

ANGIOGÉNESIS EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Déborah Martínez Baños¹ y Álvaro Aguayo¹

¹Departamento de Hematología y Oncología Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

RESUMEN •

LA ANGIOGÉNESIS, fenómeno que consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de una red de vasos sanguíneos preexistente, es un proceso fisiológico que ocurre durante la reproducción, el desarrollo y la cicatrización de tejidos. Fuera de estas circunstancias, la angiogénesis juega un papel fundamental en la proliferación, diseminación y metástasis de la mayoría de las neoplasias malignas. Este hecho se demostró inicialmente en tumores sólidos, y posteriormente en neoplasias hematológicas malignas. Se han dirigido múltiples estudios encausados a la búsqueda de correlaciones entre los niveles de factores angiogénicos, el número de vasos sanguíneos (microvasculatura vascular), los factores pronósticos, la respuesta al tratamiento y la supervivencia. El conocimiento de la participación de este fenómeno en el desarrollo de neoplasias ha derivado en la exploración de sustancias moduladoras de factores angiogénicos como objetivo del tratamiento en diferentes entidades incluyendo neoplasias hematológicas malignas. En el caso de mieloma múltiple, los resultados han sido muy favorables. En otros casos, los bajos índices de respuestas con algunos de estos agentes sugieren la participación de otras alteraciones moleculares asociadas.

El conocimiento de las interacciones de estos mecanismos moleculares con el proceso angiogénico probablemente guíen hacia la selección de combinaciones de agentes dirigidos a blancos específicos para bloquear el proceso oncogénico en las neoplasias malignas del ser humano.

Palabras Clave: *angiogénesis, leucemia, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neoplasias hematológicas.*

Correspondencia a:

Álvaro Aguayo

Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14000, México, D.F. Tel. 54870900 ext. 2719. Fax: 56556062.
e-Mail: aguayog@quetzal.innsz.mx

ABSTRACT •

Angiogenesis, or the formation of new blood vessels arising from a pre-existing vasculature, is essential for physiologic reproduction, development, and tissue repair. Pathologically, it is fundamental for tumor growth, invasion and metastases. The fact that tumor growth depends on angiogenesis was first demonstrated in solid tumors and afterwards in hematological malignancies. Different studies have been conducted in order to establish correlations between levels of angiogenic factors, number of blood vessels (microvascular density), and individual biological features such as clinical stage, known prognostic factors, treatment response, and survival. Recognition of the angiogenic process has led to the search of modula-

tor drugs in an attempt to modify it and impact on the outcome of solid tumors and hematological malignancies. The case of multiple myeloma is illustrative given the favorable results with the use of anti-angiogenic agents. In other instances, the poor results suggest that additional molecular abnormalities play a main role in the carcinogenic process. Knowledge of the interaction of these molecular mechanisms, including angiogenesis, will lead to selection of more rational therapeutic strategies directed to targeted therapy in human cancer.

Key words: *angiogenesis, leukemia, multiple myeloma, myelodysplastic syndrome, hematological neoplasia.*

INTRODUCCIÓN •

La angiogénesis se define como la formación de una red de vasos sanguíneos nuevos a partir de una red de vasos sanguíneos preexistentes. En 1971, Folkman propuso que el crecimiento tumoral puede derivar de la angiogénesis y que los tumores podrían activar células endoteliales en reposo para proliferar a través de la secreción de señales químicas (1). El proceso de angiogénesis involucra la degradación de proteínas de matriz extracelular y la activación, proliferación y migración de células endoteliales y pericitos (2,3). Este fenómeno ocurre de forma fisiológica durante el crecimiento embrionario, el proceso de cicatrización, y en el aparato genital femenino durante el ciclo menstrual. Fuera de estos contextos, la angiogénesis representa un fenómeno ineludible en la proliferación, diseminación y metástasis de la mayoría de las neoplasias malignas (4). En ausencia de angiogénesis, los tumores no pueden crecer más allá de 1-2 mm³.

La progresión de los tumores sólidos se fundamenta en dos fases: la prevascular y la vascular. La fase prevascular se caracteriza por el crecimiento tumoral lento y es de larga duración; por el contrario, en la fase vascular, el crecimiento

tumoral es rápido, se acelera la invasión y se aumenta la probabilidad de desarrollar metástasis (5). Los estudios iniciales en neoplasias sólidas demostraron un incremento en angiogénesis, secreción incrementada de citocinas proangiogénicas y su relación con un pronóstico desfavorable (6-9). Estos hallazgos se confirmaron, también, en neoplasias hematológicas (10-13). El proceso angiogénico en la médula ósea se puede medir mediante una tinción de inmunohistoquímica para el antígeno relacionado al factor de von Willebrand (FvW) (14), o realizar la determinación de la densidad microvascular (DMV) o el porcentaje del área vascular ocupado en el campo de 100x en las biopsias de hueso (15). Algunos autores han utilizado un análisis computarizado de imagen con el fin de aumentar la objetividad de sus mediciones (14).

La inhibición de la angiogénesis como un blanco terapéutico en neoplasias hematológicas ha sido motivo de múltiples estudios, algunos de ellos serán mencionados posteriormente. El tratamiento dirigido contra angiogénesis representa una opción prometedora y probablemente menos tóxica para tratar enfermedades malignas.

MIELOMA MÚLTIPLE •

Tanto en el mieloma múltiple (MM) como en la gammopatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), los procesos de angiogénesis y crecimiento tumoral (medidos por DMV e índice de marcaje de células en fase S respectivamente) suceden paralelamente. La DMV se encuentra particularmente incrementada en pacientes con mieloma múltiple (MM) activo y, sobretodo, en enfermedad progresiva al compararla con enfermos con MM no activo ($p < 0.001$) o controles sanos. Este parámetro se correlaciona con el índice de marcaje de células en fase S, pero no con el porcentaje de células plasmáticas (15). El grado de angiogénesis es un predictor de supervivencia global en pacientes con MM. En una cohorte de 74 pacientes con MM de reciente diagnóstico, la mediana de supervivencia de acuerdo con el grado bajo, intermedio o alto de angiogénesis valorada por apreciación fue 2, 4 y 4.4 años, respectivamente ($p = 0.02$), observación que se confirmó al realizar un análisis por un método cuantitativo, en donde la mediana de supervivencia del grupo con DMV alta (> 50 /campo 400x) y la del grupo con DMV baja (≤ 50 /campo 400x) fue 2.6 y 5.1 años, respectivamente ($p = 0.004$) (16). El primer estudio que demostró eficacia de tratamiento con talidomida en pacientes con MM en recaída, fue el grupo de Singhal. La mayoría de los pacientes habían cursado con rechazo al trasplante de células progenitoras. Las respuestas (definidas como reducción de proteína M $> 50\%$) se documentaron en 32% de los pacientes. La dosis de talidomida varió entre 200-800 mg/d (17). Otros estudios con talidomida como monodroga en MM refractario han reportado tasas de respuesta entre 24 y 65% (18-23). La combinación de talidomida con dexametasona tiene tasas de respuesta entre 41 y 55% en el contexto de mieloma refractario (24,25).

Actualmente se están llevando a cabo dos estudios fase II con lenalidomida en combinación con dexametasona, y lenalidomida, dexametasona y claritromicina en pacientes con MM de reciente

diagnóstico; ambos han reportado sus resultados preliminares. Uno de ellos combina lenalidomida 25 mg vía oral (VO)/día por 21 días en ciclos de 28 días, dexametasona 40 mg VO 1 vez por semana y claritromicina 500 mg VO 2 veces al día. Con este esquema, las respuestas objetivas son del orden del 95% en los pacientes, con RC en 6/22 y RP 15/22. La principal toxicidad fue trombosis venosa profunda en 13.6% de los casos (26). El otro grupo utilizó lenalidomida 25 mg/día días 1-21 en ciclos de 28 días, dexametasona 40 mg VO/día, días 1-4, 9-12 y 17-20. Las respuestas objetivas se reportaron en 31 pacientes (91%), de las cuales 2/34 correspondieron a RC y 11/34 RP. La principal toxicidad fue fatiga (27). Estos resultados han hecho que se haya aprobado, recientemente, el uso de la combinación de lenalidomida con dexametasona para el tratamiento de segunda línea en pacientes con MM por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA por sus siglas en inglés). Otro agente de investigación en MM es el uso de anticuerpo monoclonal anti FCEV (Bevacizumab).

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA •

Diferentes estudios han evaluado la neovascularización en la médula ósea y el ganglio linfático de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC). La mayoría reportó un incremento en la vascularidad de la médula ósea al compararlo con controles (28-30). Otros grupos no han encontrado diferencias significativas en la microvasculatura de la médula ósea MO en pacientes con LLC. Posteriormente se demostró el incremento en factores angiogénicos en plasma, específicamente FCEV y factor básico de crecimiento de fibroblastos (FbCF) en pacientes con LLC al compararlos con controles (31) y niveles elevados de FbCF en orina (28), y FbCF (32) y FCEV intracelular (33). Finalmente se concluyó que la fuente de estos factores es la célula leucémica, al probar que los linfocitos B de la LLC secretan FCEV (34). Los linfocitos B de la LLC también producen trombospondina (TSP), una molécula anti-angiogénica.

Se ha postulado que el proceso que regula el fenómeno de angiogénesis se rige por condiciones que favorecen la producción de factores angiogénicos (35) (la hipoxia incrementa secreción de FCEV por linfocitos B en LLC) o anti-angiogénicos. El FbCF es capaz de interferir con mecanismos intracelulares involucrados en apoptosis: en líneas celulares similares a LLC cultivadas con FbCF exógeno, la apoptosis inducida por fludarabina disminuyó como consecuencia de un incremento en la producción de Bcl-2 (36). Se han reportado implicaciones pronósticas opuestas en cuanto al nivel de angiogénesis en LLC. Un estudio encontró mayor vascularización en enfermos en estadios más avanzados (28). Otro grupo buscó correlación con los parámetros de la enfermedad reconocidos como predictores de mal pronóstico como cuenta linfocitaria absoluta (CLA), deshidrogenasa láctica en suero (DHL), β 2-microglobulina sérica, niveles de FCEV en suero, alteraciones citogenéticas y tiempo de duplicación linfocitaria (TDL) sin éxito (29). En cuanto a los niveles de factores angiogénicos, los niveles altos de FCEV se correlacionaron con enfermedad en estadio avanzado; sin embargo, no se encontró relación con CLA, niveles de β 2-microglobulina, DHL ni TDL. Los pacientes con estadio clínico Binet A, pero con niveles altos de FCEV sérico tuvieron una supervivencia libre de progresión significativamente menor que los que contaban con niveles bajos (37). Es controversial si existe una correlación entre la concentración de FbCF sérico o en plasma y el desenlace clínico (38,39) así como entre los niveles de este factor angiogénico y el estadio clínico (40,42). En un estudio realizado en 225 pacientes, se midió FCEV intracelular. Al realizar el análisis de supervivencia se encontró una tendencia hacia menor supervivencia en el grupo con niveles de FCEV bajos ($p=0.07$); sin embargo, en el subgrupo de pacientes con buen pronóstico o enfermedad en estadios tempranos (β 2-microglobulina ≤ 2.8 mg/dl, Rai 0-2, Binet A y B) los niveles bajos de FCEV se asociaron con pobre supervivencia (33).

El uso de talidomida se ha explorado como tratamiento de LLC como monodroga y en combinación con fludarabina. El primer grupo que reportó re-

sultados trató a 28 pacientes con LLC en recaída o refractaria con talidomida como monodroga, de este estudio se obtuvo una respuesta parcial y 20 pacientes con enfermedad estable (42). Furman y cols trataron pacientes que habían recibido tratamiento previo con talidomida o talidomida/fludarabina. En el grupo que se trató con talidomida únicamente 1/8 pacientes tuvo respuesta, y en el grupo tratado con la combinación, 4/8 pacientes respondieron, incluyendo una respuesta completa (43). Un estudio fase I exploró la combinación de talidomida/fludarabina en pacientes con LLC sin tratamiento previo. Las respuestas objetivas fueron 9/9 en los pacientes tratados, con respuestas completas de 55% (44). Un estudio fase II de lenalidomide en pacientes con LLC en recaída o refractaria, reportó resultados preliminares. En 6/7 enfermos se obtuvo respuesta objetiva, incluyendo una respuesta completa (45).

Actualmente se están conduciendo otros estudios en LLC que tienen como blanco terapéutico inhibir la angiogénesis, entre ellos el anticuerpo monoclonal anti-FCEV (bevacizumab), e inhibidores de tirosina cinasas que reducen la fosforilación de receptores de FCEV (AZD2171, y algunos componentes del té verde) (46).

LEUCEMIA Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS •

En biopsias de hueso de 36 pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica (LAL) se midió la DMV y se realizó tinción de inmunohistoquímica para el antígeno relacionado al FvW y se realizó un análisis mediante un programa computarizado. La DMV se encontró significativamente incrementada en estos pacientes al compararla con controles ($p<0.0001$). Paralelamente, no hubo diferencia en la mediana de DMV en pacientes en recaída comparados con los que no se encontraban en recaída. También se midieron niveles urinarios de FbCF, que se encontraron incrementados con respecto a los controles (11). En adultos con LAL, también se ha reportado una DMV mayor al compararla con controles ($p<0.0001$), y una correlación entre el

número de vasos/mm³ y el porcentaje de blastos en médula ósea (47). Otro estudio en adultos reportó mayor DMV en pacientes con blastos residuales $\geq 5\%$ al día 16 de inducción al compararla con los pacientes en quienes no se encontró una médula infiltrada (48). Pruneri y cols. realizaron tinción de inmunohistoquímica con anti-CD31 y anti-CD34 para valorar DMV en 133 biopsias de médula ósea: 14 controles, 15 pacientes con procesos infecciosos, 85 síndromes mielodisplásicos (SMD), 15 leucemias agudas mieloblásticas (LAM) y 14 enfermedades mieloproliferativas (EMP). Al comparar controles y biopsias de pacientes con infección, la DMV fue similar. Esta fue mayor en pacientes con SMD al compararla con controles y pacientes con enfermedades infecciosas y, significativamente menor, al compararla con pacientes con LAM y EMP. El análisis individual por entidades reveló que la DMV fue significativamente menor en pacientes con anemia refractaria (AR), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA) y anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) al compararla con pacientes con anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y fibrosis. Al comparar la DMV de este último grupo con la de pacientes con LAM no hubo diferencia. En otro estudio se analizaron 129 biopsias de hueso de pacientes con leucemias agudas y crónicas y SMD, se realizó tinción de inmunohistoquímica para el antígeno relacionado al FvW. La vascularidad en pacientes con LMMC fue significativamente mayor a la del grupo control, pero igual que la de pacientes con SMD (10). La expresión de FCEV fue discretamente mayor en pacientes con LAM (82%) al compararla con pacientes con SMD (76%) en un estudio realizado en biopsias de hueso de 46 enfermos. La expresión de esta proteína fue poco frecuente en biopsias de hueso de controles (50). En pacientes con leucemia y síndrome mielodisplásico de reciente diagnóstico se tomaron niveles plasmáticos de FCEV, FbCF, factor de crecimiento de hepatocitos (FCH), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) y factor transformante de crecimiento alfa (FTC- α). Excepto por este último, todos resultaron significativamente más altos al compararlos con controles. Se encontró

correlación entre niveles altos de FCEV y FbCF con un pobre desenlace en LAM, misma que se descartó en SMD(10). Estudios iniciales en tumores sólidos sugirieron que la angiogenina participaba en el proceso de angiogénesis en neoplasias sólidas, al encontrarse niveles elevados de transcritos de esta proteína en el tumor y células de líneas tumorales (51,52). Estos estudios condujeron a la medición de esta proteína en neoplasias hematológicas. Las concentraciones de angiogenina se encontraron significativamente elevadas en pacientes con LAM y SMD avanzados al compararlos con controles y, al comparar ambos grupos, éstas fueron significativamente más altas en el segundo. A diferencia de los hallazgos en neoplasias sólidas, los niveles de angiogenina elevados (>600 ng/mL) se correlacionaron con mayor supervivencia, pero no se encontró correlación entre estos niveles y la tasa, ni la duración de la remisión (53).

Se han dirigido diferentes estudios de talidomida en SMD. En ellos se logró mejoría hematológica en 16/18, 10/30, 19/34 y 7/73 pacientes; en las tres primeras series se mantuvo libre de transfusión a 10, 6 y 9 enfermos respectivamente. Las dosis de talidomida variaron entre 100 a 1000 mg al día (54,55).

En un estudio dirigido en pacientes dependientes de transfusión o con anemia sintomática, 43 pacientes recibieron lenalidomide a diferentes dosis (25 mg/día, 10 mg/día y 10 mg/día por 21 días). La población se caracterizó por haber sido refractaria a tratamiento con eritropoyetina (EPO) o por contar con niveles altos de la misma, lo que hacía poco probable que respondieran a su administración. Se observó mejoría en hemoglobina en 24 pacientes (56%), 20 de ellos lograron mantenerse libres de transfusiones. El análisis por subgrupos señaló que las mejores respuestas se obtuvieron en pacientes con delección de 5q31.1 (83%), comparado con 57% en el grupo con cariotipo normal y 12% en el grupo con otras alteraciones en el cariotipo ($p=0.007$) (56). La FDA ha aprobado ya el uso de lenalidomida en pacientes con SMD asociados a delecciones del brazo largo del cromosoma 5.

Un grupo de pacientes con LAM refractaria y SMD fue tratado con SU5416, un inhibidor de receptores de FCEV 1 y 2. Se logró respuesta parcial en 3 enfermos (5%) y mejoría hematológica en 1 paciente (2%) (57). El mismo autor reportó resultados de un estudio fase II con otro agente anti-angiogénico, AG-013736, con actividad en contra de diferentes receptores de tirosín cinasas, entre ellos receptores de FCEV-1, FCEV-2, FCEV-3, c-kit y del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas. AG-013736 se administró a 12 pacientes con LAM o SMD de pobre pronóstico a una dosis de 10 mg VO al día. No se obtuvo ninguna respuesta objetiva, dos pacientes con SMD lograron enfermedad estable a 8.3 y 6.2 meses. La principal toxicidad grado 3 o 4 fue hipertensión (42%) (58).

Los resultados preliminares del uso de anticuerpo monoclonal anti-FCEV a dosis de 10 mg/kg IV cada 2 semanas por 4 meses en 7 pacientes con SMD reportaron respuesta eritroide mayor en 2 enfermos e independencia de transfusión en 1 (59).

Un estudio multicéntrico fase III, se realizó en 191 pacientes con SMD. Se comparó azacitidina 75 mg/m² al día subcutáneo durante 7 días cada 28 días con tratamiento de soporte. El grupo de azacitidina obtuvo respuestas objetivas en un 23% y mejoría hematológica en 37%, comparado con mejoría hematológica en 5% en el grupo de tratamiento de soporte ($p < 0.001$). La mediana de transformación a leucemia aguda o muerte fue 21 meses para el grupo de azacitidina y 13 meses para el grupo de tratamiento de soporte ($p = 0.007$) (60). Otro estudio multicéntrico, fase III, se realizó en 170 pacientes con SMD, los cuales fueron aleatorizados para recibir decitabina 15 mg/m² IV en 3 horas cada 8 horas durante 3 días, cada 6 semanas contra tratamiento de soporte. El grupo tratado con decitabina logró respuestas objetivas en 17% de los casos, en comparación con el grupo de tratamiento de soporte que no logró ninguna respuesta objetiva ($p < 0.001$), y en 13% hubo mejoría hematológica (61). Dados estos buenos resultados, la 5 azacitidina y decitabina han sido recientemente por la FDA para su uso en SMD dependientes de transfusiones.

El trióxido de arsénico (TOA), otro agente antiangiogénico que induce apoptosis y diferenciación en células malignas de diferentes enfermedades hematológicas (62,63) actúa por medio de la despolarización de la membrana mitocondrial y activación de las vías apoptóticas al generar moléculas que reaccionan con oxígeno, y por la activación específica de vías pro apoptóticas (64,65). Se han reportado dos estudios fase II de TOA en SMD. En uno de ellos se incluyó a 76 pacientes, de ellos sólo 70 recibieron el fármaco y 19 lo suspendieron antes de completar dos ciclos de tratamiento. En pacientes que completaron 2 ó más ciclos (51%) se obtuvo mejoría hematológica en el 39% del grupo de bajo riesgo, 9% en el grupo de alto riesgo, y respuestas hematológicas mayores en 22% de los casos. La respuesta principal se obtuvo en línea eritroide (66). El segundo estudio incluyó 115 pacientes. La tasa de mejoría hematológica en general en base a intención de tratar fue 19%. Al realizar el análisis por grupos de riesgo, las respuestas hematológicas se reportaron en 13 pacientes (26%), 12 de estos pacientes lograron respuestas mayores en el grupo de bajo riesgo. En el grupo de alto riesgo las respuestas hematológicas se presentaron en 11 pacientes (17%), 10 con respuestas mayores. En las tres líneas se observaron respuestas hematológicas mayores (67).

Otros agentes antiangiogénicos como el inhibidor de metaloproteasa AG3340 e inhibidores de farnesil transferasa (tipifarnib) se encuentran bajo investigación en LAM y SMD, pero hasta el momento han dado respuestas objetivas del orden del 30% en pacientes de mal pronóstico. El reporte de un estudio fase I de BMS-214662, un inhibidor de farnesil transferasa en 30 pacientes con leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos de alto riesgo concluyó que a dosis de 118 mg/m² en infusión de 1 hora IV es bien tolerado (68).

CONCLUSIONES •

La angiogénesis es un fenómeno estrechamente vinculado con el crecimiento tumoral en la mayoría de las neoplasias, incluyendo neoplasias hemató-

gicas malignas. Este conocimiento ha llevado a la exploración de sustancias moduladoras de factores angiogénicos como blanco de tratamiento en diferentes entidades, con resultados muy favorables en algunos casos, como en MM. Los bajos índices de respuestas en neoplasias hematológicas de otro tipo con algunos de éstos agentes sugieren

la participación de otras alteraciones moleculares asociadas. El conocimiento de las interacciones de estos mecanismos moleculares con el proceso angiogénico seguramente resultarán en la selección adecuada de combinaciones de agentes dirigidos a dianas específicas para bloquear el proceso onco-génico en las neoplasias malignas del ser humano.

REFERENCIAS •

1. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186 •
2. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H: Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol* 1994;9(4):807-843 •
3. Folkman J: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333(26):1757-1763 •
4. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31 •
5. Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82(1):4-6 •
6. Bostwick DG, Wheeler TM, Blute M, Barrett DM, MacLennan GT, Sebo TJ, et al: Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. *Urology* 1996;48(1):47-57 •
7. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL: Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994;74(6):762-766 •
8. Fox SB: Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology* 1997;30(3):294-301 •
9. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1875-1887 •
10. Aguayo A, Kantarjian H, Manshoury T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al: Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96(6):2240-2245 •
11. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J: Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997;150(3):815-821 •
12. Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Greipp PR: Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13(3):469-472 •
13. Rajkumar SV, Greipp PR: Angiogenesis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001;113(3):565 •
14. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-2484 •
15. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, et al: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87(3):503-508 •
16. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al: Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3111-3116 •
17. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al: Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341(21):1565-1571 •
18. Weber DM, Gavino M, Delasalle K, et al: Thalidomide alone or with dexamethasone for multiple myeloma. *Blood* 1999;94[Suppl 1]:601a(abst) •
19. Durie BGM, Stepan DE: Efficacy of low dose thalidomide (T) in multiple myeloma. *Blood* 1999;94 [Suppl 1]:316a(abst) •
20. Juliusson G, Celsing F, Turesson I, Lenhoff S, Adriansson M., Malm C: Frequent good partial remissions from thalidomide including best response ever in patients with advanced refractory and relapsed myeloma. *Br J Haematol* 2000;109(1):89-96 •
21. Rajkumar SV, Fonseca R, Dispenzieri A, et al: A phase II trial of thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma (MM) with laboratory correlative studies. *Blood* 2000;96:168a(abst) •
22. Kneller, A., P. Raanani, et al: "Therapy with thalidomide in refractory multiple myeloma patients - the revival of an old drug." *Br J Haema-*

- tol. 2000; 108(2): 391-393 •
23. Tosi P, Ronconi S, et al: "Salvage therapy with thalidomide in multiple myeloma patients relapsing after autologous peripheral blood stem cell transplantation." *Haematologica*. 2001; 86(4): 409-413.
24. Dimopoulos MA, Zervas K, Kouvatsos G, Galani E, Grigoraki V, Kiamouris C, et al: Thalidomide and dexamethasone combination for refractory multiple myeloma. *Ann Oncol* 2001;12(7):991-995 •
25. Palumbo A, Giaccone L, Bertola A, Pugno P, Bringhen S, Rus C, et al: Low-dose thalidomide plus dexamethasone is an effective salvage therapy for advanced myeloma. *Haematologica* 2001;87(4):399-403 •
26. Niesvizky R, Pekle K, Geibshstein U, Zafar F, Ostrow S, Pearse R, et al: BiRD (Biaxin®/Revlimid®/Dexamethasone) Combination Therapy (Rx) Results in High Complete Remissions (CR) and Overall Responses in Myeloma (MM) with Poor Prognostic Features. *Blood* 2005;106:190a(abst) •
27. Rajkumar V, Hayman SR, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al: Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005;106:4050-4053 •
28. Kini AR, Kay NE, Peterson LC: Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1414-1418 •
29. Molica S, Vacca A, Ribatti D: Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:3344-3351 •
30. Wolowiec D, Wozniak Z, Potoczek S, et al: Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26:263-270 •
31. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al: Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-2245 •
32. Menzel T, Rahman Z, Calleja E, et al: Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996;87:1056-1063 •
33. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, et al: Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:768-770 •
34. Chen H, Treweek AT, West DC, et al: In Vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181-3187 •
35. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, et al: B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 2002;16:911-919.
36. Konig A, Menzel T, Lynen S: Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997;11:258-265 •
37. Molica S, Vitelli G, Levato D, et al: Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk or progression in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999;107:605-610 •
38. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T: Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003;12:167-171 •
39. Duensing S, Atzpodien J: Increased intracellular and plasma levels of Basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995;85:1978-1980 •
40. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, et al: Bcl-2 expression correlates positively with serum Basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113:400-406 •
41. Menzel T, Rahman Z, Calleja E, et al: Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996;87:1056-1063 •
42. Kay N, Geyer S, Yagoob I, et al: Thalidomide treatment in B-chronic lymphocytic leukemia (CLL): A North Central Cancer Treatment Group study. *Blood* 2003;102 (abst 5162) •
43. Furman RR, Leonard JP, Allen SL, et al: Thalidomide alone or in combination with fludarabine are effective treatment for patients with fludarabine-relapsed and refractory CLL. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 (abstr 6640) •
44. Chanan-Khan A, Millar KC, Takeshita K, et al: Thalidomide in combination with fludarabine as initial therapy for patients (pts) with treatment requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). Results of a phase I clinical trial. *Blood* 2005;106:3348-3352 •
45. Millar KC, Czuczman MS, Dimiceli L, et al: Anti-leukemic effects of novel immunomodulatory agent lenalidomide with or without rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. Encouraging preliminary results of an ongoing phase II clinical study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 (abstr 6556).
46. Schanafelt TD, Kay NE: The Clinical and Biologic Importance of Neovascularization and Angiogenic

Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Seminars in Oncology* 2006;33:174-185 •

47. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ: Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:309-313 •

48. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, et al: Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:2637-2644 •

49. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, et al: Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 1999;81:1398-1401 •

50. Bellamy WT, Tichter L, Sirjani DI, et al: Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002;97:1427-1434 •

51. Fu X, Roberts WG, Nobile V, et al: mAngiogenin-3, a target gene of oncoprotein E2a-Pbx1, encodes a new angiogenic member of the angiogenin family. *Growth Factors* 1999;27:125-137 •

52. Brunner V, Günsilius E, Schumacher P, et al: Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:119-125 •

53. Verstovsek S, Kantarjian H, Aguayo AI, et al: Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2001;114:290-295 •

54. Raza A, Meyer P, Dutt D, et al: Thalidomide produces transfusion independence in long standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001;98:958-965 •

55. Zorat F, Pozzato G: Thalidomide in myelodysplastic syndromes. *Biomed Pharmacother* 2000;56:20-30 •

56. List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, et al: Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005;352:549-557 •

57. Giles FJ, Cooper MA, Silverman L, et al: Phase II study of SU5416, a small-molecule vascular endothelial growth factor tyrosine-kinase receptor inhibitor, in patients with refractory myeloprolif-

erative diseases. *Cancer* 2003;97:1920-1928 •

58. Giles FJ, Bellamy WT, Estrov Z, et al: The anti-angiogenesis agent, AG-013736, has minimal activity in elderly patients with poor prognosis acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia Research* 2006;30:801-811 •

59. Glotlib J, Catriona H, List A, et al: Phase II study of bevacizumab (anti-VEGF humanized monoclonal antibody) in patients with myelodysplastic syndromes (MDS): preliminary results. *Blood* 2003;102:425 a •

60. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, et al: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002;20:2415-2416 •

61. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al: Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006;106:1650-1652 •

62. Zhang W, Ohnishi K, Shigeno K, et al: The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms. 1998;12:1383-1391 •

63. Rojewski MT, Baldus C, Knauf W, et al: Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: Induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br J Haematol* 2002;116:555-563 •

64. Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK: Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 1998;177:324-333 •

65. Mathas S, Lietz A, Janz M, et al: Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 2002;102:1028-1034 •

66. Schiller GJ, Snack J, Hainsworth JD, et al: Phase II Multicenter Study of Arsenic Trioxide in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 2006;24:2456-2464 •

67. Vey N, Bosly A, et al: Arsenic Trioxide in JCO 2006;24:2465-2471 •

68. Cortes J, Faderl S, Estey E, et al: Phase I Study of BMS-214662, a Farnesyl Transferase Inhibitor in Patients With Acute Leukemias and High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 2005;23:2805-2812 •