

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**  
**Máster en Iniciación a la Investigación en Medicina**



**DIFERENCIAS EN LA ANGIOGÉNESIS DE LOS  
CARCINOMAS CUTÁNEOS DE CÉLULAS BASALES  
Y ESCAMOSAS**

**Autor:** Tamara Gracia Cazaña

**Director:** Mariano Ara Martín  
Facultad de Medicina

Zaragoza 2012



*“ La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”*

**Gregorio Marañón**



## DIRECTOR

**Dr. Mariano Ara Martín**

Profesor Asociado de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología.

Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

Médico Adjunto de Dermatología. Hospital Clínico Universitario “Lozano  
Blesa”. Zaragoza.

# ÍNDICE

---

Introducción.....	4
Revisión bibliográfica.....	22
Justificación.....	42
Hipótesis.....	44
Objetivos.....	46
Material y Métodos.....	48
Resultados.....	60
Discusión.....	69
Conclusiones.....	73
Bibliografía.....	75

# INTRODUCCIÓN

---

## GENERALIDADES

El cáncer de piel es la forma mas frecuente de tumor maligno en la población caucásica. Entre ellos los tipos mas comunes son: el Carcinoma Basocelular, Carcinoma Espinocelular y a distancia en cuanto a su frecuencia el Melanoma, que presentan unas características clínicas e histológicas muy distintas.

Según los estudios estadísticos, la incidencia de estos tres tipos de tumores ha ido en aumento en todo el mundo en los 20 últimos años, sin embargo se ha mantenido estable su tasa de mortalidad.

Este incremento de la incidencia, sobre todo en el caso de los Carcinomas Baso y Espinocelulares, probablemente sea consecuencia de la combinación de varios factores, como aumento de la exposición al sol o a los rayos UVA, mayor participación de la población en actividades que se realizan al aire libre, cambios en el tipo de vestimenta, aumento de la esperanza de vida y otros factores, como pérdida de la capa de ozono y situaciones de inmunodepresión, en algunos casos como consecuencia de la edad y en otros inducida por algunos de los tratamientos modernos.

Los Carcinomas Baso y Espinocelular suponen más de un tercio de todos los cánceres diagnosticados en EEUU, con una incidencia estimada de 600.000 casos por año, de los cuales 500.000 son Epiteliomas Basocelulares y 100.000-150.000 Carcinomas Espinocelulares. La incidencia de estos tipos de tumores es 18-20 veces superior que la del Melanoma.

De todos modos, los datos estadísticos oficiales pueden estar sesgados, ya que los registros tradicionales de cáncer, con frecuencia no incluyen el Epitelioma Basocelular, generalmente debido en la mayoría de los casos a su buen pronóstico.

# CARCINOMA BASOCELULAR

## Definición

El Carcinoma Basocelular (CBC) es un tumor derivado de las células pluripotentes de la capa basal de la epidermis y del epitelio folicular con diferentes formas clínicas e histopatológicas que le confieren un pronóstico variable.

## Epidemiología

Es el tumor maligno mas frecuente del ser humano, representa mas del 75% del total de los tumores malignos de piel y se caracteriza por un crecimiento lento que sin tratamiento, produce invasión local con importante daño funcional o estético. La presencia de metástasis es poco frecuente y oscila entre el 0,0028% y el 0,5% <sup>1</sup>.

Cada año se diagnostican en Estados Unidos 900.000 casos, con tasas de incidencia de 407/100.000 en varones de raza blanca y 212/100.000 en mujeres de raza blanca <sup>2</sup>. Se estima que la tasa de incidencia crece a un ritmo del 3-10% anual en la población de la raza blanca. Esta neoplasia es mas frecuente en varones con un ratio de 2:1 <sup>3,4</sup>.

El CBC tiene un buen pronóstico, sin embargo, debido a su alta incidencia consume muchos recursos.

## Factores de riesgo

- I. Factores ambientales y estilo de vida: radiación ultravioleta, radiación ionizante, arsénicos y otros agentes químicos, tabaquismo.
- II. Factores de riesgo individuales: antecedentes al cáncer cutáneo no melanoma previo, estados de inmunosupresión (trasplantes, sida), nevus sebáceo, dermatofibroma.
- III. Síndromes genéticos: Xeroderma pigmentoso, albinismo, Síndrome del carcinoma basocelular nevoide, Síndrome de Bazex, Síndrome de Rombo.

## Clínica

El aspecto clínico es muy variado. Existen muchas clasificaciones, la mas usada es en función de las formas de comienzo, las formas de estado, formas pigmentadas, formas finales y las formas especiales <sup>5</sup>.

### Formas de comienzo:

-Formas superficiales: se localizan generalmente en el tronco. Son lesiones con escasa sintomatología y crecimiento muy lento. Podemos diferenciar tres subtipos:

- Superficial eritematoso
- Superficial pagetoide
- Superficial esclerodermiforme.

-Formas perladas: son las mas frecuentes y se presentan como una tumoración circunscrita, infiltrada eritematosa o blanco-amarillenta; es la característica perla. Puede aparecer una variante que se denomina perlada ulcerada (figura 1).

-Ulcus rodens: es una forma de comienzo del CBC que está ulcerado desde el principio. Suele comenzar como una úlcera que no responde al tratamiento.



Figura 1. Lesión tumoral eritematosa perlada con telangiectasias centrales.

Formas de estado: CBC perlado quístico, CBC perlado ulcerado, CBC plano cicatricial, CBC ulcero-cicatricial y CBC vegetante.

Formas finales: corresponde a estadíos terminales a los que se llega por la negativa de los pacientes a recibir tratamiento o bien porque el tratamiento recibido ha sido ineficaz. Se denomina CBC terebrante, es de peor pronóstico y se localiza con frecuencia en las suturas embrionarias, por las cuales penetra, infiltrando cartílago y hueso.

Formas pigmentadas: pueden contener melanina, esto no posee transcendencia pronóstica; pero puede plantear confusión con el melanoma.

## Histopatología

Existen unos criterios comunes para el diagnóstico del CBC, los dos mas importantes:

- El tipo de las células que lo constituyen, que son de pequeño tamaño, con núcleos redondeados u oveales, usualmente monomorfos y de escaso citoplasma. Son lo que se demonizan células basalioides.
- El segundo criterio es la disposición de las células en la periferia de los agregados tumorales, que al menos focalmente, son columnares y ordenadas de tal forma que recuerdan a una empalizada (figura 2).

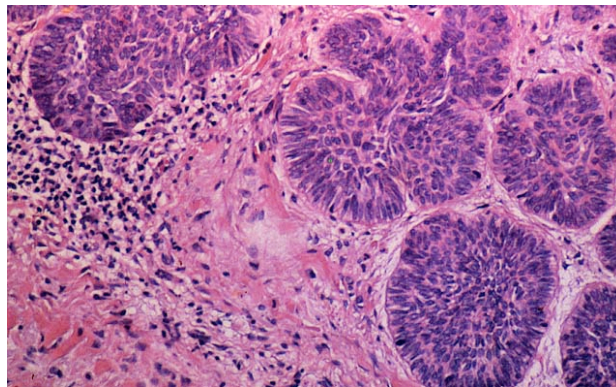


Figura 2. Empalizada en la periferia de los nidos tumorales.

Los patrones básicos son:

1. CBC de patrón expansivo ( tipo nodular).
2. CBC de patrón infiltrativo.
3. CBC superficial.
4. CBC micronodular.

## Tratamiento

### A) NO QUIRÚRGICO

**INMUNOMODULADORES TÓPICOS: IMIQUIMOD (IMQ)**

IMQ es un medicamento comercializado desde 1999 para el tratamiento del CBC su mecanismo de acción es:

- Induce la síntesis y liberación de numerosas citocinas proinflamatorias procedentes de las células de Langerhans, monocitos, macrófagos y células dendríticas (interferón alfa, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina IL 1, 6, 8, 10 Y 12).
- Estimula la citotoxicidad mediada por las células natural killers.<sup>1</sup>
- Activa la citotoxicidad mediada por linfocitos T y activa la función de los linfocitos Th1.
- Induce la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas.

Indicado cuando se trata de CBC superficial extenso, multifocal o de varios tumores en el mismo paciente. Si se encuentra en una localización cosmética comprometida o si refiere historia de cicatrización queloidea, factores de riesgo quirúrgico, condición psicológica del paciente o cuando rehúsa a una intervención quirúrgica.

### **TERAPIA FOTODINÁMICA**

La reacción fotodinámica se produce por la activación de un fotosensibilizante en el tejido diana, siguiendo la absorción de una determinada longitud de onda. En tumores cutáneos se emplea el ácido 5 aminolevulínico (5-ALA), precursor de la protoporfirina IX. Cuando esta se activa mediante la energía lumínica es la responsable del daño selectivo tumoral.

### **CRIOCIRUGÍA**

Se basa en la destrucción tisular conseguida a temperaturas de -50° y -60°. Tiene muchas limitaciones como la profundidad, la cicatrización lenta.

### **RADIOTERAPIA**

Es una terapéutica localizada relativamente incruenta y conservadora, ya que preserva las estructuras anatómicas. actúa por daño directo sobre el ADN celular. Las radiaciones de partículas en dermatología, se suelen restringir a la teleterapia superficial (electrones o fotones) y a la braquiterapia. en tumores muy extensos se puede emplear cobalto 60. Es útil para el tratamiento de



determinados CBC, especialmente de región facial, pero como otras técnicas distintas de la cirugía, presenta la imposibilidad de controlar los márgenes. requiere acudir a un centro especializado diariamente durante algunas semanas y el tratamiento no puede repetirse. Limita la realización posterior de terapéuticas quirúrgicas. en las variedades pigmentadas de CBC, puede quedar una pigmentación residual en la zona y en áreas pilosas dejar.

## **B) QUIRÚRGICO:**

La extirpación completa del tumor es el tratamiento con índices de curación mas elevados. Hay dos tipos de cirugía: la extirpación quirúrgica clásica y la cirugía de Mohs.

### **CIRUGIA CONVENCIONAL**

Realiza la extirpación del tumor y de una porción de piel aparentemente sana peritumoral. El estudio histológico de los márgenes quirúrgicos se puede efectuar en forma intraoperatoria o por congelación del tejido y por secciones permanentes. Para CBC primarios, menores de 2 cm. y con límites clínicos bien definidos, se recomienda un margen de seguridad de 3-4mm. Con la aplicación de un margen de 4 mm., se obtienen bordes histológicos libres de tumor en el 95% de lo CBC extirpados.

En profundidad es suficiente con abarcar la totalidad de la dermis o hasta la mitad del tejido celular subcutáneo. Para CBC con factores de alto riesgo, los márgenes de seguridad deben ser mayores. Estos márgenes amplios son muchas veces difíciles de definir debido a la extensión subclínica de los CBC de riesgo o de practicarlos en las localizaciones especiales, por la presencia o cercanía de estructuras importantes para la función o la estética. Pueden requerirse de técnicas quirúrgicas especiales para el cierre.

Para el tratamiento de estos CBC de alto riesgo, la técnica de elección es la cirugía micrográfica de Mohs.

### **CIRUGIA MICROGRAFICA DE MOHS**

Es el tratamiento con el mayor índice de curación para los CBC primarios y recurrentes, constituyéndose en esta última eventualidad en la indicación de

primera elección. Es muy útil para la extirpación de los CBC ubicados en las zonas de riesgo por preservar al máximo a los tejidos sanos circundantes. Se diferencia de la cirugía convencional porque efectúa la resección de los tumores en forma de capas horizontales, y la metodología empleada permite el examen histológico del 100% de los márgenes de sección. Se requiere de entrenamiento (la curva de aprendizaje es mayor a las de otros procedimientos), técnica (equipo de alto costo y un laboratorio que asegure la calidad de las secciones) y tiempo (3- 5 horas).

## **Evolución y pronóstico**

Por lo general son de crecimiento lento y evolución crónica. Depende del tipo de carcinoma: alto o bajo riesgo. Los de alto riesgo presentan mayor porcentaje de recurrencia y peor pronóstico. Están relacionados no sólo con el sitio anatómico donde se encuentre el tumor, sino también con el tamaño del mismo, el subtipo histológico, el estado inmunitario del paciente y el tratamiento previo efectuado. Son en la mayoría de los casos de muy buen pronóstico, ya que responden favorablemente a tratamientos correctamente indicados y realizados.

## **Recurrencia**

Alrededor del 10% a 5 años con tratamientos convencionales y el 1% con técnica micrográfica de Mohs. En tumores primarios previamente tratados, la recurrencia es de 15-20% con tratamientos convencionales y en el 5% con técnica micrográfica de Mohs. En pacientes inmunocomprometidos las recidivas son más frecuentes aún con la técnica de Mohs.

## **Morbilidad - mortalidad**

Si el diagnóstico no fue hecho en forma temprana o el tratamiento no fue el adecuado (por mala indicación o realización), la morbilidad puede ser importante. Recordar que una gran proporción de los CBC se localizan en la cara y el crecimiento tiende a dirigirse hacia los orificios naturales, con la implicancia que esto tiene.

Las metástasis son excepcionales, con un rango de 0,0028 a 0,1 %, y se presentan en tumores de gran tamaño o ulcerados, especialmente metatípicos. Se localizan en ganglios, pulmón y huesos y la sobrevida media es de unos 8 meses.

## Seguimiento

Todo paciente que ha padecido un carcinoma basocelular, independientemente de su fototipo y de los factores desencadenantes, tiene un 20-30 % de posibilidades de hacer un segundo carcinoma basocelular u otro cáncer cutáneo. Estos pacientes deben tener un control dermatológico semestral de cuerpo entero, para detectar de manera precoz las formas de inicio que conllevan a un tratamiento menos agresivo y de escaso costo.

Aconsejamos que el examen sea realizado dos veces al año, asociado esto con la pre y post exposición solar. El seguimiento de estos pacientes tiene por objetivo:

- La detección temprana de recurrencias tumorales (el 80 % lo hacen dentro de los primeros 5 años).
- La detección temprana y tratamiento de nuevas lesiones.
- La educación del paciente: autoexamen y protección solar. Control de los familiares directos.

## CARCINOMA ESPINOCELULAR.

### Definición

El Carcinoma Espinocelular (CEC), escamoso o epidermoide, es una neoplasia epitelial maligna de crecimiento relativamente rápido, que deriva de los queratinocitos de la epidermis.

### Epidemiología

Es el segundo tumor cutáneo maligno más frecuente, tras el Basalioma. Puede ocurrir de novo, sin lesión precursora o, como es más habitual, a partir de una lesión precancerosa.

Estudios epidemiológicos predicen un mayor incremento en la próxima década<sup>6</sup>. En España se estima una tasa anual de entre 72 por 100.000 habitantes para las mujeres y 100,8 por 100.000 habitantes para los varones<sup>7</sup>. Es más frecuente en zonas del cuerpo expuestas a la luz solar, particularmente en la cara (mejillas, orejas y semimucosa del labio inferior), seguido de las extremidades superiores, tronco y las extremidades inferiores.

Es de crecimiento lento. La mayoría de los CEC están localizados y se resuelven habitualmente mediante la extirpación quirúrgica u otros procedimientos locales<sup>7</sup>. No obstante, existe un subgrupo de CEC con un comportamiento

biológico más agresivo, que muestran gran tendencia a la recidiva local, a la diseminación linfática y en ocasiones, a la invasión de órganos distantes. El porcentaje de CEC primarios que metastatizarán es variable según las distintas series, habitualmente inferior al 5%. Este será mayor en los CEC de alto riesgo <sup>8</sup>, que según los autores puede oscilar entre el 152 y el 38%.

## Factores de riesgo

Carcinoma Espinocelular tiene un origen multifactorial, dependiendo de factores extrínsecos (factores medioambientales) e intrínsecos (factores del huésped o genéticos). El daño solar continuado es el factor ambiental más importante, dando lugar a mutaciones del gen supresor P53. También se consideran factores extrínsecos el arsénico, el alquitrán y los hidrocarburos, las radiaciones ionizantes, úlceras crónicas y cicatrices postquemadura, la infección por el virus del papiloma humano (principalmente VPH-16) y la inmunodepresión. Entre los factores genéticos se pueden considerar el fototipo (I y II), al igual que en el caso del Carcinoma Basocelular, y síndromes hereditarios (Xeroderma pigmentosum, Albinismo, Epidermodisplasia Verruciforme, Poroqueratosis Actínica, Epidermólisis Ampollosa Distrófica Recesiva).

## Factores pronósticos <sup>9</sup>

- Tamaño (diámetro mayor de 2 cm)
- Profundidad (mayor de 2 mm)
- Invasión perineural - Invasión linfovascular
- Tipo histológico (desmoplásico, adenoescamoso, enfermedad de Bowen invasiva o el CEC que aparece sobre un proceso inflamatorio crónico)
- Grado de diferenciación (tumores pobremente diferenciados)
- Inmunosupresión del paciente
- Infección por VPH - Zonas de alto riesgo (pabellón auricular, mucosa labial)
- Zonas de drenaje
- Lesiones inadecuadamente extirpadas o con tendencia a la

- recurrencia
- Expresión de genes tumorales

## Clínica

Clínicamente los Carcinomas Espinocelulares se pueden clasificar en:

1. Intraepidérmicos (Enfermedad de Bowen y Eritroplasia de Queyrat).
2. Invasivos localizados (cuerno cutáneo, ulcerado, cupuliforme, úlcero-vegetante y verrucoso).
3. Penetrantes y destructores (figura 3).



Figura 3. Carcinoma espinocelular penetrante ulcerado.

## Histopatología

Histológicamente, es un carcinoma sólido, en el que identifican con claridad a las células malpighianas de tipo poligonal provistas de puentes intercelulares prominentes. Son células que tienden a la queratinización rápida y masiva, dando lugar a lo que se denominan “perlas” o “globos córneos”. En otras ocasiones, la queratinización se produce de forma individual y precoz, que dan lugar a las llamadas células disqueratóticas. Finalmente, en algunos tumores las células pierden su capacidad de queratinizarse, transformándose en células fusiformes, mas parecidas a las células derivadas del tejido conjuntivo (pseudosarcomatosa).

Se debe también determinar el grado de diferenciación del tumor. Según la clasificación de Broders, los CEC se pueden dividir en <sup>10</sup>:

- grado I cuando el tumor tiene más del 75% de sus células diferenciadas.
- grado II sería cuando éstas comprenden entre el 50 y 75% del tumor.
- grado III cuando las células diferenciadas están entre el 25 y 50%.
- grado IV cuando son menos del 25%.

En la práctica habitual dividimos los CEC en bien diferenciados, moderadamente diferenciados o pobremente diferenciados; lógicamente, son estos últimos los que presentan un comportamiento más agresivo<sup>11</sup>

## Tratamiento <sup>12, 13</sup>

La mayoría de los CEC son de bajo riesgo y susceptibles a ser tratados exitosamente con diferentes métodos. La extirpación quirúrgica, incluida la cirugía micrográfica de Mohs, es el método de elección para el tratamiento del CEC, por permitir la extirpación total del tumor y el estudio histológico de los márgenes quirúrgicos. Esto no resulta posible con otras técnicas.

### CIRUGÍA CONVENCIONAL

Es el tratamiento de primera elección para la mayoría de los CEC. Se realiza la extirpación del tumor con margen de piel sana peritumoral. La extirpación de tejido sano peritumoral se efectúa para asegurar la remoción completa del tumor abarcando la extensión subclínica del mismo. Para los CEC de bajo riesgo, el margen de seguridad recomendado es de por lo menos de 4-5 mm. En CEC con factores de mal pronóstico, el margen de seguridad debe ser entre 6-10 mm. El margen profundo debe abarcar la totalidad del tejido celular subcutáneo.

### CIRUGIA MICROGRÁFICA DE MOHS

Es el método de elección y de mayor índice de curación para el tratamiento de los CEC primarios. Es particularmente útil para CEC ubicados en zonas de alto riesgo y recurrentes. Se diferencia de la cirugía convencional porque efectúa la resección de los tumores en forma de capas horizontales, y la metodología empleada permite el examen histológico del 100% de los márgenes de sección.

### CURETAJE Y ELECTROCOAGULACIÓN

Con esta técnica se han obtenido buenos porcentajes de curación en CEC primarios, intraepidémicos, de tamaño pequeño, bien delimitados, bien diferenciados y ubicados en zonas expuestas al sol. Se contraindica su práctica en CEC de alto riesgo o ubicados en las localizaciones especiales. Se requiere de anestesia, repara lentamente y deja cicatriz. Este método no permite el control histopatológico de los márgenes.

### **CRIOCIRUGÍA**

Método de destrucción tumoral por congelamiento, que ha demostrado índices importantes de curación en CEC de bajo riesgo, especialmente en CEC “in situ”. Está contraindicada para el tratamiento de CEC de alto riesgo o ubicados en las localizaciones especiales. Este método no permite el control histopatológico de los márgenes y deja cicatriz

### **LASER DE CO2**

Útil para CEC “in situ”.

### **RADIOTERAPIA**

Es un tratamiento relativamente incruento y conservador. Es útil para el tratamiento de determinados CEC, pero como otras técnicas distintas de la cirugía, presenta la imposibilidad de controlar los márgenes. Esta indicada especialmente en pacientes añosos, en lesiones extensas de difícil reconstrucción quirúrgica (párpados, mucosas) y en pacientes que se niegan a la cirugía o que presenten contraindicaciones para la misma (cardiopatías, coagulopatías).

Desventajas: radiodermatitis, retracción, fibrosis, en general son raros de observar y se producen a largo plazo (10 años o más). También es útil como adyuvante en el postoperatorio luego de resecciones incompletas (que no admitan una nueva cirugía) o en tumores con factores de mal pronóstico (infiltración perineural). Está contraindicado en la variedad adenoide y en el carcinoma verrucoso.

Dosis total de 6.000 cGy, fraccionada en dosis diaria de 200 a 500 cGy.

### **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

- *Interferón*: el interferón (IFN) alpha-2b intralesional puede ser de utilidad en CEC “in situ” o invasores de bajo riesgo, como alternativa

terapéutica cuando otras modalidades están contraindicadas o son impracticables.

- *Imiquimod* : solamente para casos especiales, portadores de CEC “in situ”, enfermedad de Bowen o eritroplasia de Queyrat. El imiquimod en crema al 5% por sus efectos inmunomoduladores y antitumorales (ver CBC), podría resultar de utilidad para CEC “in situ” de tamaño pequeño (en estudio Fase III). Aprobado por la FDA para queratosis solares.
- *5 fluoracilo*: pertenece al grupo de análogos de las pirimidinas que bloquea el timidilato- sintetasa, inhibiendo la síntesis del ADN. Se comercializa en ungüento al 5%. Colocar con un aplicador no metálico 1 o 2 veces por día durante 3 a 4 semanas o más, según las características de la lesión o la localización. En determinados pacientes se puede emplear 3 veces por semana en días alternos. Proteger áreas vecinas (especialmente mucosas).

Se debe advertir al paciente que puede producir: irritación, inflamación severa, erosión- ulceración. No exceder los 500 cm<sup>2</sup> de superficie cutánea a tratar por vez. Se utiliza en forma tópica en lesiones superficiales múltiples (enfermedad de Bowen).

### **TERAPIA FOTODINÁMICA**

Permite tratar lesiones múltiples “in situ”; es bien tolerada y los resultados cosméticos son muy buenos. Estaría indicada cuando está contraindicada la cirugía.

### **TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD REGIONAL (MULTIDISCIPLINARIO)**

Ante la existencia de ganglios linfáticos palpables se debe realizar el estudio histopatológico de los mismos (aspiración con aguja fina o biopsia quirúrgica). De encontrarse comprometidos, las opciones terapéuticas son la disección ganglionar, la radioterapia o la combinación de ambos. Quimioterapia para casos especiales.

La disección ganglionar profiláctica no está indicada en forma rutinaria y sus



posibles beneficios permanecen indefinidos. En pacientes con CEC de muy alto riesgo y que no presentan ganglios palpables, se puede recurrir a la identificación de micrometástasis ganglionares regionales, con la técnica del ganglio centinela. Para formalizar su indicación se necesitan más estudios. Los investigación del paciente se completarán con radiografías, resonancia magnética, tomografía, ultrasonido, etc.

### **TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD A DISTANCIA (MULTIDISCIPLINARIO)**

Con mal pronóstico, las opciones terapéuticas para las metástasis a distancia son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o la combinación de las mismas.

### **Evolución y pronóstico**

El pronóstico depende de diferentes factores: sitio anatómico (en orden creciente: áreas expuestas, labios, orejas, de novo en piel de zonas no expuestas, sobre dermatosis previas: radiodermatitis, bocas de fístulas, úlceras, inflamación crónica y mucosas); tamaño (más de 2 cm); profundidad (más de 4mm); velocidad de crecimiento; etiología; diferenciación histológica; invasión perineural y status inmunológico del paciente; además de tratamientos previos (recurrencia).

El potencial metastásico del CEC que aparece sobre las queratosis actínicas es del 3-4 % en CEC y aumenta del 18 al 31 % en tumores que asientan sobre dermatitis por radiación, cicatrices de quemaduras y fístulas de osteomielitis crónica. Los tumores de cavidad oral, labio, piel de escroto y mucosa genital pueden presentar crecimiento rápidamente invasivo y mayor el potencial metastático . Por lo general, las metástasis aparecen en primer lugar en ganglios linfáticos regionales, aunque pueden desarrollarse a distancia.

### **Inmunosupresión <sup>13</sup>**

Los CEC se ven modificados por la inmunosupresión en: trasplantes de órganos, VIH, leucemia linfóide crónica u tratamientos inmunosupresivos en diversas enfermedades inflamatorias. o nuevos medicamentos modificadores biológicos.

El CEC es más frecuente (65 veces o más) en trasplantados. Su incidencia es

mayor a la del carcinoma basocelular (4/1), a la inversa que en inmunocompetentes (1/4). Se incrementa con el paso del tiempo post trasplante (expresión tardía). También depende de la latitud geográfica, con mayor desarrollo de los tumores en zonas expuestas. Aparecen a edad más temprana que en el resto de la población. Pueden ser múltiples, más agresivos (invasión perineural), con mayor recurrencia local, metástasis y muerte (5%); por lo que requieren de mayor margen de seguridad quirúrgico, terapéutica adyuvante (ej.: retinoides orales al perineural) y seguimiento más estricto. En el 90% de los CEC de transplantados se detecta la presencia de VPH que actuarían como promotores tumorales. En menores de 18 años es aún más agresivo. Es el cáncer cutáneo con mayor mortalidad en trasplantados. Los pacientes con VIH tienen una relación entre CBC/CEC similar a los inmunocompetentes. Los CEC aparecen a edad más temprana y tienen comportamiento biológico agresivo. Las recurrencias, metástasis y sobrevida no dependen del número de infecciones oportunistas o del recuento de CD4.

## Seguimiento

Realizar examen clínico cutáneo-mucoso y ganglionar cada 3-6 meses por 2 años, cada 6-12 meses por 3 años y anualmente de por vida. (95 % de recurrencias locales y de las metástasis ganglionares ocurren antes de los 5 años). Si hay enfermedad regional, examen clínico cutáneo-ganglionar cada 3 meses por 2 años, cada 4 meses por un año, cada 6 meses por 2 años y anualmente de por vida.

Durante el seguimiento se puede realizar detección temprana de recurrencias, de nuevas lesiones tumorales cutáneo-mucosas o ganglionares, además de ser útil para la educación del paciente y examen de sus familiares directos. Solicitar periódicamente estudios por imágenes. La educación del paciente, incluye autoexamen y protección solar.

## ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Hoy se acepta que un tumor avascular raramente sobrepasa los 2-3 mm<sup>2</sup> y que su crecimiento se acelera posteriormente a la vascularización. Ese cambio hacia el fenotipo angiogénico involucra múltiples factores y complejos procesos, tales

como la regulación positiva de moléculas pro-angiogénicas y la regulación de inhibidores generados tanto por el tumor como por el huésped. El cambio puede ser desencadenado por diversas señales, entre ellas el estrés metabólico o mecánico, la respuesta inflamatoria y la alteración génica.

En cuanto a los factores de crecimiento endoteliales, los de crecimiento vascular (VEGF) y las angiopoyetinas, son consideradas tanto *in vivo* como *in vitro*, los más relevantes en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular, posibilitando el reclutamiento y proliferación de las células endoteliales por parte del tumor, y por tanto estimulando la angiogénesis intratumoral. Aunque numerosos estudios han establecido la asociación entre angiogénesis tumoral y metástasis, fueron Weidner et al en 1991 que propusieron que la vascularización de un tumor podía ser utilizada para predecir su agresividad <sup>14,15,16,17</sup>.

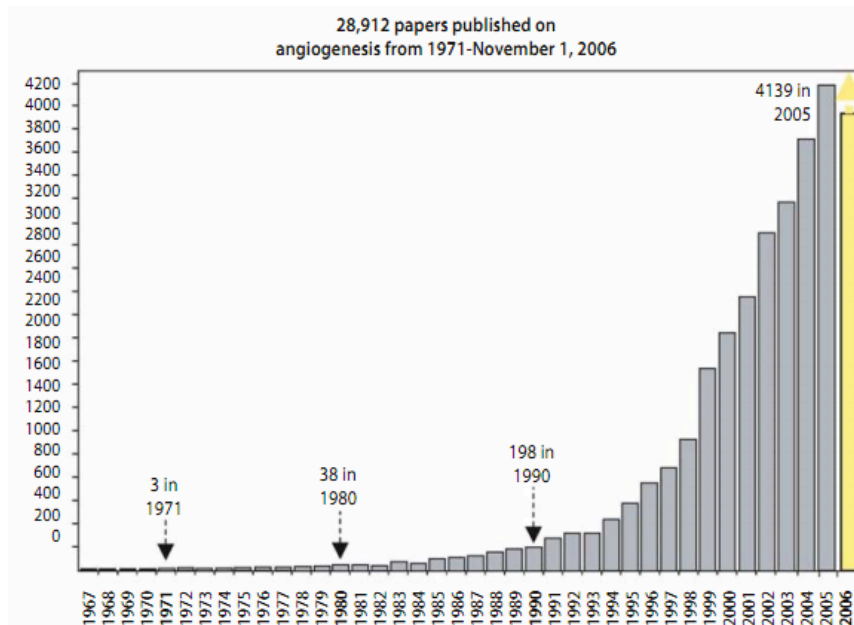
# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

- Revisión histórica del concepto de angiogénesis
- Mecanismos de vascularización en el Cáncer
- Metodología de cuantificación de angiogénesis en tumores sólidos
- Revisión de estudios inmunohistoquímicos sobre angiogénesis en CBC y CEC

# REVISIÓN HISTÓRICA DEL CONCEPTO ANGIOGÉNESIS

El término angiogénesis, hace referencia a la formación de los nuevos vasos sanguíneos. Los estudios llevados a cabo a lo largo de los últimos 40 años han proporcionado información importante sobre el proceso de angiogénesis y su papel en la biología del cáncer con más de 28.000 artículos publicados en este tópico.



**Fig. 1.2.** Publications with "angiogenesis" in the title from 1967 to November 2006. There are almost 29,000 papers since the 1971 publication in the *New England Journal of Medicine*, but very few in the first 10 years thereafter

Virchow, uno de los fundadores de la Anatomía Patológica, se dio cuenta del elevado número de vasos sanguíneos en la masa tumoral y describió en 1865 la presencia de redes capilares en estromas tumorales.

Años más tarde, la vascularización tumoral fue estudiada de forma sistemática por primera vez por Goldman en 1907, utilizando inyecciones intra-arteriales de bismuto en aceite para demostrar la presencia de una respuesta vasoproliferativa en órganos en los que se estaba desarrollando un tumor <sup>18</sup>. Estos estudios continuaron a lo largo del siglo XX. En 1927, Lewis describió la morfología de la vascularización de varios tumores en ratones, y se dio cuenta, de que la arquitectura vascular de cada tipo de neoplasia era diferente, llegando

a la conclusión de que el microambiente tumoral influye en el crecimiento y en las características estructurales de los vasos sanguíneos.

En 1928, Sandison utilizó una cámara transparente que podía introducirse en el oído del conejo y que permitía observación microscópica de los tejidos vivos <sup>19</sup>. El perfeccionamiento del uso de este tipo de cámaras por Clark y sus colaboradores <sup>20</sup> permitieron el estudio de los vasos sanguíneos y linfáticos in vivo, incluso con utilización de medios de contraste.

En 1931, Ide utilizó una cámara similar a la que utilizó Sandison para investigación de la correlación entre el crecimiento del carcinoma trasplantado al conejo y el desarrollo de la vascularización, observando que el aumento del tamaño tumoral se acompañaba de una rápida y extensa formación de nuevos vasos sanguíneos. Asimismo, señalaron que cuando la neovascularización no se producía, el tumor no tenía capacidad para crecer. Ide y sus colaboradores han sido los primeros en sugerir que las células neoplásicas producen factores específicos capaces de estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos <sup>21</sup>.

En 1945, Algire y Chalkley se dieron cuenta de que las neoplasias malignas pueden provocar desarrollo de los nuevos capilares a partir de la red vascular del huésped. Asimismo, introdujeron un enfoque cuantitativo para evaluar el desarrollo de los vasos sanguíneos mediante la realización de cuantificación diaria de los vasos y comparando este valor con el tamaño del tumor. En sus estudios utilizaban una cámara transparente implantada en la piel de gato, para valorar la respuesta vasoproliferativa en una herida o tras implantación de tejidos tumorales, observando que la proliferación vascular inducida por presencia de células tumorales fue más importante y su aparición más temprana en el tiempo que la inducida por una herida. Llegaron a la conclusión



Fig. 1.2 The cover of the treatise "Il Cancro", written by the Italian scientist Pietro Rondoni

de que el crecimiento tumoral está estrechamente vinculado al desarrollo de una red vascular intrínseca <sup>22</sup>.

Pietro Rondoni, Profesor de Patología general en la Universidad de Milán y director del Instituto de Cáncer de Milán, en su tratado “Il Cancro”, publicado en 1946, describe la capacidad del tumor de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos que lo rodean. Asimismo, él también afirma que la actividad angiogénica ocurre en el estroma. La actualidad de los hallazgos de Rondoni es evidente. Habla tanto de la capacidad angiogénica del tumor, como de la importancia del estroma en la neoformación vascular asociada al proceso tumoral <sup>23</sup>.

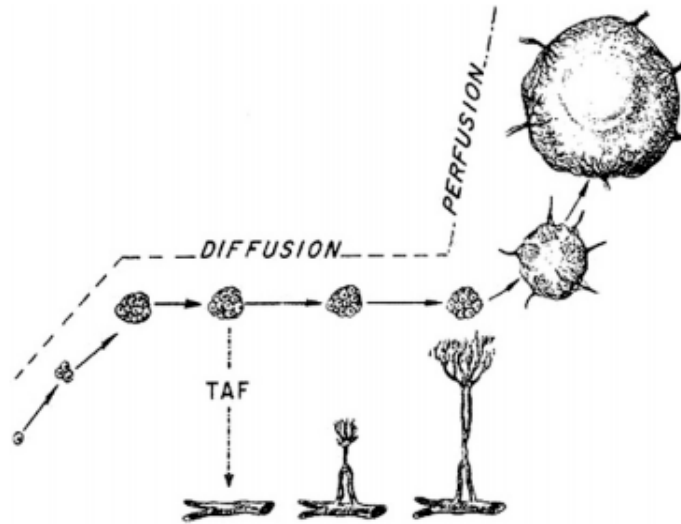
En 1968, Tannock estudió la relación entre las células endoteliales y la proliferación de las células tumorales, demostrando que el índice mitótico de las células tumorales disminuía al aumentar la distancia de las células endoteliales, proporcionando una evidencia directa de que la difusión de oxígeno y nutrientes a través del endotelio vascular es un factor limitante en el crecimiento del tumor.

## CRECIMIENTO TUMORAL Y ANGIOGÉNESIS

En 1971, Folkman publicó en New England Journal of Medicine, su hipótesis sobre la neovascularización en el cáncer. Según Folkman, el crecimiento tumoral es dependiente de angiogénesis y el autor fue primero en sugerir que la inhibición de la misma puede tener efectos terapéuticos. (Folkman, 1971) En este artículo también se introduce el término “anti-angiogénesis”. Según esta hipótesis, las neoplasias pierden la capacidad de proliferación cuando el tumor alcanza un tamaño más allá de 1-2 mm<sup>3</sup>, si no se produce el proceso de reclutamiento de los nuevos capilares sanguíneos que aseguren el aporte de oxígeno y de nutrientes a las células tumorales.

Actualmente este concepto está ampliamente aceptado y comprobado por estudios experimentales llevados a cabo en los años posteriores al descubrimiento de Folkman.

**Fig. 1.4** Schematic drawing showing that most solid tumors may exist early as tiny cell populations living by simple diffusion in the extracellular space. Further growth requires neovascularization and tumor angiogenesis factor (TAF) may be the mediator of neovascularization. (Reproduced from Folkman J, *N Engl J Med*, 285: 1182-6, 1971.)



A lo largo de la primera fase de crecimiento de tumores sólidos se produce una hiperproliferación celular sin objetivarse formación de nuevos vasos sanguíneos. Durante esta etapa, que se denomina avascular, el mantenimiento de las células tumorales se produce por difusión de oxígeno y de los nutrientes desde los vasos preexistentes que se encuentran en la proximidad hacia las células neoplásicas, y el tamaño máximo que puede alcanzar el tumor durante esta fase es de 1-2 mm.

Para poder sobrepasar el volumen que permite alcanzar la fase avascular, las células tumorales tienen que conseguir un mayor aporte de oxígeno y de nutrientes, lo que precisa de la formación de nuevos vasos sanguíneos o utilización de otras estrategias para conseguir este objetivo, como veremos a continuación.

Aunque si la velocidad de proliferación de las células tumorales es similar a la velocidad de la apoptosis, el tumor puede llegar a una situación de "estabilidad", cuando éste no aumenta de tamaño y no se inicia el fenómeno de angiogénesis.

La transición desde la fase avascular hacia la fase angiogénica en la literatura anglosajona se conoce con el término angiogenic switch.



# REVISIÓN DE MECANISMOS DE VASCULARIZACIÓN EN EL CÁNCER

Hasta hace poco, se consideraba que la vascularización de las neoplasias malignas se producía exclusivamente mediante la formación directa de los capilares nuevos (mecanismo conocido bajo el nombre de “endotelial sprouting”). Sin embargo, los descubrimientos recientes en el campo de la angiogénesis y de la remodelación vascular, han demostrado que el modelo simplista de la angiogénesis tumoral aceptado hasta ahora, no era suficiente para describir el espectro completo de los eventos morfogénicos y moleculares necesarios para la formación de una nueva red vascular.

Los diferentes mecanismos de vascularización tumoral no son mutuamente excluyentes; de hecho, en la mayoría de las ocasiones, participan varios de ellos.

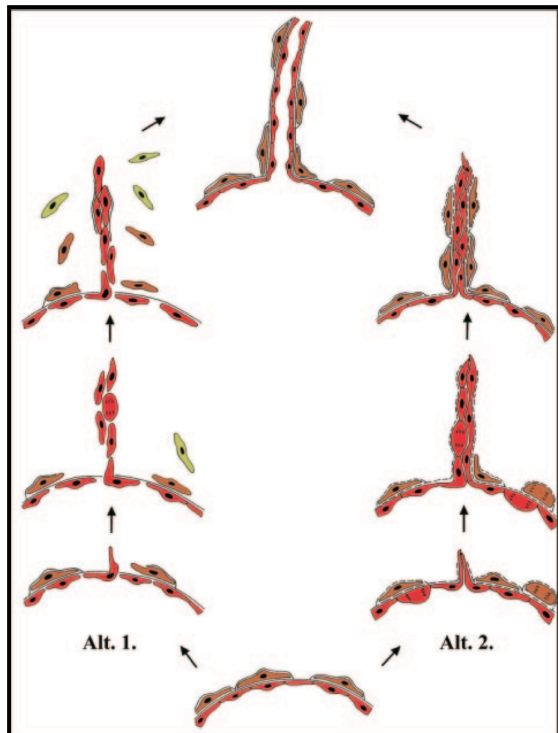
## 1. “Endothelial sprouting”.

Consiste en la formación de nuevos brotes capilares a partir de los capilares del huésped. Es el mecanismo de neovangiogénesis mejor conocido.

Bajo el estímulo angiogénico, se producen focos de degradación de la membrana basal en los capilares peritumorales, lo que debilita la unión entre las células endoteliales, y permite su migración hacia el tejido conjuntivo, donde se disponen una detrás de otra formando un cordón.

La formación de la luz vascular se

produce mediante la invaginación? del cuerpo de una única célula, o bien con participación de más de una célula endotelial. Al mismo tiempo, se sintetiza la nueva membrana basal y se reclutan los pericitos y otras células de la pared vascular.



**Figure 1.** Endothelial sprouting. Schematic representation of the EC sprouting models suggested by Ausprunk and Folkman (Alt. 1<sup>1</sup>) and by Paku and Paweletz (Alt. 2<sup>2</sup>). Red cells represent endothelial cells; brown cells are pericytes. Yellow cells are mural cells of other origin (fibroblasts or bone marrow-derived cells). See Vascularization Mechanisms in Cancer for details.

## 2. “Vascular co-option”

Se trata de la incorporación en la red vascular del tumor de los capilares del tejido del huésped. Este fenómeno se produce cuando el tumor se origina, o bien metastatiza, en los tejidos con una rica vascularización.

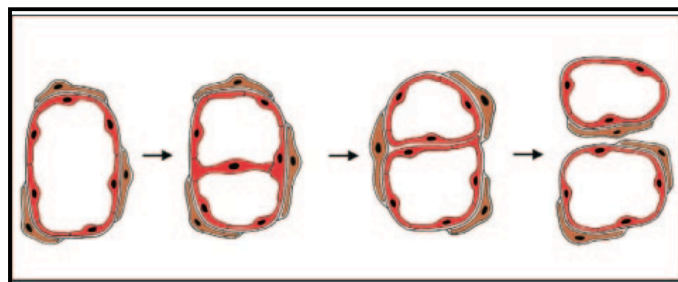
Ya en el 1997 Pezzela se dio cuenta de que determinados tumores mantenían la capacidad de proliferación a pesar de que no había evidencia de neoangiogénesis. Se trataba de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. El análisis histológico puso de manifiesto que las células tumorales recubrían los alveolos, atrapando pero no destruyendo sus capilares <sup>24</sup>. Este fenómeno también se ha objetivado en modelos animales.

Unos años más tarde, se comprobó que este mecanismo de vascularización también existía en el Melanoma Maligno. Los autores que estudiaron este fenómeno, crearon un modelo animal adecuado y consiguieron realizar una reconstrucción en tres dimensiones de la vascularización del tumor, observando que no había evidencia morfológica del crecimiento directo de los vasos; en cambio, el tumor crecía mediante el atrapamiento del plexo vascular presente en el tejido conjuntivo peritumoral.

Un fenómeno similar se ha descrito en el caso de las metástasis de carcinoma colorrectal en el hígado, identificándose tres patrones de crecimiento del tejido tumoral metastático en esta localización: reemplazamiento (replacement), expansión (pushing) y el patrón de crecimiento desmoplástico <sup>25</sup>.

## 3. “Intussusceptive Microvascular Growth”

En 1996 Patan describió un mecanismo adicional de la vascularización de



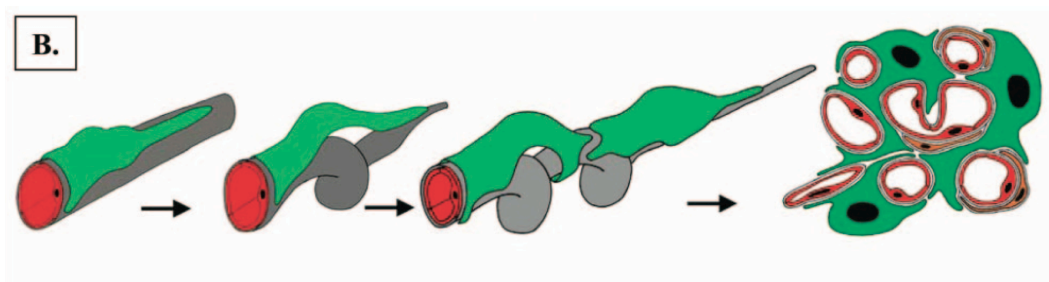
de neoplasias malignas, conocido en la literatura anglosajona con el término “intussusceptive microvascular growth”. Este concepto se refiere a la formación de la nueva red vascular mediante la inserción de columnas de tejido conectivo, llamadas pilares, en la luz vascular. El proceso se inicia con la formación de un

punto de unión transluminal, y su crecimiento lleva a la partición del vaso en dos.

Este tipo de angiogénesis se ha objetivado en un amplio número de procesos fisiológicos y patológicos, y desde el punto de vista del gasto energético, es más económico, y también más rápido que el “vascular sprouting”, pudiendo llevarse a cabo en tan sólo unas horas o incluso minutos, sin depender primariamente de la proliferación endotelial, degradación de la membrana basal o invasión del tejido conjuntivo <sup>26</sup>.

#### 4. “Glomeruloid Angiogenesis”

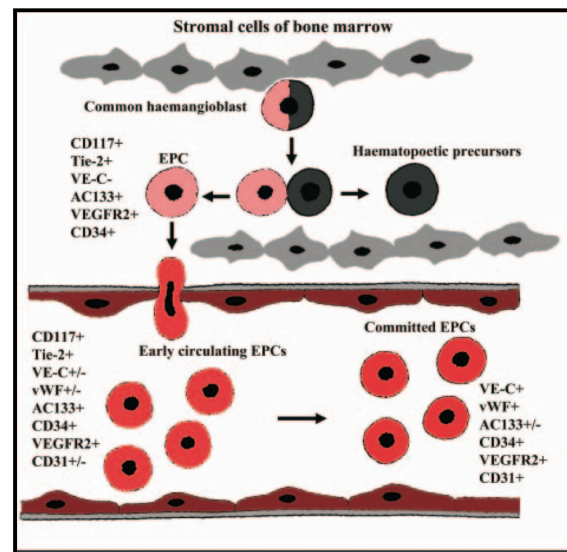
En 2001 Sunberg describió la formación de un tipo específico de proliferación vascular, conocido con el nombre de angiogénesis glomeruloide <sup>27</sup>. Los cuerpos glomeruloides (CG) son estructuras formadas por agrupaciones de células endoteliales que se asemejan histológicamente a los glomérulos renales. Estas estructuras se han descrito inicialmente en gliomas de alto grado, y son uno de los hallazgos histopatológicos diagnósticos en el glioblastoma multiforme <sup>28</sup>. Su presencia se ha asociado con mayor agresividad y peor pronóstico en los tumores cerebrales <sup>29</sup>. Posteriormente se ha descrito en otros muchos tipos de cáncer. Estas estructuras están compuestas por varios capilares estrechamente relacionados y rodeados por una membrana basal engrosada de forma irregular, en la que se encuentran embebidos escasos pericitos.



Straume evaluó la presencia de CG en 723 pacientes con melanoma, carcinoma de mama, endometrio y próstata, y afirmó que las estructuras similares a los glomérulos renales estaban presentes en el examen histológico del 13-23% de los casos estudiados de estos 4 tipos del cáncer humano <sup>30</sup>. Células endoteliales progenitoras (vasculogénesis postnatal)

El concepto “vasculogénesis” hace referencia al proceso de diferenciación in situ de células endoteliales a partir de las células precursoras primitivas. A lo largo de muchos años se ha considerado este proceso como exclusivo de las fases más precoces del desarrollo del sistema vascular en el embrión. Pero estudios recientes han puesto de manifiesto que las células endoteliales progenitoras derivadas de la médula ósea (ECP: endothelial progenitor cells) participan en multitud de procesos fisiológicos y patológicos que implican una respuesta neoangiogénica.

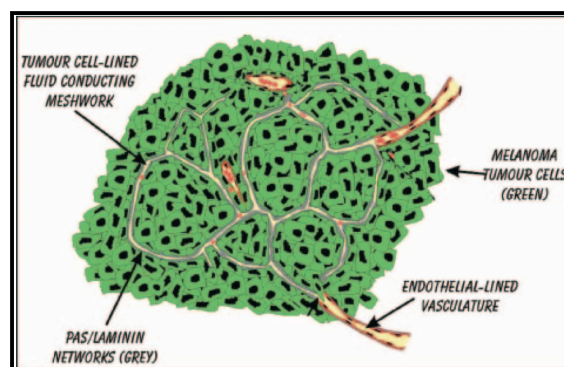
Así, se ha visto que diferentes citoquinas derivadas del tejido tumoral tienen la capacidad de movilizar las ECP de la médula ósea<sup>31</sup>. Durante el crecimiento del tumor, se produce un incremento de niveles del VEGF en sangre, y estos niveles se correlacionan con el número de las ECP en la circulación.



A pesar de que existe evidencia científica a favor de la participación de las células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea en el proceso de la vascularización tumoral, todavía no conocemos cual es su contribución relativa en comparación con otros mecanismos descritos previamente.

## 5. “Vasculogenic mimicry”

El término “Vasculogenic mimicry” apareció en la literatura científica en el año 1999, haciendo referencia a la capacidad de las células agresivas del melanoma maligno para expresar los genes propios de las células endoteliales,



y formar una red de canales ricos en matriz extracelular, PAS+, que simulan el patrón vasculogénico embrionario<sup>32</sup>.

Estos canales se disponen rodeando grupos de células tumorales. En las vías de señalización de vasculogenic mimicry se han implicado varias moléculas que también están involucradas en las vasculogénesis embrionaria, tales como VE-cadherina (vascular endothelial cadherin), EPHA-2 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma-A2), PI-3K (phosphatidylinositol 3 kinase), FAK (focal adhesion kinase), diferentes metaloproteinasas (MMP) y laminina 5 $\gamma$ 2<sup>33</sup>.

En otras palabras, durante el proceso de tumorigénesis en el caso de las formas agresivas del Melanoma maligno, las células sufren un proceso de desdiferenciación, acercándose en su perfil de expresión genética a las células embrionarias indiferenciadas. Esta plasticidad de algunos tipos agresivos de cáncer, puede explicar su habilidad para simular la actividad de otros tipos celulares, entre ellos de las células endoteliales y participar en procesos como la neovascularización y formación de la red de canales conocida bajo el nombre de vasculogenic mimicry.

Todavía quedan muchas dudas sobre las implicaciones biológicas de este proceso, pero estudios recientes indican que la formación de canales ricos en laminina y PAS positivos sirven para el transporte intratumoral de fluidos. Su análisis morfológico sugiere que están en contacto con los vasos sanguíneos a través de diferentes tipos de anastomosis, participando de este modo en la vascularización del tumor<sup>34</sup>.

El primer tumor en el que se describió la presencia de canales PAS+ sin evidencia de participación de células endoteliales, fue el melanoma maligno<sup>35</sup>, describiéndose posteriormente este fenómeno también en el cáncer de mama, próstata, ovario, pulmón, sinoviosarcoma, rabdomiosarcoma y feocromocitoma.

Es evidente que los tumores requieren un aporte vascular adecuado para su crecimiento y expansión, pero tenemos que tener en cuenta que el sistema de vascularización del tumor no está basado exclusivamente en la proliferación de las células endoteliales y formación de los nuevos capilares. Este hecho puede ser responsable, al menos en parte, de la resistencia a las terapias anti-angiogénicas, puesto que éstas bloquean el desarrollo de nuevos vasos, es decir, interfieren en el proceso de “endotelial sprouting”, pero no en el resto de los mecanismos.

# REVISIÓN DE ASPECTOS METODOLÓGICOS DE CUANTIFICACIÓN DE ANGIOGÉNESIS

## Metodología de cuantificación de angiogénesis

La cuantificación de la angiogénesis no es una tarea sencilla, puesto que se trata de un proceso dinámico. La mayoría de los estudios se han centrado en la evaluación del producto final de la angiogénesis : el número de microvasos en las preparaciones histológicas del tumor. Se han descrito varias técnicas para realizar la cuantificación de los vasos intra- y peritumorales, cuyas ventajas e inconvenientes describiremos a continuación.

Por otro lado, como consecuencia del descubrimiento e introducción en la práctica clínica de las terapias anti-angiogénicas, ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que, de una forma sencilla y no invasiva permitiesen valorar la vascularización del tumor in vivo para monitorizar la respuesta tumoral al tratamiento. Por lo tanto, haremos una breve mención de estas técnicas.

### Valoración de angiogénesis mediante inmunohistoquímica

#### **1. Cuantificación de las microvellosidades (técnica propuesta por Weidner)**

La técnica que se ha empleado con mayor frecuencia en la cuantificación de angiogénesis en melanoma es la descrita por Weidner en 1991 <sup>36</sup> en un estudio en el que investigaba el valor pronóstico del número de vasos en el cáncer de mama invasivo. El método se basa en la enumeración de las vellosidades en las denominadas áreas con mayor densidad de vasos. Para la tinción de sus preparaciones Weidner empleó un anticuerpo panendotelial, factor VIII (o factor de von Willebrand).

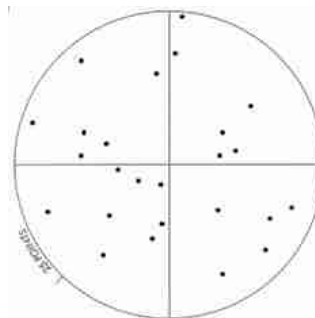
El primer paso en la técnica de Weidner es la identificación de los denominados “áreas calientes” o “hot spot”, mediante el análisis de toda la preparación a pequeño aumento (x10). Posteriormente, se realiza la cuantificación de las microvellosidades a mayor aumento (x200) en áreas



previamente seleccionados. Se considera como 'microvellosidad', y, por tanto, se cuenta, cualquier célula o cluster de células teñidas, claramente separado de las vellosidades adyacentes, incluso si no se puede identificar la luz vascular. Se toma el valor más alto de los identificados en cada hot spot.

## 2. Técnica de Chalkley

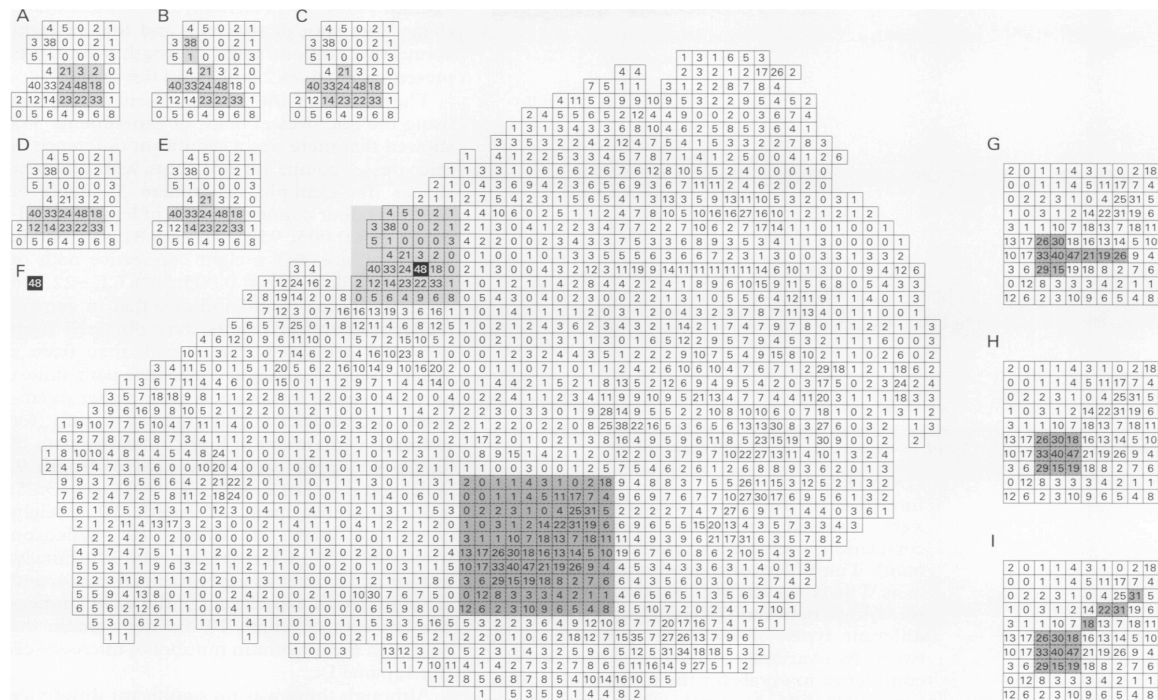
Fue descrita por Chalkley en 1943 <sup>37</sup>. En el segundo consenso internacional de cuantificación de angiogénesis en tumores sólidos esta técnica fue considerada como técnica de elección. Su principal ventaja consiste en que evita uno de los pasos más subjetivos del método propuesto por Weidner: la decisión de considerar dos estructuras adyacentes positivas para la tinción empleada como vellosidades independientes o como una única estructura <sup>38</sup>. En primer lugar, la preparación se examina a pequeño aumento y se seleccionan los "puntos calientes", o dicho de otro modo aquellas zonas que presentan una mayor densidad de vasos. A continuación se introduce la llamada grátícula de Chalkley en el ocular del microscopio y se examinan a mayor aumento los "hot spot" seleccionados previamente para cuantificar aquellos puntos que estén situadas sobre las células teñidas o sobre las luces de aquellos vasos cuyas paredes estén claramente teñidas con el marcador endotelial.



Esta técnica será la que emplearemos en nuestro estudio.

## 3. Análisis computarizado automático

Beliën y sus colaboradores han desarrollado un programa informático que permite identificar y cuantificar las vellosidades en toda la superficie del tumor, y no sólo en los puntos "calientes". El programa crea de forma automática un mapa completo de la distribución de los vasos marcados previamente con alguno de los anticuerpos específicos del endotelio vascular.



(Copia de la publicación original de Beliën. Mapa de microvascularización del tumor de mama invasivo en estadio T2).

La principal ventaja de este sistema es que ofrece una valoración mucho más objetiva del sistema vascular del tumor. Los dos principales inconvenientes – son el tiempo requerido para la evaluación de cada preparación (se requieren tres horas y media para examinar 1 cm cuadrado) junto con la necesidad de soporte técnico específico. Probablemente, estas son las razones que han dificultado la difusión y han impedido el uso universal de esta técnica para la valoración de la neovascularización en el cáncer, a pesar de sus indiscutibles ventajas <sup>39</sup>.

#### 4. Fracción de células endoteliales en proliferación

En primer lugar se realiza una doble tinción de los cortes del tejido con un marcador del endotelio vascular y un marcador de células en proliferación. Esta técnica nos permite evaluar simultáneamente la proporción de las células tumorales y endoteliales que están en proceso de división, lo que a su vez permite calcular la ratio de proliferación tumoral frente a la proliferación vascular (TCP/ECP) <sup>38</sup>.

El valor obtenido nos permite hacer una idea sobre el papel de la angiogénesis en la proliferación tumoral. Por ejemplo, si obtenemos un



valor alto, nos indicará que la velocidad de expansión del tumor es más alta de lo que cabría esperar si analizamos la velocidad de desarrollo del árbol vascular. Lo que significa que la proliferación de la neoplasia es, al menos en parte, independiente de angiogénesis. Dicho en otras palabras, existen otros mecanismos de vascularización que son capaces de asegurar un adecuado aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, aparte de la formación de nuevos capilares ('endothelial sprouting')

Hillen comparó la densidad de los microvasos calculada según la técnica clásica de Weidner con la fracción de células endoteliales en proliferación (ECP), y su capacidad de predecir la aparición de metástasis en pacientes con Melanoma. Según los resultados, sólo ECP tenía valor pronóstico en este tipo de tumor, mientras que la MVD no tenía ningún tipo de relación con la evolución de los pacientes <sup>40</sup>. La ECP podría tener interés en la selección de pacientes candidatos al tratamiento con fármacos anti-angiogénicos.

## **5. Otros parámetros a tener en cuenta**

Otro parámetro que nos permite hacer una idea sobre el estado de madurez y estabilidad de las vellosidades es la presencia y la cantidad de los pericitos. Eberhard llevó a cabo un estudio en el que valoraba la fracción de las vellosidades sanguíneas que tenían cobertura por pericitos en una amplia muestra de tumores. Según el autor, la fracción observada variaba en función del tipo del tumor: desde un 10% en el caso de los glioblastomas hasta aproximadamente un 70% en carcinomas colorrectales <sup>41</sup>. Se ha demostrado experimentalmente que la remodelación de las vellosidades sanguíneas, sólo es posible si el vaso no está rodeado por pericitos <sup>42</sup>. En otras palabras, los pericitos estabilizan las vellosidades e impiden su proliferación. Todavía quedan muchas dudas sobre el papel de los pericitos en la neoangiogénesis tumoral, pero tenemos que tener en cuenta que los diferentes tejidos sanos pueden tener, de base, un porcentaje variable de pericitos. Por lo tanto, al menos una parte de las diferencias encontradas por Eberhard, podrían deberse a las diferencias entre los tejidos en los que se origina el tumor.

Para monitorizar la respuesta tumoral al tratamiento con fármacos anti-angiogénicos puede ser útil la cuantificación de las vellosidades sanguíneas que están en progreso de regresión. Además de la comparación de la cantidad de vasos antes y después del tratamiento, puede ser útil el cálculo de la fracción de células endoteliales apoptóticas, lo que refleja de forma directa el efecto del tratamiento sobre sus células diana.

### Anticuerpos del endotelio vascular

La cuantificación de angiogénesis mediante técnicas de inmunohistoquímica requiere elección de un anticuerpo adecuado. Actualmente existen dos grandes grupos de marcadores endoteliales: los anticuerpos pan-endoteliales y los específicos de las células en proliferación.

Así, los primeros se caracterizan por producir la misma intensidad de tinción tanto en las vellosidades pequeñas, como en las más grandes y maduras, y generalmente se pueden utilizar tanto en tejido fresco congelado como en muestras embebidas en parafina. De este grupo, los anticuerpos más utilizados en las muestras en parafina son el CD31 y el CD34. El anticuerpo CD31 reacciona con una glicoproteína de 130 kDa conocida como 'platelet endothelial cell adhesion molecule-1' (PECAM-1), y su principal desventaja es la posibilidad de tinción de células inflamatorias, pero éstas pueden distinguirse de las células endoteliales en base a sus características morfológicas. Otro inconveniente descrito en la literatura es la frecuente pérdida de antigenicidad en aquellas muestras en las que se han utilizado sustancias fijadoras con ácido acético <sup>38</sup>, lo que daría lugar a la infravaloración del número de vasos, pero este problema se soluciona mediante la recuperación antigénica en estufa.

En lo que se refiere al CD34, su antígeno se ha identificado también en el endotelio linfático, células perivasculares y otros elementos estromales, por lo que todas estas estructuras pueden dar un resultado falsamente positivo y llevar a una sobrevaloración de la vascularización tumoral <sup>43</sup>.

En los últimos años se han identificado y se han comercializado anticuerpos específicos del endotelio en proliferación, lo que supuso un importante avance en la investigación de angiogénesis tumoral, puesto que ha permitido

diferenciar las vellosidades preexistentes de las neoformadas. Preferentemente se deben utilizar en tejidos frescos o congelados, debido a que su actividad en los tejidos embebidos en parafina puede variar en función del método de fijación utilizado.

Uno de los anticuerpos más representativos es el CD 105, una glicoproteína de membrana de células endoteliales, que se sobreexpresa en el endotelio vascular tumoral y forma parte del complejo del receptor del 'transforming growth factor-beta', involucrado en el desarrollo y remodelación vascular. En algunos estudios, la densidad de los vasos intratumorales determinada mediante CD 105 ha demostrado tener una clara relación con la evolución de la enfermedad, en cambio los autores no han encontrado ningún valor pronóstico del número de vellosidades CD34-positivas en la misma muestra de tumores de mama <sup>44</sup> y, más recientemente, de neoplasias de pulmón de células no pequeñas <sup>45</sup>.

En la siguiente tabla resumimos las principales características de los anticuerpos específicos del endotelio vascular.

Anticuerpo	Sensibilidad	Especificidad	T. fresco	T. en Parafina
Anti-CD31	Tiñe vasos pequeños y grandes con la misma intensidad en tejido sano y tumoral	No específico en tejido fresco congelado. Ocasionalmente tiñe de células plasmáticas.	+	+
Anti-FVIII	Tiñe de forma variable los vasos grandes y capilares. Ac policlonal es más sensible	Ac monoclonal es más específico. Con el Ac policlonal tinción de estroma	+	+
UEA	Tiñe vasos pequeños y grandes con la misma intensidad en tejido sano y tumoral	Baja: tiñe células tumorales y vasos linfáticos.	+	+
Anti-CD34	Tiñe vasos pequeños y grandes con la misma intensidad en tejido sano y tumoral	Alta. Ocasionalmente tiñe vasos linfáticos y estroma perivascular	+	+
Anti-CD36	Tinción intensa de vasos pequeños - variable/débil de vasos grandes	Tiñe monocitos y plaquetas	+	?/+
PAL-E	Tiñe vasos pequeños y grandes con la misma intensidad en tejido sano y tumoral	Alta	+	-
BMA120-BW200	Tiñe vasos pequeños y grandes con la misma intensidad en tejido sano y tumoral	Alta. Ocasionalmente tiñe células tumorales y serosa	+	+
EN-4	Tiñe vasos pequeños y	Tiñe células tumorales,	+	?/+

	grandes	inflamatorias y estroma		(depende de fijación)
CD105 (activado)	Pequeños vasos intra-tumorales positivos, grandes vasos negativos	Tinción débil de vasos en tejido sano	+	+
LM609 (activado)	Preferentemente tiñe vasos de pequeño calibre en tejido tumoral	Tinción débil de vasos en tejido sano	+	+
TEC-11 (activado)	Positivo en >80% de vasos tumorales	Tiñe débilmente vasos en tejido sano y estroma	+	-

### Recomendaciones del consenso internacional para cuantificación de angiogénesis

A pesar de que muchos estudios han identificado la MVD como un factor pronóstico independiente en tumores sólidos, algunos han cuestionado esta relación. Por supuesto, las discrepancias encontradas pueden deberse a las distintas características propias del comportamiento biológico de cada tumor, pero parece que, al menos una parte, puede ser explicada por la falta de estandarización de las tinciones inmunohistoquímicas.

En el año 2002 Peter Vermeulen en colaboración con otros expertos internacionales en angiogénesis, publicó el segundo consenso internacional en cuantificación de angiogénesis en tumores sólidos, donde propuso una serie de recomendaciones a seguir con el fin de estandarizar la metodología de cuantificación de vascularización tumoral. A continuación, de forma esquemática, exponemos las características clave de las técnicas consideradas de elección en la valoración de los distintos parámetros relacionados con angiogénesis.

- **Estimación de área vascular: técnica de elección 'Chalkley count'**
  - Unidad: no tiene unidades.
  - Metodología: tinción con el anticuerpo CD34 de una de las secciones representativas del tumor; posteriormente aplicación del método de Chalkley: tras examinar la preparación con pequeño aumento se seleccionan los puntos calientes y a mayor aumento

(x200) se realiza la cuantificación de los puntos de la grátícula que coincidan con las estructuras CD34-positivas.

- Comentario: se requiere un período de entrenamiento previo; hay determinados tipos de tumores que no tienen ‘hot spot’ evidentes.

- **Fracción de células endoteliales en proliferación**

- Unidad: porcentaje.

- Metodología: se realiza doble inmunotinción con anticuerpos CD34 (o CD31) y Ki67. Los campos se seleccionan aleatoriamente y se realiza la cuantificación de las células positivas para ambos anticuerpos (células endoteliales en proliferación), dividiéndose este valor por el número total de las células endoteliales (CD34+Ki67-).

- Comentario: se considera que este valor puede ser útil para valorar la indicación y predecir la eficacia de las terapias anti-angiogénicas.

- **Índice de cobertura por pericitos**

- Unidad: porcentaje.

- Metodología: doble inmunotinción con anticuerpos contra CD34 (o CD31) y contra la actina de músculo liso. Los campos se seleccionan aleatoriamente.

- Comentario: el valor obtenido tiene que ser interpretado teniendo en cuenta el índice de cobertura por pericitos en tejido sano adyacente.

# ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS SOBRE ANGIOGÉNESIS EN CARCINOMAS BASOCELULARES Y ESPINOCELULARES.

## Introducción

La inmunohistoquímica es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina.

A pesar del desarrollo de múltiples técnicas novedosas para valoración no invasiva de la angiogénesis tumoral, la utilización de la inmunohistoquímica en las muestras histológicas del tumor sigue siendo, con diferencia, la técnica más empleada. A continuación, revisaremos de forma sistemática los estudios que valoran la angiogénesis mediante técnicas inmunohistoquímicas en carcinomas basocelulares y espinocelulares.

## Resumen de los estudios identificados en la literatura

En el año 2000, Strieth y colaboradores <sup>46</sup>, realizaron un estudio en el que comparaban la angiogénesis entre queratosis actínicas, queratosis actínicas hipertróficas y carcinomas espinocelulares; para ello realizaron inmunohistoquímica con VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Los autores observaron una falta de correlación entre la expresión de VEGF y el estadio tumoral, lo que podría indicar que este factor no sea decisivo en la progresión tumoral, y que se debía a otros factores.

El primer estudio comparando el carcinoma basocelular y espinocelular se realizó en el 2003 por Loggini y colaboradores <sup>47</sup>. En el observaron una asociación entre MVD y el aumento del diámetro, la ulceración del tumor y descenso de la supervivencia.

Posteriormente en este mismo año también se realizó otro estudio en el que comparaban ambos tumores; Chin y sus colaboradores <sup>48</sup> intentaron observar el

distinto comportamiento entre CBC, CEC y Tricoepiteliomas mediante la tinción inmunohistoquímica con CD 31. Entre los resultados mas relevantes del estudio fue la ausencia de correlación entre MVD con la profundidad de la invasión y la diferencia cualitativa entre los patrones de angiogénesis tumoral (CBC los vasos estaban en el estroma peritumoral y en CEC estaban peri e intratumorales. Chin propone un modelo en el cual los tumores invasivos inducen un estroma con agio y linfangiogénesis. En estos tumores la MVD se correlaciona con el pronóstico.

El último estudio se ha realizado en el año 2011 por Florence <sup>49</sup> publicado en Clinics. En este estudio se valora la progresión del CEC usando marcadores endoteliales (panendoteliales [CD 34] y marcadores de neoangiogénesis [CD105] ); en el concluyen que el cambio de la angiogénesis ocurre muy temprano en el CEC, y la tasa de neovascularización es paralela a la progresión del tumor. En contraste con los marcadores panendoteliales, el uso de CD 105 permite una dinámica evaluación de la angiogénesis tumoral.

# JUSTIFICACIÓN

---



## JUSTIFICACIÓN

Los Carcinomas Baso y Espinocelular tienen una incidencia estimada de 600.000 casos por año, de los cuales 500.000 son Epiteliomas Basocelulares y 100.000-150.000 Carcinomas Espinocelulares y está en incremento debido al incremento de la exposición al sol.

El cáncer de piel no melanoma (CBC Y CEC), presentan un comportamiento y gravedad muy diferente, la mayoría de estos tumores tienen muy buen pronóstico, pero hay casos seleccionados que presentan un comportamiento agresivo, grandes destrucciones locales, recidiva, incluso metástasis y es de gran utilidad en la práctica clínica conocer cualquier factor que pueda ayudar a predecir la evolución y el pronóstico del tumor, y, por tanto, planificar la estrategia terapéutica de manera precoz.

El proceso de angiogénesis es crucial en la progresión y en la diseminación de la mayoría de los tumores <sup>50, 51</sup>. Hemos encontrado en la bibliografía estudios acerca del proceso de la angiogénesis en el melanoma <sup>52, 53</sup> en los tumores escamosos de esófago <sup>54</sup>, así como en tumores de cabeza y cuello <sup>55, 56, 57</sup>. Solo hemos encontrado dos estudios que valoren comparativamente los marcadores del proceso de angiogénesis en los dos tipos más frecuentes del cáncer de piel <sup>47,48</sup>: epiteliomas basocelulares vs carcinomas espinocelulares. Por lo que este estudio es el tercero que compara la angiogénesis entre CBC y CEC, pero es pionero en comparar la angiogénesis con la neoangiogénesis en estos dos tipos tumorales con marcadores panendoteliales y de neoangiogénesis. En este sentido los hallazgos de este estudio podrían tener implicaciones terapéuticas en el futuro, entre ellos: la posibilidad de inhibir los factores que favorezcan la diseminación del tumor por vía linfática y también a distancia, a través de los vasos sanguíneos.

El principal interés de este trabajo es intentar identificar aquellos factores que se asocian con un comportamiento más agresivo, como en el caso del epitelioma espinocelular.

# HIPÓTESIS

---

# HIPÓTESIS

**1. HIPÓTESIS GENERAL NÚMERO 1:** “La expresión de los marcadores de angiogénesis será diferente en carcinomas basocelulares y espinocelulares.

**a. Hipótesis Operativa 1.1:** “La expresión del marcador CD 31 será□ mayor en los carcinomas espinocelulares frente a los carcinomas basocelulares”.

**b. Hipótesis operativa 1.2:** “La expresión del marcador CD 105 será□ mayor en los carcinomas espinocelulares frente a los carcinomas basocelulares”.

**2. HIPÓTESIS GENERAL NÚMERO 2:** “Existe una correlación entre la expresión de los marcadores de angiogénesis tumoral, y la agresividad clínica del tumor”.

**a) Hipótesis Operativa 2.1:** “La mayor expresión de CD 31 y CD 105, se relaciona con la mayor MVD (Microvessel density); y esta, a su vez, se relaciona con la mayor agresividad del tumor”.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

### 1.OBJETIVO GENERAL NÚMERO 1: “Identificar las diferencias

inmunohistoquímicas que puedan explicar el diferente comportamiento clínico de los dos tipos de cáncer cutáneo más frecuentes: carcinoma basocelular y carcinoma espinocelular ”.

**a) Objetivo específico 1.1:** “Identificar las diferencias en la expresión de la proteína CD 31, entre los epitelomas basocelulares y carcinomas espinocelulares.

**b) Objetivo específico 1.2:** “Identificar las diferencias en la expresión de la proteína CD105, entre los epitelomas basocelulares y carcinomas espinocelulares.

### 2. OBJETIVO GENERAL NÚMERO 2:“Identificar marcadores

inmunohistoquímicos y clínicos que sirvan como marcadores pronósticos y que permitan plantear una estrategia terapéutica adecuada para cada caso”.

**a) Objetivo específico 2.1:** “Relacionar la intensidad de la expresión de los marcadores de la angiogénesis con la agresividad clínica del tumor”.

**b) Objetivo específico 2.2:** “Descripción de las variables clínico-demográficas de la población estudiada (comparar CBC vs CEC)”.

**c) Objetivo específico 2.3:** “Comparar CD31 vs CD105 en una misma muestra de tumores para ver las diferencias en la expresión”.

**d) Objetivo específico 2.4:** “Plantear futuras líneas de investigación, encaminadas a desarrollar estrategias terapéuticas para evitar la diseminación del tumor”.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## **A- MATERIAL**

La evaluación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales CD 31 y CD 105 se realizó a partir de material sobrante después del diagnóstico de biopsias y exéresis en las secciones obtenidas de los bloques incluidos en parafina pertenecientes al archivo del laboratorio de dermatopatología del Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza.

La obtención de las muestras se había realizado mediante biopsia con bisturí clásico, punch y curetaje-biopsia con bisturí eléctrico bajo anestesia local, exceptúen algún caso que las muestra procedía de lesiones extirpadas en quirófano bajo anestesia general. Seguidamente a la obtención del tejido, éste había sido introducido en solución acuosa de formalina al 10% para su fijación en un periodo no superior a 48 horas. La inclusión en parafina se realizó mediante el procesador automático “Autotechnicon”. Este aparato realiza el procesamiento de los tejidos de modo automático introduciendo las piezas secuencialmente en:

- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| 1. Etanol 70º: 2 horas | 7. Etanol 100º: 1 hora |
| 2. Etanol 70º: 2 horas | 8. Tolueno: 2 horas    |
| 3. Etanol 70º: 2 horas | 9. Tolueno: 2 horas    |
| 4. Etanol 96º: 1 hora  | 10. Parafina: 1 hora   |
| 5. Etanol 99º: 1 hora  | 11. Parafina: 1 hora   |
| 6. Etanol 99º: 1 hora  |                        |

El proceso finaliza mediante la introducción del tejido en parafina líquida dentro de un molde. Posteriormente, una vez que el bloque adquiere consistencia sólida, se puede proceder al corte de las secciones.

## **SECCIONES ESTUDIADAS**

Se obtuvo un listado informático de todos aquellos pacientes con diagnóstico codificado de Carcinoma Basocelular y Espinocelular entre 2009 y 2010, procedentes del archivo histopatológico de Dpt. de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología del Hospital Clínico “Lozano Blesa” de Zaragoza.

Se revisaron las preparaciones hasta seleccionar 35 CCB y 42 CCEE, que tuviesen tamaño y calidad suficientes que permitiesen realizar 4 cortes de cada pieza y su posterior tinción con los marcadores.

### **MATERIAL DE LABORATORIO**

- |                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| -Parafinador automático          | -Canastillas de trasiego.         |
| Autotechnicon e.m.Myr.           | -Canastillas de trasiego para las |
| -Refrigerador para conservar los | coloraciones.                     |
| reactivos.                       | -Portaobjetos y cubreobjetos.     |
| -Microtomo rotatorio HM 325.     | -Pipetas.                         |
| -Cubeta térmica, marca E.M.Myr.  | -Probetas graduadas.              |
| -Hornillo calentador.            | -Papel de filtro.                 |
| -Balanza de precisión Cobos,     | -Guantes desechables de látex.    |
| modelo M-150.                    | -Mascarillas.                     |
| -Termómetro.                     | -Papel de filtro.                 |
| -Cronómetro.                     |                                   |

### **MATERIAL ESPECÍFICO PARA LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

- Esterilizador de biberones (Prenatal).
- Cámara húmeda de vidrio para realizar la incubación de anticuerpos.
- Cámara húmeda oscura para preservar la exposición a la luz durante el proceso de revelado.
- Micropipeta para realizar la dilución de los anticuerpo.
- Dako Autostainer





Fig.4. Dako Autostainer. Sistema que está diseñado para automatizar los métodos manuales de tinción utilizados de la forma rutinaria en inmunohistoquímica y histoquímica.

## MATERIAL PARA VALORAR LOS RESULTADOS OBTENIDOS

- Microscopio óptico binocular (Zeiss 473356).
- Microscopio óptico Axioskop 40 Zeiss
- Gratícula de Chalkey
- Cámara para microscopía de alta velocidad Axiocam ERc5s Zeiss
- Soporte informático:
  - Ordenador Mac Os 1,5 pulgadas: 2,5GHz. Core i5 de Intel con cuatro núcleos a 2,5 GHz
  - Ordenador HP L1950

## REACTIVOS UTILIZADOS

### ANTICUERPOS

#### **ANTI CD 31**

Sinónimos: PECAM-1 (molécula 1 de adhesión entre células endoteliales y plaquetas).

El CD 31 es una proteína transmembrana monocatenaria tipo 1 con una masa molecular aproximada de 135 kD, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

La CD 31 se une tanto de manera hemofílica como heterofílica. Entre los ligandos heterofílicos se encuentran los glucosaminglicanos de heparan sulfato, la heparina y la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . La CD31 participa en las interacciones adhesivas entre las células endoteliales adyacentes así como entre los leucocitos y las células endoteliales.

La CD31 se expresa en todo el endotelio continuo, como el de arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales.

Anticuerpo monoclonal de ratón listo para usar, suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizante y 0.015 mol/L de azida de sodio. (Dako Denmark)

#### **ANTI CD 105**

Sinónimos: GP 120 o Endogлина

La endogлина es una proteína transmembrana tipo I de 95 kD que se expresa altamente en las células endoteliales vasculares humanas. Se ha demostrado la regulación por aumento de la expresión de la endogлина en células proliferativas y en la vasculatura tumoral, lo que sugiere que es un marcador de las células endoteliales asociado a proliferación.

El anticuerpo anti-endogлина, SN6h, es un anticuerpo monoclonal murinosuministrado de forma líquida como sobrenadante de cultivo de tejido (con suero bovino fetal), dializado con tampón Tris- HCl 0.05 mol/L, pH 7,2 y ázida sódica 0,015 mol/L. Contiene proteína estabilizante.(Dako Denmark).

## **B- MÉTODO**

### **REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA**

Se ha realizado la búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed con el objetivo de identificar todos los artículos relevantes publicados en inglés, hasta la fecha de realización de la revisión (Mayo 2012) para angiogénesis en CBC y CEC. La estrategia de búsqueda empleada fue "Carcinoma, Basal Cell" [Mesh]

AND "Carcinoma, Squamous Cell"[Mesh] AND("Neovascularization, Pathologic" [Mesh] OR "Microvessels" [Mesh]).

La búsqueda inicial dio como resultado el número total de 9 publicaciones sobre angiogénesis en cáncer cutáneo no melanoma. Esta búsqueda fue ampliada mediante la función ofrecida por PubMed de 'related articles' (artículos relacionados), así como se han revisado las listas de las referencias bibliográficas de los artículos relevantes con el objetivo de identificar aquellos artículos que no han sido capturados mediante la búsqueda computarizada. Sólo se han incluido aquellos estudios realizados en muestras de CBC y CEC en humanos y en los que se ha empleado alguna de las técnicas de cuantificación de angiogénesis basada en inmunohistoquímica. Asimismo, para incluir en la revisión, los artículos tenían que ofrecer información completa y clara sobre los anticuerpos, metodología seguida para la realización de las tinciones y también a la hora de interpretación de los resultados.

Finalmente, se han incluido en la revisión 4 artículos sobre angiogénesis en Carcinomas Basocelulares y Espinocelulares basados en técnicas inmunohistoquímicas.

## SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La selección se realizó de manera aleatoria entre los CBC y CEC. Esta selección se hizo de modo retrospectivo entre los bloques existentes en el archivo del laboratorio en el momento del estudio.

### A- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Lesiones con diagnóstico histológico de Carcinoma Basocelular, extirpados o biopsiados en el Hospital Clínico "Lozano Blesa" de Zaragoza.
- Lesiones con diagnóstico histológico de Carcinoma Espinocelular, extirpados o biopsiados en el Hospital Clínico "Lozano Blesa" de Zaragoza.

### B- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras no valorables (preparaciones en las que no es posible un buen análisis):

- Borde libre tumoral muy escaso

- Preparaciones muy artefactas
- Aquellas que no tengan un tamaño suficiente

## SELECCIÓN DE ANTICUERPOS Y TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Los anticuerpos se han seleccionado en base a la revisión bibliográfica ,seleccionando un anticuerpo panendotelial (CD 31) y un anticuerpo específico de las células endoteliales en proliferación (CD 105).

## METODOLOGÍA PARA LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Se extraen los bloques de tejido del archivo. Se realizan 4 cortes del tejido de 3-4 micras de grosor utilizando el microtomo, posteriormente se toma el corte con agujas histológicas y se colocan en el baño de flotación hasta que los cortes queden completamente estirados y sin burbujas. Se recoge con el porta objetos el corte y se colocan en gradillas La sección de los bloques se realizó con un espesor de 3 micras mediante el microtomo rotatorio, posteriormente se introducían en un recipiente con agua a 37° C para que flotasen en la superficie, se elongaran en toda su amplitud y poder montarlos en el portaobjetos ya gelatinados previamente. La gelatinización de los portaobjetos se obtuvo mediante la inmersión de los mismos en una solución obtenida mediante calentamiento a 40° C de 100 ml. de agua destilada, a la que se le había añadido: 0,50 gramos de gelatina en primer lugar y posteriormente 0,40 gramos de alumbre de cromo. Tras el proceso de inmersión de los portaobjetos, éstos se dejaban secar en una rejilla en posición vertical.
2. Se generan las etiquetas con el número nuevo asignado al caso. La etiqueta señala: número de caso, número de biopsia, anticuerpo y clon, así como las iniciales del doctorando. Las etiquetas se orientan y se pegan en la zona esmerilada procurando que quede centrada y alineada con los bordes. El resto de la tinción se ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica.

3. Se desparafinan los cortes en dos baños de Toluol durante 3 minutos cada uno.
4. Se rehidratan los cortes siguiendo los pasos siguientes:
  - a. 2 baños de Isopropanol-Alcohol 100% por 3 minutos cada uno;
  - b. Un baño de Metanol durante 5 minutos y, por último
  - c. Baño de agua destilada durante 10 minutos.
5. Recuperación antigénica en solución buffer de citrato. Durante la fijación de tejido y en los métodos post-inclusión, muchos epítomos pueden ser enmascarados, lo que daría lugar a un resultado débil o falso negativo en la detección de algunas proteínas mediante técnicas de inmunohistoquímica. La solución buffer de citrato rompe los enlaces cruzados entre proteínas, desenmascarando los antígenos y los epítomos en los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, lo que incrementa la intensidad de tinción de los anticuerpos.
  - a. Se calienta la solución buffer de citrato hasta 95-100° en baño de vapor;
  - b. Se colocan los cortes en el portaobjetos y éste se introduce en el recipiente con solución buffer de Citrato, donde se incuba durante 30 minutos.
  - c. Una vez transcurrido este tiempo, se apaga el baño de vapor de agua, se extrae el recipiente de tinción y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
  - d. Se realiza lavado de los cortes en buffer de lavado (Wash Bufer RTU).
6. Inhibición de la Peroxidasa endógena. Dado que el anticuerpo secundario que utilizaremos está conjugado con peroxidasa (HRP), realizamos bloqueo de esta para evitar señal inespecífica. Para ello se incuban los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. (Utilizaremos Peroxidase Blocking Reagent Ready-to-Use de Dako Citomation).
7. Lavado durante 3 min con buffer de lavado.

8. 1 corte se incubaba con el anticuerpo nº1: CD 31 (Dako) en dilución 1/20, a temperatura entre 2 y 8 °C minutos. El anticuerpo se une a su antígeno específico allí donde esté presente. El otro corte se incubaba con el anticuerpo nº 2: CD 105 (Dako) en dilución 1/2000. Los otros dos cortes se guardaron para realizar una nueva tinción en los casos negativos.
9. Lavado con buffer de lavado durante 3 minutos.
10. A continuación, los cortes se incubaban con reactivo de visualización (env k4061) a temperatura ambiente durante 30 minutos. También se conoce con el nombre de anticuerpo secundario, y en este caso, está unido covalentemente al enzima peroxidasa. Este paso permite amplificar el resultado de la reacción, ya que varias moléculas del anticuerpo secundario pueden unirse a cada molécula del anticuerpo primario, aportando, por tanto, una mayor intensidad de tinción.
11. Se realizan 2 lavados de 3 minutos cada uno con buffer de lavado.
12. El producto de reacción de peroxidasa es revelado utilizando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB), que al oxidarse, forma un producto marrón insoluble (cuya precipitación interpretaremos como positividad de la tinción).
13. Se realizan 4 lavados de 3 minutos cada uno con buffer de lavado.
14. Contratinción con hematoxilina: colocamos los cortes en un portaobjetos y lo sumergimos en hematoxilina durante 1 minuto.
15. Transcurrido este tiempo, realizamos lavado abundante con agua destilada.
16. Montaje de las preparaciones: colocamos el portaobjetos con el corte de tejido sobre la mesa y aplicamos el gel que nos permitirá fijar el cubreobjetos (Dako Glycergel Mounting Medium).

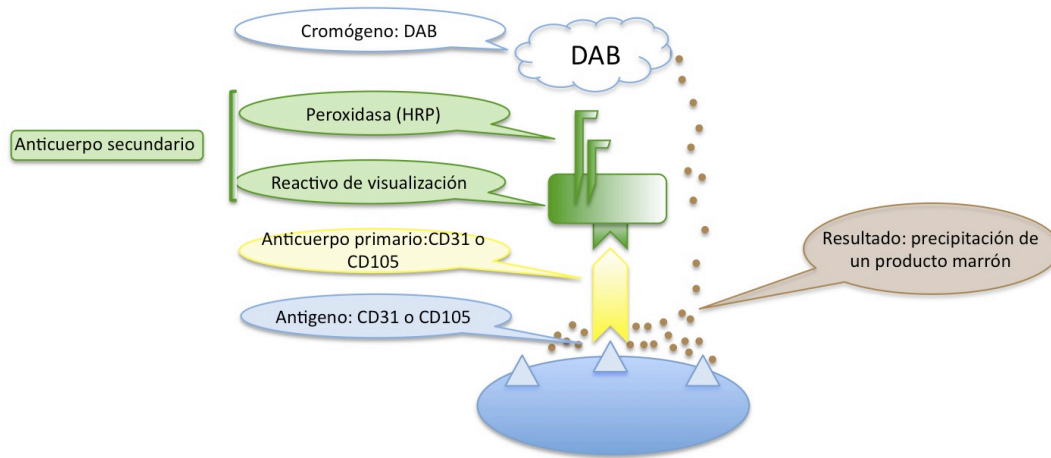


Fig.5 Esquema sobre la tinción inmunohistoquímica

## VALORACIÓN DE LAS TINCIONES

Se eligió la técnica de cuantificación de Chalkley counting para valorar la angiogénesis. El motivo por el cual se eligió esta técnica es porque en el segundo consenso internacional de cuantificación de angiogénesis en tumores sólidos esta técnica fue considerada como técnica de elección.

Se examina la preparación a bajo aumento (x5) para seleccionar los puntos con mayor densidad de vasos sanguíneos. Posteriormente, esos puntos se examinan a mayor aumento (x20) y se cuantifican aquellos puntos de la grátula de Chalkley que se superponen sobre los vasos sanguíneos o células individuales positivas para el endotelio vascular.

En cada caso, se seleccionan las tres puntuaciones mas altas y se calcula la media aritmética de las mismas. Este último número es el que se empleará para el análisis estadístico de los datos.

## CREACIÓN DE BASE DE DATOS.

Se han revisado las historias clínicas de los pacientes (previo consentimiento de Dirección médica del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”) y se han recogido los diferentes parámetros:

- Número de Historia Clínica
- Número de Biopsia
- Fecha de nacimiento

- Fecha de diagnóstico
- Tipo de tumor
- Tamaño
- Localización
- Recidiva
- Metástasis
- Fecha de recidiva y de metástasis



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- Todas las operaciones estadísticas se han llevado a cabo con IBM SPSS versión 19 IL, USA. (licencia de la Universidad Autónoma de Barcelona)
- Las diferencias se han calculado utilizando el test Chi cuadrado para las variables discretas y el test T de student para las variables continuas ( los valores se expresan como valores medios y su intervalo de confianza al 95%).
- Todos los los gráficos se han realizado con el editor de gráficos del SPSS.

# RESULTADOS

---

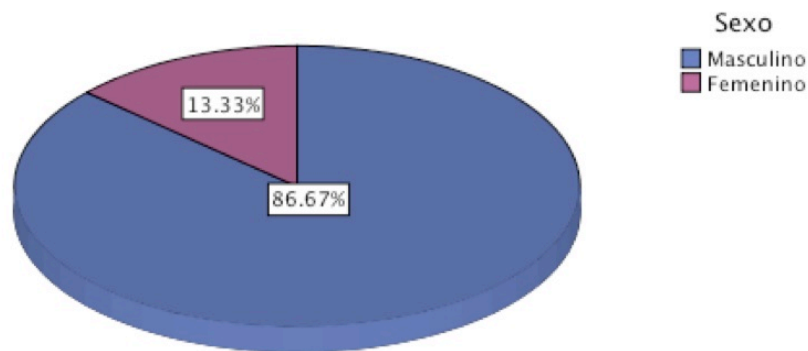
## RESULTADOS

### A. RESULTADOS DEL ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

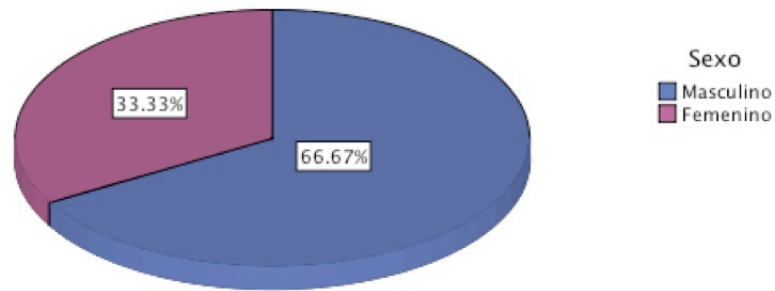
1. De los pacientes incluidos en el estudio, 75,36 % fueron hombres y 24,64 % mujeres.



2. Distribución por sexo de los pacientes diagnosticados de Epitelioma Basocelular . El sexo predominante es en los varones.



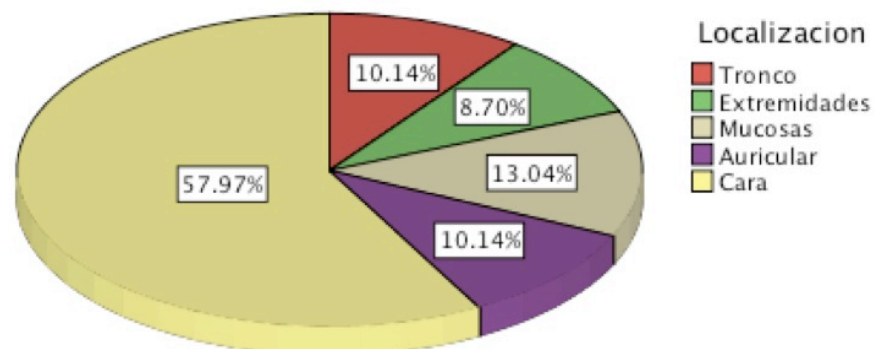
3. Distribución por sexos de los pacientes diagnosticados de Epitelioma Espinocelular. Al igual que en el CBC es mas frecuente en varones, aunque el porcentaje no es tan alto.



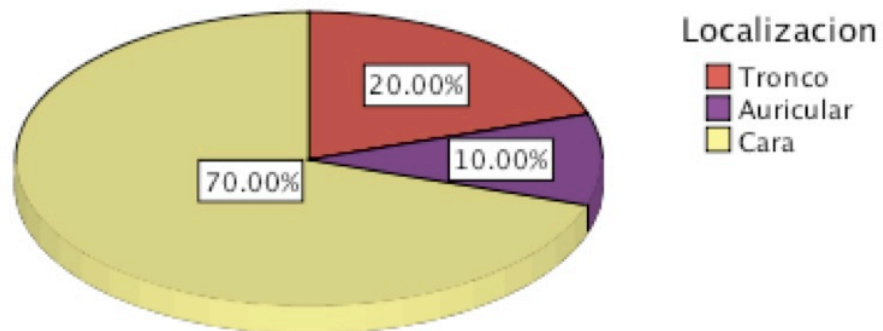
4. La edad media de la muestra estudiada fue de 69 años en Carcinomas Basocelulares y 79 años para Carcinomas Espinocelulares.

Estadísticos			Estadísticos		
Edad_Media de CBC			Edad_Media de CEC		
N	Válidos	29	N	Válidos	38
	Perdidos	1		Perdidos	1
Media		69.4313	Media		78.7751
Desv. típ.		17.13107	Desv. típ.		15.11217
Varianza		293.474	Mínimo		-.56
Mínimo		.00	Máximo		94.11
Máximo		87.03			

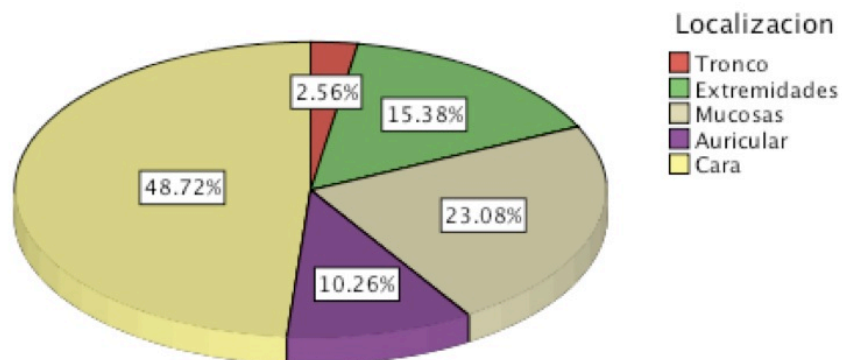
5. La localización del tumor global. Se observa que la localización mas frecuente es la cara seguida por la región auricular ( esta localización se separó de la cara al igual que la mucosa labial ya que se considera de alto riesgo en CEC<sup>9</sup>) y el tronco.



6. Distribución de todas las localizaciones de las muestras incluidas en el estudio de CBC. En el gráfico se aprecia que la cara es la localización mas frecuente.



7. La localización más frecuente en Carcinomas Espinocelulares es la cara, seguido por mucosas.



8. El tamaño tumoral medio en Carcinomas Basocelulares es de 1,3 y de CEC es de 2. Se observa que el Carcinoma Espinocelular al diagnóstico es de mayor tamaño.

## B. RESULTADOS DEL ESTUDIO

### INMUNOHISTOQUÍMICO

1. Las tinciones han sido positivas y evaluables en 31 casos de Carcinoma Basocelular y 39 casos de Carcinoma Espinocelular.
2. La media de los vasos sanguíneos teñidos con CD 31 y cuantificados mediante el método de Chalkley counting fue de 5.9 en Carcinoma Basocelular (95%CI:4.8-7.0) y 7,76 en Carcinoma Espinocelular (95%CI:5.5-10.02), resultando la diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ).
3. La media de los vasos sanguíneos teñidos con CD 105 y cuantificados mediante el método de Chalkley counting fue de 5,2 (95%CI:4.0-6.4) en Carcinoma Basocelular y 8,4 (95%CI:6.7-10.1) en Carcinoma Espinocelular, resultando la diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ).

#### Análisis estadístico.

Utilizaremos la prueba t de Student para muestras independientes. Para comprobar si se cumple la condición de igualdad de varianzas, emplearemos la prueba de Levene.

Definición de casos utilizados: los estadísticos de cada análisis se basan en los casos que no tienen datos perdidos ni quedan fuera de rango de cualquiera de las variables del análisis.

4. Comparación de medias de MVD-CD31 entre Epitelioma Basocelular y Carcinoma Espinocelular.

Prueba de muestras independientes					
		Prueba T para la igualdad de medias			
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias Error típ. de la diferencia
CD31	Se han asumido varianzas iguales	-4.174	54	.000	-2.0254282 .4852919
	No se han asumido varianzas iguales	-4.662	49.514	.000	-2.0254282 .4344387

Prueba de muestras independientes			
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	
		F	Sig.
CD31	Se han asumido varianzas iguales	4.904	.031
	No se han asumido varianzas iguales		

5. Comparación de MVD valorado con CD105 entre Epitelioma Basocelular y Carcinoma Espinocelular.

Prueba de muestras independientes					
		Prueba T para la igualdad de medias			
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias Error típ. de la diferencia
CD105	Se han asumido varianzas iguales	-8.105	62	.000	-3.2007937 .3949235
	No se han asumido varianzas iguales	-8.471	61.329	.000	-3.2007937 .3778656

6. La diferencia entre la MVD en BCC valorada con CD 31 no fue estadísticamente significativa en comparación con MVD cuantificada con CD 105. ( $p > 0.05$ ).
7. La diferencia entre la MVD en SCC valorada con CD 31 tampoco fue estadísticamente significativa en comparación con MVD cuantificada con CD 105. ( $p > 0.05$ ).
8. En algunos casos de SCC se encontraron vasos sanguíneos en el interior de la masa tumoral, mientras que no se observaron vellosidades sanguíneas intratumorales en el caso de los BCC. ( $p < 0.05$ ).

9. Histológicamente el número de vasos es mayor en aquellos tumores que han dado metástasis o recidiva, pero la diferencia no alcanza la significación estadística.
10. Se ha realizado el análisis estadístico para comprobar si hay diferencia de la densidad de vasos entre hombres y mujeres, así como entre diferentes localizaciones, tanto en CBC como en CEC. No hay diferencias en ninguno de los grupos ( $p > 0.05$ ).
11. Patrón de angiogénesis. A diferencia de otros tumores sólidos, no se encontró el patrón de vascularización en “hot spot” descrito en varios tipos de tumores sólidos, no se ha objetivado en ninguno de los dos tipos de tumores estudiados. En el caso de CBC sólo se han encontrado vasos en el estroma peritumoral (Fig.6), mientras que en CEC se observaron vasos sanguíneos tanto en el interior de la masa tumoral (intratumorales) como en el exterior (peritumoral) (Fig.7,8 y 9).



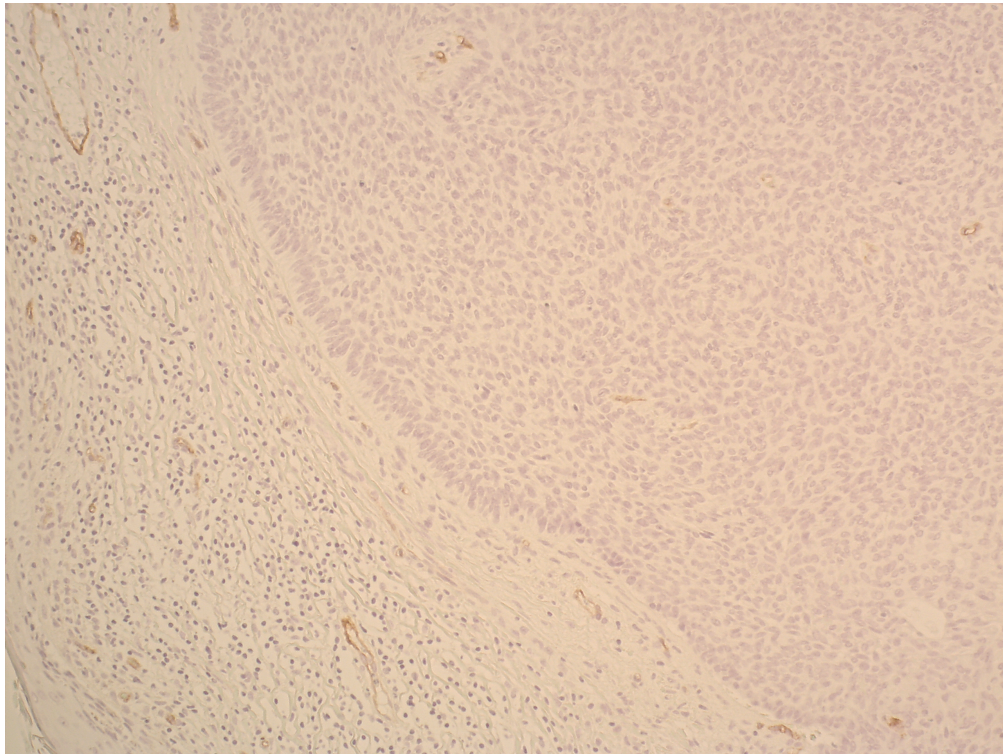


Fig.6 Imagen inmunohistoquímica de CBC teñido con CD 105. Donde se observan los vasos peritumorales. No se aprecian vasos dentro de la masa tumoral.

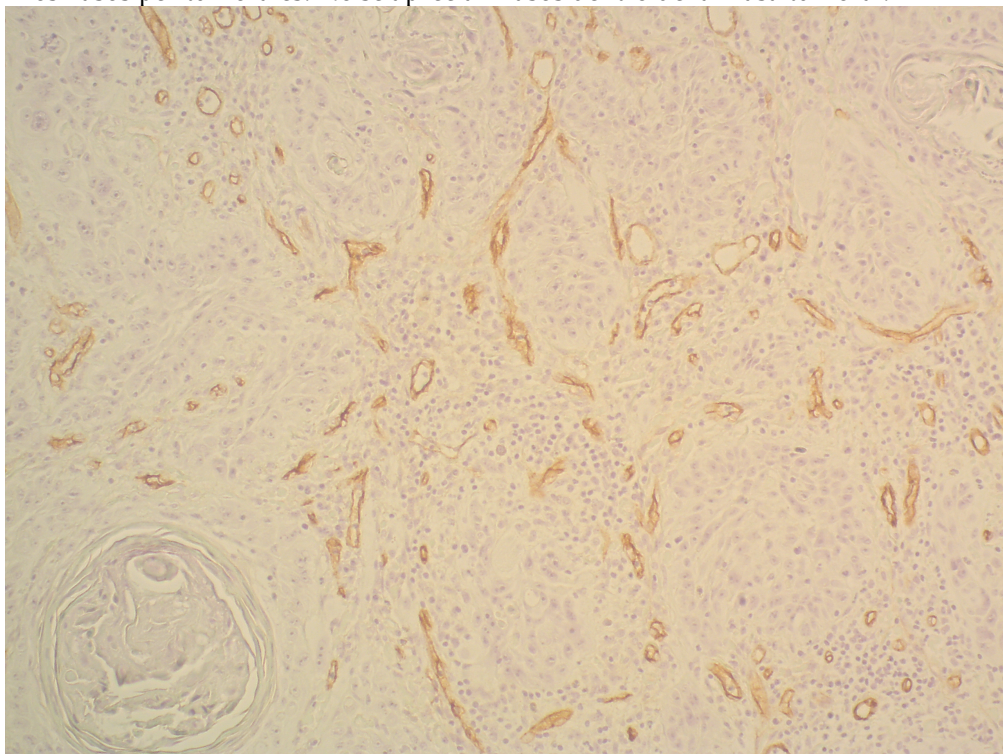


Fig.7 Imagen inmunohistoquímica de CEC teñido con CD 105. Donde se observan los vasos peritumorales e intratumorales.



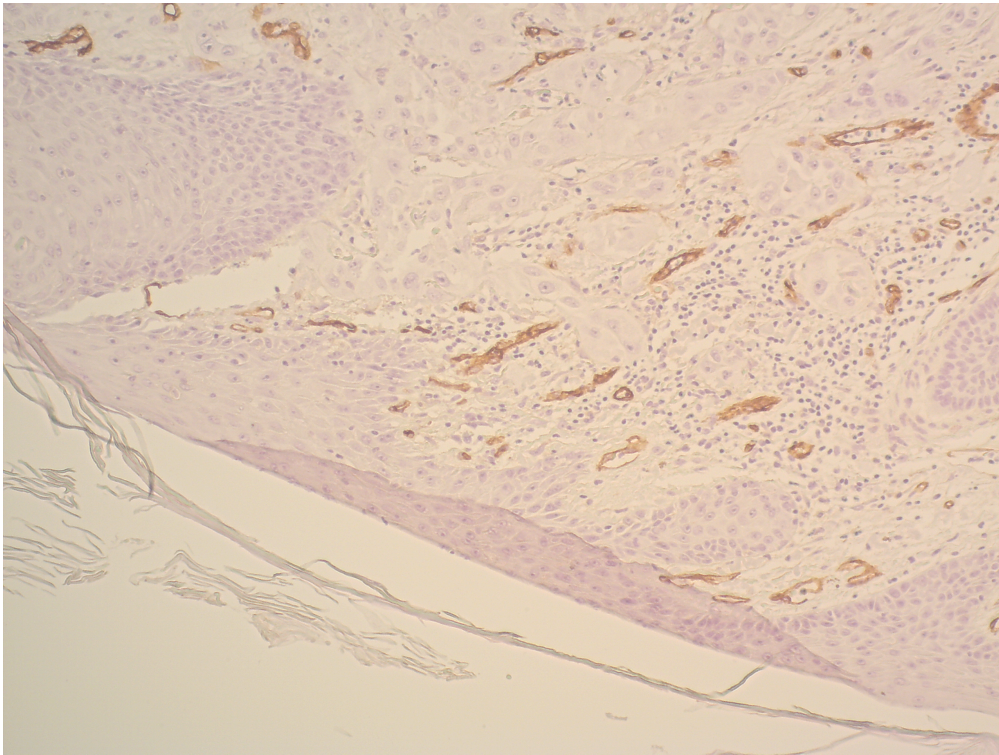


Fig.8 Imagen histológica de CEC teñido con CD 105 (marcador de neoangiogenesis)

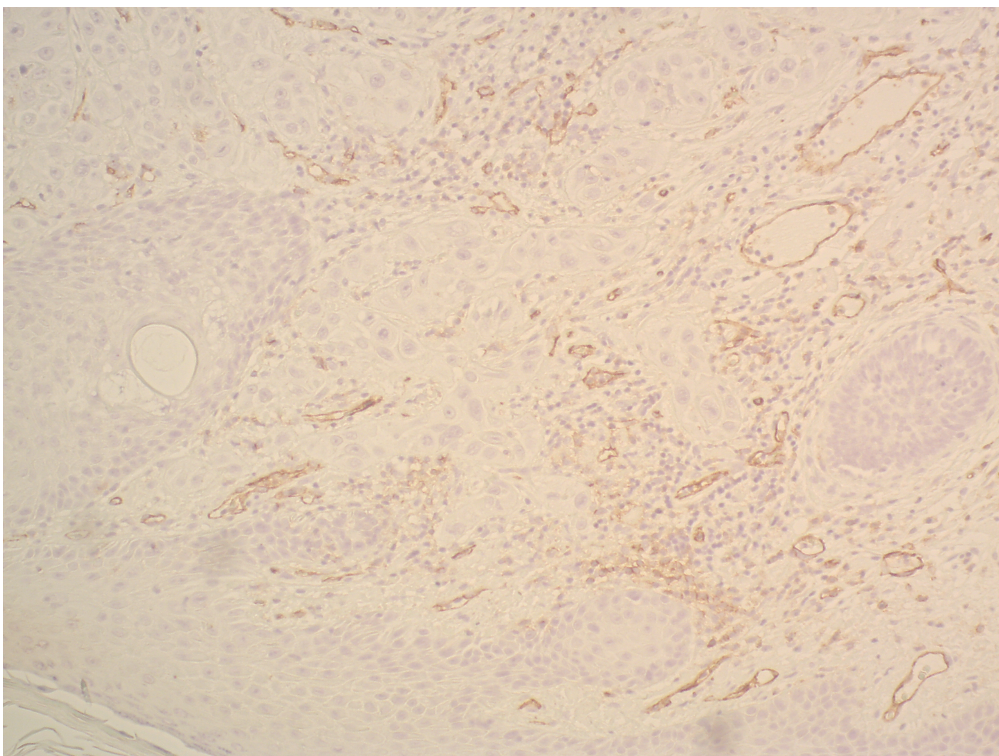


Fig.9 Imagen histológica de CEC teñido con CD 31 (marcador panendotelial)

## DISCUSIÓN

---

## DISCUSIÓN

Presentamos los resultados del estudio en el que el objetivo principal era comparar el diferente potencial angiogénico y su posible relación con el diferente comportamiento clínico en el cáncer de piel no melanoma.

Nuestro estudio tiene una serie de limitaciones:

**El tamaño de muestra limitado**, se debe al coste elevado de los reactivos que utilizaremos en nuestro estudio y la falta de financiación del estudio.

**Limitaciones técnicas.** En ocasiones existen limitaciones técnicas que dificultan la valoración de la inmunohistoquímica. Entre las más importantes están los problemas de fijación del tejido, el anticuerpo utilizado o la pérdida de antigenicidad en cortes almacenados más de 24 horas antes de la realización de la técnica. No solo es importante conocer la especificidad del anticuerpo, sino que se deben recordar los artefactos que pueden aparecer en estas preparaciones, como la tinción inespecífica de los márgenes del corte de tejido (artefacto del borde) o en zonas de necrosis, la difusión o capacitación del antígeno por los tejidos o células adyacentes y la reactividad cruzada de algunos anticuerpos.

**Valoración de las muestras teñidas.** No es posible cuantificar exactamente el número de células teñidas, y además, en un mismo tumor, se podría observar distintas áreas con mayor o menor intensidad de tinción.

**Seguimiento de los pacientes.** Dado que la edad media de los pacientes con carcinoma Basocelular y Espinocelular es elevada, en muchos de los casos es imposible realizar un seguimiento longitudinal de la evolución clínica post-quirúrgica (muchos de los pacientes presentan co-morbilidades importantes, y en el caso de fallecimiento, será complicado identificar la causa del mismo, y que en la mayoría de los casos no estará relacionada con la neoplasia cutánea).

**Poder estadístico del estudio.** Una de las limitaciones importantes de nuestro estudio es el poder estadístico del trabajo, condicionado por el tamaño de la muestra (una muestra mayor tendría mayor potencia estadística). La repercusión más importante de un tamaño muestral limitado, radica en que al interpretar los resultados en que no encontramos significación estadística, no se puede descartar que esto no sea debido al tamaño de la muestra. Esta situación, no afectaría a los resultados positivos o estadísticamente significativos.

Muchos estudios han documentado que el crecimiento tumoral y las metástasis requieren de un aporte persistente de vascularización <sup>58</sup>.

La hipótesis general número uno (“la expresión de los marcadores de angiogénesis será diferente en Carcinomas Espinocelulares frente a Basocelulares) se ha confirmado en su totalidad, tanto para el marcador panendotelial CD 31 (hipótesis operativa 1.1) como para el marcador inmunohistoquímico de neoangiogénesis CD 105 (hipótesis operativa 1.2). Esta diferencia en la densidad microvascular pueden explicar, al menos en parte, el diferente comportamiento biológico de estos tumores.

La hipótesis Operativa 2.1: “La mayor expresión de CD 31 y CD 105, se relaciona con la mayor MVD (Microvessel density); y esta, a su vez, se relaciona con la mayor agresividad del tumor”. La mayor MVD es más alto en CEC frente a CBC, los tumores espinocelulares son mas agresivos que los basocelulares.

Desde este punto de vista es cierto. Pero dentro de cada grupo de tumor, no se ha comprobado que los que han metastatizado tienen mayor número de vasos. Pero la explicación más probable es que el número de metástasis es muy pequeño.

En los estudios previos se ha comprobado que CD 105 es mas bajo estadísticamente que CD 31. Baptistella y colaboradores <sup>49</sup> en el 2011 observaron que los marcadores panendoteliales no son diferentes en los diferentes estadios de CEC, sin embargo CD 105 se correlacionó con la progresión del Carcinoma Espinocelular. En nuestro estudio no se observado la diferencia que cabría esperar según la bibliografía, en nuestro caso la progresión no se correlacionó con ningún de los dos marcadores esto puede ser como consecuencia de que CD 105 no sea específico de células endoteliales en formación o por falta de tamaño muestral y por lo tanto el bajo número de metástasis.

No hemos encontrado diferencias en MVD entre hombres y mujeres, ni tampoco entre diferentes localizaciones, lo que sugiere que la MVD es una factor intrínseco del tumor.

Sobre el patrón de angiogénesis, la ausencia de vasos sanguíneos en el cuerpo de CBC podría ser una explicación a su tendencia a ulcerarse y que estos vasos

se sitúen en el estroma peritumoral podría también explicar las telangiectasias que esta neoplasia presenta en superficie. Straume <sup>59</sup> demostró que un incremento de MVD está asociado significativamente con la ulceración, el aumento del diámetro y el descenso en la supervivencia. La ausencia del potencial metastático de BCC podría deberse a la ausencia de vasos y por el otro lado la presencia de vasos intratumorales le confiere capacidad invasiva y metastásica. El que no observen vasos intratumorales puede explicarse como en otros tumores en los que el estroma angiogénico se produce, pero debe haber una zona entre la angiogénesis y el borde de ataque del tumor donde los vasos sanguíneos se someten a regresión completa; se desconoce aquellos factores antiangiogénicos que interfieren.

En cuanto a las variables clínico-demográficas:

La edad al diagnóstico es de 68 en CBC y de 79 en CEC, el que aparezca en edades tardías se debe en parte a la relación con un daño solar acumulado, inmunosupresión y a la mayor esperanza de vida.

En cuanto al sexo hemos comprobado que es más frecuente en varones tanto CBC y CEC, como demuestran otros estudios. La explicación puede deberse a la realización de trabajos por parte de los varones al aire tales como agricultura, construcción.

La localización más frecuente es la cara probablemente sea consecuencia de la combinación de varios factores, como aumento de la exposición al sol o a los rayos UVA, mayor participación de la población en actividades que se realizan al aire libre, cambios en el tipo de vestimenta.

El tamaño al diagnóstico es mayor en CEC frente a CBC, ya que tiene un crecimiento más rápido. CBC pueden permanecer muchos años y seguir una evolución más crónica hasta que el paciente se lo observa.

## CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

1. Se observa que la densidad microvascular en Carcinomas Basocelulares es menor que en Carcinomas Espinocelulares, lo cual puede explicar en parte el lento crecimiento de Carcinomas Basocelulares y el descenso del potencial metastásico.
2. En la literatura CD 105 está considerado como un marcador específico de neoangiogénesis, pero en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas con CD 31, marcador panendotelial.
3. No se aprecian puntos calientes en ninguno de los dos tumores a diferencia de otros tumores sólidos.
4. Se observa un patrón histológico de angiogénesis en Carcinomas Basocelulares con vasos en la periferia tumoral, a diferencia de los Carcinomas Escamosos que se localizan tanto peritumorales e intratumorales.
5. En ambos la localización mas frecuente es la cara, siendo mas predominantes en el sexo masculino.
6. El tamaño tumoral al diagnóstico es mayor en CEC, lo que explica el crecimiento mas lento y menos agresivo de CBC.
7. Son necesarios más estudios con mayor tamaño muestral y seguimiento prospectivo de los paciente.



## BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Malone JP, Fedok FG, Belchis DA, Maloney ME. Basal cell carcinoma metastatic to the parotid: report a new case and review of the literature. *Ear nose Throat J* 2000;79:511-5,518-9.
2. Buendía A, Rodríguez M, Sánchez MJ, Ortega R, Serrano S, Martínez C. El cáncer en la provincia de Granada. *Actas Dermosifiliograf* 2000;91:435-41.
3. Roewert-Hubert J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:47-51.
4. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005;353:2262-9.
5. Giménez Arnau AM, Pla Ferrer C. Carcinoma basocelular. Tipos clínicos y diagnóstico diferencial. *Actualidad dermatológica* 2008; 47(3):165-76.
6. García-Zuazaga J, Olbricht SM. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Adv Dermatol.* 2008;24:33--57.
7. Aceituno-Madera P, Buendia-Eisman A, Arias-Santiago S, Serrano Ortega S. Evolución de la incidencia del cáncer de piel en el período 1978-2002. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101: 39--46.
8. Oddone N, Morgan GJ, Palme CE, Perera L, Shannon J, Wong E, et al. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: the Immunosuppression, Treatment Extra-nodal spread, and Margin status (ITEM) prognostic score to predict outcome and the need to improve survival. *Cancer.* 2009;115:1883--91.
9. Nuño-González A, et al. Carcinoma epidermoide cutáneo de alto riesgo. *Actas Dermosifiliogr.* 2012. doi:10.1016/j.ad.2011.09.005
10. Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification. Part one. *J Cutan Pathol.* 2006;33:191206.

11. Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification. Part two. J Cutan Pathol. 2006;33:26179.
12. Plivot X. ESMO Minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow up of squamous cell carcinoma of the head and neck. Ann Oncol 2003; 14:1014-1015.
13. Stasko T, Brown MD, Carucci JA et al. Guidelines for the management of squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. Dermatol Surg 2004; 30: 642-650.
14. Demirkesen C, Büyükpınarbasili N, Ramazanoglu R, Oguz O, Molinas N, Gültekin K. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of Vascular Endothelial Growth Factor and basic Fibroblastic Growth Factor. Patology 2006; 38:132-137.
15. Yerebakan O, Akif M, Kiliçarslan A, Yilimaz E. Pronostic value of Ki-67, CD 31 and Epidermal Growth Factor Receptor expression in Basal Cell Carcinoma. The journal of Dermatology 2003; 30:33-41.
16. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. Semin Oncol 2007; 34:555-565.
17. Weidner N, Sample JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlations in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324:1-8.
18. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. Lancet ii: 1236-1240.
19. Sandison JC. Observations on growth of blood vessels as seen in transparent chamber introduced into rabbit's ear. Am J Anat 1928; 41:475-496.
20. Clark ER, Hitshler WJ, Kirby-Smith HT et al. General observations on the ingrowth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit's

ear, and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of months. *Anat Rec* 1931;50:129-167.

21. Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chambers. *Am J Roentg* 1939; 32:891-899

22. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6:73-85.

23. Rondoni P. Il cancro. Casa Editrice Ambrosiana, Milano. 1946)

24. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997, 151:1417-1423.

25. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. Liver Metastasis from colorectal adenocarcinoma grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 2001;195:336-342.

26. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003;18:65-70)

27. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, Feng D, Eckelhoefer IA, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol* 2001;158:1145-1160.

28. Wesseling P, Vandersteenhoven JJ, Downey BT, Ruiter DJ, Burger PC. A light microscopic and immunohistochemical study of formalin fixed, routinely processed material. *Acta Neuropathol* 1993;85:508-514.

29. Schiffer D, Bosone I, Dutto A, Di Vito N, Chio A. The prognostic role of vessel productive changes and vessel density in oligodendroglioma. *J Neurooncol* 1999;44:99-107.

30. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Begin LR, Foulkes WD, Akslen LA. Prognostic importance of

glomeruloid Microvascular Proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res* 2002;62: 6808-6811.

31. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572-C579)

32. Maniotis et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in Vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-752.

33. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:411-421.

34. Maniotis et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in Vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-752  
Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumour angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156:361-381)

35. Maniotis et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in Vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-752.

36. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.

37. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943;4:47-53.

38. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38:1564-1579

39. Beliën JAM, Somi S, Jong JS, van Diest PJ, Baak JPA. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52:184-192

40. Hillen F, van de Winkel A, Creyten D, Vermeulen AH, Griffioen AW. Proliferating endothelial cells, but not microvessel density, are a prognostic parameter in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006;16:453-457
41. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for angiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-1393
42. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998;125:1591-1598
43. (revisado en Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumours. *BJ Cancer* 2002;86:1566-1577)
44. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast cancer: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999;59:856-861
45. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 2001;7:3410-3415.
46. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer* 2000; 82: 591-600.
47. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K, et al. CD 34 Microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 705-712.
48. Chin CWS, Foss AJ, Stevens A, Lowe J. Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin carcinomas explain their differences in clinical behaviour. *J Pathol* 2003; 200: 308-313.
49. Baptistella ME, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, de Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma:

- an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics* 2011; 66: 465-468.
50. Laquer V, Hoang V, Nguyen A, Kelly KM. Angiogenesis in cutaneous disease: part II. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61:945-58.
51. Amoroso A, Del Porto F, Di Monaco C, Mnafredini P, Afeltra A. Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1997; 1:17-25.
52. Ria R, Reale A, Castrovilli A, Mangialardi G, Damaco F, Ribatti D, Vacca A. Angiogenesis and progression in human melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010; pp.1-6.
53. Redondo P, Sánchez- Carpintero I, Bauzá A, Idoate M, Solano T, Mihm MC Jr. Immunologic escape and angiogenesis in human malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49:255-263.
54. Lin DC, Du XL, Lang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. *Dis Esophagus* 2009; 22:9-20.
55. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol* 2002; 29:585-589.
56. Kalvankrishna S, Grandis JR. Epidermal Growth Factor Receptor biology in head and neck cancer. *J clin Oncol* 2006; 24:2666-2672.
57. 21. Hong DY, Lee BJ, Lee JC, Choj JS, Wang SG, Ro JH. Expression of VEGF, HGF, IL-6, IL-8, MMP-9, Telomerase in peripheral blood of patients with Head and Neck Squamous cell carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2009; 2:189-19
58. Folkman J, et al. Tumor angiogenesis. *Cancer medicine* 2000; 5:132-152.
59. Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol* 2001; 159: 223-225.

