencia de células positivas CD68 en áreas limítrofes a las células neoplásicas, zonas necróticas y áreas hipóxicas, en el tejido neoplásico [94]. En casos de tumores anaplásicos, las células neoplásicas parecen estar guiadas hacia la microglia. Estos datos, reforzaron la hipótesis de que la infiltración de macrófagos podría estar estrechamente asociado con la neovascularización y la malignidad en los gliomas humanos. La actividad de metaloproteasas de matriz también está regulada por la vía de señalización CX3CL1 / CX3CR1. Por ejemplo, metaloproteasas de la matriz 2, 9, y 14 están reguladas por el incremento en la microglia después de la activación de la señalización de CX3CL1 / CX3CR1. Notablemente, CX3CR1 es sobre regulado en glioma asociado con la microglia [95] y los polimorfismos en el receptor de quimioquinas CX3CR1 se han asociado con el pronóstico en pacientes con glioma. El alelo CX3CR1 común (denominada V249I) fue un factor pronóstico favorable. Los pacientes que tuvieron sólo este alelo CX3CR1 tenían más de 1.5 de tiempo medio de supervivencia. Este alelo común se asoció con una reducción de la infiltración de células microgliales en biopsias de tumores primarios [96].

Agradecimientos

Agradecemos al personal de la Biblioteca de la Universidad Católica de Argentina de donde se obtuvieron los artículos y permisos correspondientes para el uso del material bibliográfico.

Nota del Editor

La Revista Oncología Ecu permanece neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Información adicional

Abreviaturas

SG: Supervivencia global.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

TDMI: Trastuzumab emtansina.

RH: Receptores hormonales.

ITK: Inhibidores de tirosina quinasa.

cRP: Respuesta patológica completa.

ddAC: Dosis densas de doxorubicina y ciclofosfamida.

FEC: Fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida.

TCHP: Docetaxel, carboplatino, trastuzumab y pertuzumab.

THP: Docetaxel, trastuzumab y pertuzumab.

HP: Trastuzumab y pertuzumab.

Archivos Adicionales

Ninguno declarado por los autores.

Fondos

Los fondos de la investigación fueron propios de la autora del presente artículo.

Aprobación de ética y consentimiento para participar

No aplica para el presente estudio.

Consentimiento para publicación

No aplica para estudio de revisión narrativa.

Referencias

1. Caruso G., Caffo M., Raudino G., Alafaci C., Tomasello F. New Therapeutic Strategies in Gliomas Treatment. In: Abujamra A.L. (ed). Brain Tumors - Current and Emerging Therapeutic Strategies. Rijeka: Intech; 2011. p281-306.
2. Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR, Lieberman F, Wen PY, et al. Cilengitide in Patients with Recurrent Glioblastoma: the Results of NABTC 03-02, a Phase II Trial with Measures of Treatment Delivery. *Journal of Neurooncology* 2012; 106(1) 147-153.
3. Osborn AG, Salzman KL, Thurnher MM, Rees JH, Castillo M. The New World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: What Can the Neuroradiologist Really Say? *American Journal of Neuroradiology* 2012; 33(5) 795-802
4. Pouratian N, Schiff D. Management of Low-Grade Glioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2010; 10(3) 224-231.
5. Pignatti F., van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, et al. Prognostic Factors for Survival in Adult Patients with Cerebral Low-Grade Glioma. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(8) 2076-2084.
6. Weller M. Novel Diagnostic and Therapeutic Approaches to Malignant Glioma. *Swiss Medical Weekly* 2011; 141 w13210.
7. Yin S., Van Meir E.G. p53 Pathway Alterations in Brain Tumors. In: Van Meir E.G. (ed). *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches*. New York: Humana Press (Springer); 2009. p283-314.
8. Bredel M, Scholtens DM, Yadav AK, Alvarez AA, Renfrow JJ, et al. NFKBIA Deletion in Glioblastomas. *The New England Journal of Medicine* 2011; 364(7) 627-637.
9. TCGA. Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways. *Nature* 2008; 455(7216) 1061-1068.
10. Zhu Y, Parada LF. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(8) 616-626.
11. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN Mutations: the PI3K Pathway as an Integrator of Multiple Inputs During Tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(3) 184-192.

12. Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF, Lai A, Dong J, et al. Gene Expression Analysis of Glioblastomas Identifies the Major Molecular Basis for the Prognostic Benefit of Younger Age. *BMC Medical Genomics* 2008; 1 52 doi:10.1186/1755-8794-1-52.
13. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360(8) 765-773.
14. Snuderl M, Eichler AF, Ligon KL, Vu QU, Silver M, Betensky RA, Ligon AH, Wen PY, Louis DN, Iafrate AJ. Polysomy for chromosomes 1 and 19 predicts earlier recurrence in anaplastic oligodendrogliomas with concurrent 1p/19q loss. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6430.
15. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Reni M, Franceschi E, Bonaldi L, Bertorelle R, Gardiman M, Ghimenton C, Iuzzolino P, Pession A, Blatt V, Ermani M, GICNO . Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4746.
16. Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, Kim JC, Louis DN, Nutt CL, Mutant IDH1-specific immunohistochemistry distinguishes diffuse astrocytoma from astrocytosis. *Acta Neuropathol.* 2010;119(4):509.
17. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, et al. Gene Expression Profiling Reveals Molecularly and Clinically Distinct Subtypes of Glioblastoma Multiforme. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 2005; 102(16) 5814-5819.
18. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100 (1) 57-70.
19. Holland EC. Gliomagenesis: Genetic Alterations and Mouse Models. *Nature Reviews Genetics* 2001; 2(2) 120-129.
20. Stokoe D., Furnari F.B. The PTEN/PI3 Kinase Pathway in Human Glioma. In: Van Meir, E.G. (ed). *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches*. New York: Humana Press (Springer); 2009. p315-357.
21. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, et al. Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1alpha. *Science* 2009; 324(5924) 261-265.
22. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, et al. Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462(7274) 739-744.
23. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 2008; 321(5897) 1807-1812.
24. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de TN, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
25. Demuth T, Berens ME. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 2004; 70(2) 217-228.
26. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-Cadherin Cell-Cell Adhesion Complex and Lung Cancer Invasion, Metastasis, and Prognosis. *Lung Cancer* 2002; 36 107-119.
27. Dermietzel R, Spray DC. Gap Junctions in the Brain: Where, What Type, How Many and Why? *Trends in Neurosciences* 1993; 16(5) 186-192
28. Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Reduced Expression of Connexin-43 and Functional Gap Junction Coupling in Human Gliomas. *Glia* 2001; 33(2) 107-117.
29. Gunia S, Hussein S, Radu DL, Putz KM, Breyer R, et al. CD44s-Targeted Treatment With Monoclonal Antibody Blocks Intracerebral Invasion and Growth of 9L Gliosarcoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 1999; 17(3) 221-230.
30. Okamoto I, Kawano Y, Matsumoto M, Suga M, Kaibuchi K, et al. Regulated CD44 Cleavage Under the Control of Protein Kinase C, Calcium Influx, and the Rho Family of Small G Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(36) 25525-25534.

31. Leavesley DI, Ferguson GD, Wayner EA, Cheresh Da. Requirement of the Integrin beta 3 Subunit for Carcinoma Cell Spreading or Migration on Vitronectin and Fibrinogen. *The Journal of Cell Biology* 1992; 117(5) 1101-1107.
32. Tabatabai G, Weller M, Nabors B, Picard M, Reardon D, et al. Targeting Integrins in Malignant Glioma. *Targeted Oncology* 2010; 5(3) 175-181.
33. Delamarre E, Taboubi T, Mathieu S, Berenguer C, Rigot V, et al. Expression of Integrin $\alpha\beta 1$ Enhances Tumorigenesis in Glioma Cells. *The American Journal of Pathology* 2009; 175(2) 844-855.
34. Idbaih A, Ducray F, Sierra del Rio M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Therapeutic Application of Noncytotoxic Molecular Targeted Therapy in Gliomas: Growth Factor Receptors and Angiogenesis Inhibitors. *Oncologist* 2008; 13(9) 978-992.
35. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, van Meir EG. Microregional Extracellular Matrix Heterogeneity in Brain Modulates Glioma Cell Invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36(6) 1046-1069.
36. Wild-Bode C, Weller M, Wick W. Molecular Determinants of Glioma Cell Migration and Invasion. *Journal of Neurosurgery* 2001; 94(6) 978-984.
37. Egeblad M, Werb Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(3) 161-174.
38. Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17 463-516.
39. Bissell MJ, Radisky D. Putting Tumours in Context. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1(1) 46-54.
40. Page-McCaw AJ, Ewald Z. Werb. Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8(3) 221-233.
41. Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, et al. The Contribution of Protease-Activated Receptor 1 to Neuronal Damage Caused by Transient Focal Cerebral Ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 2003; 100(22) 13019-13024.
42. Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, et al. Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness: A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-type Plasminogen Activator-plasmin Cascade. *Journal of Neuroscience* 2003; 23(10) 4034-4043.
43. Zhang X, Bu XY, Zhen HN, Fei Z, Zhang JN, Fu LA. Expression and Localisation of Urokinase-type Plasminogen Activator Gene in Gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience* 2000; 7(2) 116-119.
44. Flannery T, Gibson D, Mirakhur M, McQuaid S, Greenan C, et al. The Clinical Significance of Cathepsin S Expression in Human Astrocytomas. *American Journal of Pathology* 2003; 163(1) 175-182.
45. Levicar N, Strojnik T, Kos J, Dewey RA, Pilkington GJ, Lah TT. Lysosomal Enzymes, Cathepsins in Brain Tumour Invasion. *Journal of Neurooncology* 2002; 58(1) 21-32.
46. Mikkelsen T, Yan PS, Ho KL, Sameni M, Sloane BF, Rosenblum ML. Immunolocalization of Cathepsin B in Human Glioma: Implications for Tumor Invasion and Angiogenesis. *Journal of Neurosurgery* 1995; 83(2) 285-290.
47. Chintala SK, Sawaya R, Gokaslan ZL, Fuller G, Rao JS. Immunohistochemical Localization of Extracellular Matrix Proteins in Human Glioma, both in Vivo and in Vitro. *Cancer Letters* 1996; 101(1) 107-114.
48. Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P. Interstitial Guidance of Cancer Invasion. *Journal of Pathology* 2012; 226(2) 185-199.
49. Nicholson C, Sykova E. Extracellular Space Structure Revealed by Diffusive Analysis. *Trends in Neurosciences* 1998; 21(5) 207-215.

50. Bourdon MA, Ruoslahti E. Tenascin Mediates Cell Attachment through an RGD-Dependent Receptor. *The Journal of Cell Biology* 1989; 108(3) 1149-1155.
51. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins, a Growing Family of Extracellular Matrix Protein. *Experientia* 1995; 51(9-10) 853-862.
52. Germanò A, Caffo M, Caruso G, La Rosa G, Galatioto S, Tomasello F. A Preliminary Study of Angiogenesis in Paediatric Glioblastoma Multiforme and its Correlation with Survival. *Childs Nervous System* 2001; 17(10) 577-583.
53. Jallo GI, Friedlander DR, Kelly PJ, Wisoff JH, Grumet M, Zagzag D. Tenascin-C Expression in the Cyst Wall and Fluid of Human Brain Tumours Correlates with Angiogenesis. *Neurosurgery* 1997; 41(5) 1052-1059.
54. Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, Dosik J, Cangiarella J, et al. Tenascin Expression in Astrocytomas Correlates with Angiogenesis. *Cancer Research* 1995; 55(4) 907-914.
55. Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge Tysnes B, Edvardsen K, et al. Stimulation of Extracellular Matrix Components in the Normal Brain by Invading Glioma Cells. *International Journal of Cancer* 1998; 75(6) 864-872.
56. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loefflers LB, Sorensen AG, et al. Angiogenesis in Brain Tumours. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8(8) 610-622.
57. Barresi V, Cerasoli S, Vitarelli E, Tuccari G. Density of Microvessels Positive for CD105 (Endoglin) is Related to Prognosis in Meningiomas. *Acta Neuropathologica* 2007; 114(2) 147-156.
58. Seon BK, Haba A, Matsuno F, Takahashi N, Tsujie M, et al. Endoglin-Targeted Cancer Therapy. *Current Drug Delivery* 2011; 8(1) 135-143.
59. Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, et al. Vascular Apoptosis and Involution in Gliomas Precede Neovascularization: a Novel Concept for Glioma Growth and Angiogenesis. *Laboratory Investigation* 2000; 80(6) 837-849.
60. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander LR, et al. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284(5422) 1994-1998.
61. Zadeh G, Qian B, Okhowat A, Sabha N, Kontos CD, Guha A. Targeting the Tie2/Tek Receptor in Astrocytomas. *The American Journal of Pathology* 2004; 164(2) 467-476.
62. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin Fibrillogenesis, a Cell-Mediated Matrix Assembly Process. *Matrix Biology* 2005; 24(6) 389-399.
63. Ljubimova JY, Fujita M, Khazenzon NM, Ljubimova AV, Black KL. Changes in Laminin Isoforms Associated with Brain Tumor Invasion and Angiogenesis. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11 81-88.
64. Lakka SS, Gondi CS, Rao JS. Proteases and Glioma Angiogenesis. *Brain Pathology* 2005; 15(4) 327-341.
65. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a Therapeutic Target. *Nature* 2005; 438(7070) 967-974.
66. Semenza GL. Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(10) 721-732.
67. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation* 2008; 15(4) 621-627.
68. Kamiyama H, Takano S, Tsuboi K, Matsumura A. Anti-Angiogenic Effects of SN38 (Active Metabolite of Irinotecan): Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1 α)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression of Glioma and Growth of Endothelial Cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2005; 131(4) 205-213.
69. Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF, Lai A, Dong J, et al. Gene Expression Analysis of Glioblastomas Identifies the Major Molecular Basis for the Prognostic Benefit of Younger Age. *BMC Medical Genomics* 2008; 1:52.

70. Ito TK, Ishii G, Chiba H, Ochiai A. The VEGF Angiogenic Switch of Fibroblasts is Regulated by MMP-7 from Cancer Cells. *Oncogene* 2007; 26(51) 7194-7203.
71. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4) 581-611.
72. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, et al. VEGF Regulates Haematopoietic Stem Cell Survival by an Internal Autocrine Loop Mechanism. *Nature* 2002; 417(6892) 954-958.
73. Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, et al. Expression of the Ets-1 Transcription Factor in Human Astrocytomas is Associated with Fms-like Tyrosine Kinase-1 (Flt-1)/Vascular Endothelial growth Factor Receptor-1 Synthesis and Neoangiogenesis. *Cancer Research* 1999; 59(21) 5608-5614.
74. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular Endothelial Growth Factor Induces VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Endothelial Cells. *Journal of Cell Science* 1998; 111(Pt 13) 1853-1865.
75. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al. VEGF Guides Angiogenic Sprouting Utilizing Endothelial Tip Cell Filopodia. *The Journal of Cell Biology* 2003; 161(6) 1163-1177.
76. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Lanquino LR, Fujio Y, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulated Actin Reorganization and Migration of Endothelial Cells is Regulated via the Serine/Threonine Kinase Akt. *Circulation Research* 2000; 86(8) 892-896.
77. Jain RK. Molecular Regulation of Vessel Maturation. *Nature Medicine* 2003; 9(6) 685-693.
78. Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergun S, Stavrou D, et al. Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and Basic Fibroblast Growth Factor in Human Gliomas and their Relation to Angiogenesis. *International Journal of Cancer* 1999; 84(1) 10-18.
79. Sun J, Wang DA, Jain RK, Carie A, Paquette S, et al. Inhibiting Angiogenesis and Tumorigenesis by a Synthetic Molecule that Blocks Binding of both VEGF and PDGF to their Receptors. *Oncogene* 2005; 24(29) 4701-4709.
80. Caruso G, Caffo M, Raudino G, Alafaci C, Salpietro FM, Tomasello F. Antisense Oligonucleotides and Extracellular Matrix Proteins: Innovative Therapeutic Targets in the Treatment of High Grade Gliomas. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2010; 5(1) 53-69.
81. Saunders WB, Bohnsack BL, Faske SB, Anthis NJ, Bayless KJ, et al. Coregulation of Vascular Tube Stabilization by Endothelial Cell TIMP-2 and Pericyte TIMP-3. *The Journal of Cell Biology* 2006; 175(1) 179-191.
82. Platten M, Wick W, Weller M. Malignant Glioma Biology: Role for TGF-Beta in Growth, Motility, Angiogenesis, and Immune Escape. *Microscopy Research Technique* 2001; 52(4) 401-410.
83. Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW. Microglia in Brain Tumors. *Glia* 2002; 40(2) 252-259.
84. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia Function in Brain Tumors. *Journal of Neuroscience Research* 2005; 81(3) 447-455.
85. Badie B, Schartner JM. Flow Cytometric Characterization of Tumor-Associated Macrophages in Experimental Gliomas. *Neurosurgery* 2000; 46(4) 957-962.
86. Okada M, Saio M, Kito Y, Ohe N, Yano H, et al. Tumor-Associated Macrophage/ Microglia Infiltration in Human Gliomas is Correlated with MCP-3, but not MCP-1. *International Journal of Oncology* 2009; 34(6) 1621-1627.
87. Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of Cell Migration and Cytokine Production by HGF-like Protein (HLP)/Macrophage Stimulating Protein (MSP) in Primary Microglia. *Biomedical Research* 2008; 29(2) 77-84.

88. Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Suzuki M, Terao T. Thymidine Phosphorylase Expression in Tumor-Infiltrating Macrophages may be Correlated with Poor Prognosis in Uterine Endometrial Cancer. *Human Pathology* 2002; 33(11) 1105-1113.
89. Hu DE, Hory Y, Fan TP. Interleukin-8 Stimulates Angiogenesis in Rats. *Inflammation* 1993;17:135-43.
90. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour Hypoxia, Chemotherapeutic Resistance and Hypoxia-Related Therapies. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29(4) 297-307.
91. Sweet MJ, Hume DA. CSF-1 as a Regulator of Macrophage Activation and Immune Responses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2003; 51(3) 169-177.
92. Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, Graffy C, Garlachs CD, et al. The Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor 1alpha (MIF 1alpha) in Human Atherosclerotic plaques is Induced by Different Proatherogenic Stimuli and Associated with Plaque Instability. *Atherosclerosis* 2005; 178(1) 83-94.
93. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Tumor Invasion and Metastasis via the Rho-Dependent Pathway. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(3) 1050-1058.
94. Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H. Microglia Stimulate the Invasiveness of Glioma Cells by Increasing the Activity of Metalloprotease-2. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2005; 64(9) 754-762.
95. Caffo M, Caruso G, Barresi V, Pino MA, Venza M, et al. Immunohistochemical Study of CD68 and CR3/43 in Astrocytic Gliomas. *Journal of Analytical Oncology* 2012; 1(1) 42-49.
96. Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS, Wedderkopp H, Knerlich-Lukoschus F, et al. CX3CR1 Promotes Recruitment of Human Glioma-Infiltrating Microglia/Macrophages (GIMs). *Experimental Cell Research* 2010; 316(9) 1553-1566.