



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS.**

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO
MORFOMETRICO DE LA ANGIOGENESIS EN LOS
DIFERENTES SUBTIPOS DE EPITELIOMA
BASOCELULAR.**

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Autora: Médica Elisa Alejandra Castelletto.

Dirección de Tesis: Prof. Dra. Gloria Miriam Cónsole.

AÑO 2005

Al amor de mis padres, a mis hijos Bruno
y Manuel, y a mis seres queridos, dondequiera que estén.

A la Profesora Doctora Gloria Cónsole,
por su dedicación y el constante apoyo brindado,
mi más profundo agradecimiento.

Mi agradecimiento a la Ingeniera María Inés Urrutia
por su colaboración en la tarea de estadística
y al Señor Pascual E. Topa técnico inmunohistoquímico
por la colaboración técnica.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	6
I. GENERALIDADES.	
II. SUBTIPOS DE EBC.	
III. DISEMINACIÓN TUMORAL Y ANGIOGÉNESIS.	
IV. FACTORES ANGIOGÉNICOS.	
V. DESARROLLO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN.	
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	34
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
RESUMEN	92

Introducción

I. GENERALIDADES.

El Epitelioma (Carcinoma) Basocelular (EBC) es una neoplasia epitelial maligna de la piel que se localiza con frecuencia en las áreas de exposición solar, siendo el cáncer más común en el ser humano. Junto con el carcinoma epidermoide abarcan el 90 % de los tumores cutáneos malignos con una relación de 5:1 del EBC con respecto a epidermoide

El factor más común involucrado en la patogenia de los cánceres de la piel es la luz ultravioleta, siendo las radiaciones β las más carcinogénicas, y acumulándose en la piel su efecto negativo después de años. Es por ello, que la incidencia del tumor sería mayor en edades avanzadas, fenómeno que ha experimentado variantes en los últimos años debido a las alteraciones en la capa de ozono, la exposición al sol en horarios no recomendados y el uso cada vez más frecuente de las camas solares, con la consiguiente aparición de estos tumores a edades más tempranas. Otros factores predisponentes incluyen altas dosis de rayos X, intoxicación crónica con arsénico a través del agua, inmunodepresión: pacientes con linfoma, transplantados renales, portadores de HIV y anomalías genéticas como albinismo y xeroderma pigmentoso. En todos estos casos el tumor tiene tendencia a aumentar su agresividad.

Es sabido que ante un fenotipo sensible como el de los sujetos rubios de piel clara, se observa una mayor predisposición para desarrollar un EBC, siendo raro en personas de raza negra. Las formas con carga genética como el síndrome de nevo basocelular son inusuales y exteriorizan los tumores en edades más tempranas (Cueto y col., 1975); de tal modo, que su presentación en niños muestra frecuente asociación con dicho síndrome.

La relación causa-efecto (radiación solar / EBC) justifica la ubicación preferencial del EBC en áreas expuestas: en un 80% se presenta en la zona de cabeza y cuello, mientras que en un 15% se detecta en hombros, espalda y pecho. Hay publicaciones donde se refiere su ubicación en áreas inusuales: pezón, región perianal, vulva, región inguinal, piernas, palmas y plantas. Otros sitios raros de presentación incluyen: rinofima, cicatrices por quemaduras, leishmaniasis y cicatrices de vacunas. En nuestra área geográfica, el fenotipo predominante es susceptible a la acción de las radiaciones ultravioletas, siendo el EBC un tumor de presentación frecuente en la consulta médica (Compendio del Registro Provincial del Cáncer, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, 1999).

La presentación clínica puede ser bastante variable: papulonodular, de aspecto translúcido y perlado, ulcerado, como placa indurada en un grado variable, placa eritematosa con telangiectasia visible, o nódulos parcialmente quísticos. También hay

formas gigantes de hasta 20 cm y mutilantes, sobre todo en cara. Aproximadamente un 2% pueden ser pigmentados, planteando el diagnóstico diferencial clínico con otras entidades como por ejemplo melanoma y queratosis seborreica pigmentada.

II. SUBTIPOS DE EBC.

El EBC muestra una *amplia variabilidad citomorfológica*; no obstante se refieren a características comúnmente observadas, con algún predominio alternante según el subtipo considerado, a saber:

- 1-Agregados de células basaloides formando estructuras de distinto tamaño y forma.
- 2-Células de núcleos algo elongados dispuestos en la periferia de los agregados conformando dibujos en empalizada.
- 3-Estroma con abundantes mucopolisacáridos o en otros casos, desmoplasia significativa.
- 4-Clivaje periepitelial debido a la acumulación de mucopolisacáridos.
- 5-Cantidad variable de infiltrado inflamatorio constituido habitualmente por linfocitos T colaboradores.
- 6-En líneas generales, predominio del componente epitelial sobre el estromal.

Las *clasificaciones histopatológicas del EBC* reconocen numerosos subtipos; por ejemplo la emitida por la OMS que acepta las siguientes variedades:

- Carcinoma basocelular superficial.*
- Carcinoma basocelular nodular.*
- Carcinoma basocelular infiltrante.*
- Carcinoma basocelular fibroepitelial (Pinkus).*
- *Carcinoma basoescomoso.*
- Carcinoma basocelular quístico.*
- Carcinoma basocelular adenoide.
- Carcinoma basocelular esclerosante.*
- Carcinoma basocelular infundíbulo quístico.*
- Carcinoma basocelular pigmentado.*
- Misceláneas: con células claras, con células en anillo de sello, con células granulares, pleomórfico, adamantinoide, neuroendocrino y schwanoide.*

Es de notar, que se reconocen variantes sin significación pronóstica (pigmentada) y otra cuya pertenencia fenotípica es aún discutida (WHO Classification of Tumours, Skin Tumours Pathology and Genetics. WHO, 2006).

El EBC muestra en general un curso relativamente benigno, pero algunos casos presentan una conducta más agresiva y

rápidamente infiltrativa o metastásica. En la literatura se ha intentado distinguir patrones agresivos de no agresivos. Staibano y col. (1996), clasifican el EBC en no agresivo (BCC1) y agresivo (BCC2). El primero compuesto por células basaloides y lóbulos con empalizada periférica rodeados por estroma fibroso. El segundo, en cambio, con presencia de pleomorfismo, alto índice mitótico, ausencia de empalizada, estroma hialino y disposición cordonal. Estudios posteriores no reconocen valor pronóstico de conducta biológica al pleomorfismo celular e índice mitótico.

Ionescu y Arida (2006) tratan de separar ambos grupos por medio de la implementación de técnicas inmunohistoquímicas para Ki 67, P53 y Bcl-2, no pudiendo encontrar diferencias entre variantes metastásicas y no agresivas.

Rippey (1996) propone la siguiente clasificación morfológica:

1-Nodular: lóbulos tumorales con empalizada periférica, que incluye al subtipo micronodular (compuesto por nódulos menores de 0,5 mm de diámetro) que tiene tendencia a la recurrencia local.

2-Infiltrativo: compuesto por grupos celulares de distintos tamaños, de patrón infiltrante, con ausencia de empalizada periférica o pobremente desarrollada. Este grupo comprende también el subtipo esclerodermiforme.

3-Superficial aparentemente multifocal: conformado por brotes tumorales en conexión con la epidermis, separados entre sí por tejido malpighiano sano intercalar.

4-Mixto.

5-Fibroepitelioma.

Estos autores postulan que las dos características fundamentales de los tumores recurrentes son el patrón de crecimiento (infiltrativo y superficial multicéntrico) y el margen de sección libre de neoplasia (menor de 0,38 mm).

Es evidente que a los fines prácticos, es conveniente acotar las variantes, y es así que para el presente estudio consideramos los principales subtipos siguientes:

- 1. Superficial o pagetoide:** pequeñas islas de tejido tumoral, que representan algo así como un facsímil de un brote germinal folicular en conexión con la superficie epidérmica, y habitualmente, relegadas a la dermis superficial.
- 2. Lobulado-quístico:** corresponde al 70% de los casos, presentando células tumorales que se disponen en islas o lóbulos de aspecto geográfico, con empalizada periférica.
- 3. Siringoide o Infiltrante:** elongadas ramificaciones tumorales que infiltran el tejido conectivo colindante, siguiendo un patrón reticular, con mucina estromal muchas

veces prominente. Este patrón es bastante infrecuente en forma pura, pudiendo ocurrir con más frecuencia asociado a las formas sólidas.

- 4. Desmoplásico o esclerodermiforme:** pequeñas islas y elongados regueros de células tumorales embebidos en abundante tejido conectivo denso.

III- DISEMINACIÓN TUMORAL Y ANGIOGÉNESIS.

Como se explicó en párrafos anteriores, algunos EBC son de curso benigno mientras que otros tienen marcada agresividad local, y en algunos casos, potencial metastásico (Staibano y col. 1996) . La incidencia reportada es de 0.003 a 0.55%, habiéndose publicado por lo menos 230 casos (Robinson y Dahy, 2003).

Los estudios realizados intentando correlacionar fenotipos más agresivos con la expresión de P53, BCL2 e índice apoptótico, no dieron resultados positivos. Algunos postularon la importancia de la matriz extracelular modulando la incidencia de metástasis (Frede, 2002). La angiogénesis tiene un papel muy importante en el desarrollo tumoral, pudiendo relacionársela con el tamaño, pronóstico y potencial metastásico de los mismos.

Se define como metástasis al fenómeno por el cual algunos tumores pueden diseminarse por el organismo para formar colonias

secundarias que crecen y destruyen órganos distantes. Patogénicamente, la capacidad metastásica es un patrón de conducta celular que resulta de la falla de algunos de los procesos fundamentales que controlan la organización multicelular del organismo. La estructura normal de los tejidos y su función dependen de la localización estricta de diferentes linajes celulares en territorios definidos y regulación estrecha del recambio celular. Las células de una neoplasia pierden sus restricciones básicas y se embarcan en una formación aparentemente desordenada de nuevos tejidos que crecen en sitios ectópicos. Esta actividad estaría coordinada por programas genéticos que normalmente conciernen a procesos fisiológicos, pero que han sido inadecuadamente activados. Es probable que esto se deba no sólo al mal funcionamiento de un gen, sino a alteraciones en un grupo de locus combinados e interactivos. Una hipótesis interesante sería aquella en la cual estos programas serían funcionantes sólo en células blancas sanguíneas migratorias, que siguen pasos recirculatorios específicos (Tarin, 1997).

Casi todos los tumores pueden metastatizar, excepto los tumores de la glia del sistema nervioso central. Esta cualidad habitualmente concuerda con el tamaño tumoral, tasa de crecimiento y agresividad biológica, aunque hay tumores bien diferenciados que pueden tener un comportamiento agresivo, como por ejemplo el leiomioma benigno metastásico.

Existen tres vías clásicas de diseminación:

1- *Siembra directa a cavidades y superficies orgánicas.*

2- *Diseminación linfática.*

3- *Diseminación hematológica.*

A medida que el tumor primitivo crece, y de acuerdo con el concepto de *Heterogeneidad Tumoral*, se enriquece con subclones mutantes con mayor capacidad de supervivencia, agresividad, potencial metastásico y capacidad de secretar factores angiogénicos, altamente necesarios a partir del momento en que adquiere un tamaño mayor de 2 mm. Es en este momento en el que los tumores, que en un principio no producen factores angiogénicos, adquieren un clon con fenotipo capaz de hacerlo en parte por mutaciones como la inactivación de P53, lo cual lleva a la caída de los niveles de Trombospondina 1 (inhibidor de la angiogénesis) y a la ruptura del equilibrio huésped-tumor a favor del estado *quiescente* tumoral, y el abandono de lo que se traduce histológicamente como carcinoma *in situ*, temprano, *borderline* y otras terminologías de uso frecuente que expresan improbable o baja capacidad metastásica. Un concepto que se ha establecido en los últimos años, es que las células no neoplásicas: vasos, células de la matriz y tejidos de los órganos que hospedan tumores no son testigos mudos, sino que interactúan entre sí y con las células neoplásicas, durante todo el proceso.

Una vez que las células tumorales activan los programas necesarios para diseminarse pierden la capacidad de reconocimiento y adherencia dados por las cadherinas y cateninas, y avanzan hacia el tejido colindante por medio de proteasas, especialmente colagenasas, expresando receptores de laminina, fibronectina e integrinas que actúan como receptores para componentes de matriz extracelular. Una vez llegados a los capilares, la membrana basal de los mismos es degradada por la colagenasa tipo IV y las células tumorales tienen acceso a la circulación, desplazándose en grupos adheridas a células plasmáticas para evitar ser destruidas por el sistema inmunológico del huésped.

No está clara la causa de la elección del órgano diana por un tipo de tumor determinado: por ejemplo, columna vertebral para el cáncer prostático.

Habría dos teorías:

a. *"Soil and seed" o "terreno y siembra"*: distintos órganos proveen condiciones de crecimiento optimizadas para cánceres específicos.

b. *"Homing theory" o "teoría de la dirección certera"*: distintos órganos tienen la capacidad de atracción de tipos específicos de células tumorales, por medio de factores quimiotácticos. Esta teoría aparecería respaldada en un trabajo de Muller citado por Murphy, donde el receptor reactante de leucocitos (receptor de chemoquinas

4) y su ligando (ligando chemoquina 12 o factor derivado de células estromales: FDCE-1) gobiernan el patrón metastásico de un cáncer de mama en un modelo con ratones (Murphy, 2001).

Las células tumorales que entran en la circulación linfática se detienen en la luz de los canales linfáticos o en el seno subcortical del ganglio más cercano. Aquéllas que viajan por vasos sanguíneos, llegan a los capilares de los órganos corriente abajo donde muchos hacen impacto y mueren, pero otras se establecen allí, o retoman la circulación hacia otro órgano. Una vez en el órgano "blanco", deben comunicarse con las células locales para formar su trama mesenquimática y vascular y si no lo logran serán eliminadas o permanecerán en estado latente. Esta situación se halla en actual discusión en el terreno de la Anatomía Patológica, ya que se cuestiona el significado de la presencia de estas células aisladas, detectadas por inmunohistoquímica, en ganglios y médula ósea relacionados con cáncer mamario, por ejemplo. Una vez implantadas, podrían nutrirse por difusión directa de los vasos circundantes hasta llegar a los 2 mm de tamaño. A partir de allí, necesitarían proveerse de otro método de subsistencia y uno de los primeros pasos es la adquisición de un fenotipo angiogénico.

Las neoplasias malignas se caracterizan por infiltrar los tejidos colindantes y eventualmente colonizan a distancia (metástasis). Aquellas neoplasias que carecen de dicha facultad (por ejemplo,

carcinomas *in situ*) no son biológicamente agresivas y resultan potencialmente curables en el 100% de los casos. El EBC, en cambio, no reconoce variantes *in situ* y se desarrolla como invasor desde sus comienzos.

IV- ANGIOGENESIS.

La **angiogénesis** es un proceso por medio del cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente, normalmente suprimida y observable sólo en forma fisiológica y temporariamente durante la reproducción, desarrollo embrionario y cicatrización (McNamara, 1998). La angiogénesis sostenida se observa en enfermedades como diabetes, psoriasis y artritis reumatoidea, y también es esencial para el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis (Fox, 2001). Está regulada normalmente por numerosos **factores proangiogénicos** (Marcoval Caus y col., 1999): *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* (Mukhopadhyay y col., 1995), *Factor de Crecimiento Celular Derivado de Plaquetas (FCDP)* (Takahashi y col., 1996) y *Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF-1)* (Jouanneau y col., 1995), así como las **sustancias antiangiogénicas**: *Trombospondina*, *Angiostatina* (O'Reilly, 1994) y *Endostatina* (O'Reilly y col., 1997). Durante el proceso de embriogénesis la estructura vascular primitiva se

desarrolla mediante vasculogénesis, que comprende la diferenciación *in situ* de células endoteliales a partir de precursores angioblásticos de origen mesodérmico. En el adulto, los vasos sanguíneos neoformados parecen derivar de brotes originados de vasos preexistentes, produciéndose lo que se ha dado en llamar "switch" o "desvío" angiogénico (Abdulkadir y Carvalhal, 2000). Aquí resultan fundamentales los oncogenes comunes y los genes de supresión tumoral. Efectivamente, se ha observado que las células transformadas por Ras, Myc, Raf, *cerb-2*, tienen un fuerte fenotipo angiogénico que promueve un "Upregulation" o "regulación corriente arriba" del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) o "Downregulation" o "regulación corriente abajo" de Trombospondina-1. Por ejemplo, el gen P53 salvaje disminuye la concentración de FCEV y aumenta la de Trombospondina-1, mientras que el gen P53 mutante aumenta la concentración de FCEV. Estos vasos neoformados son tortuosos, con fondos de saco y áreas lacunares, lo que lleva a flujo intermitente y muchas veces en sentido inverso. Por otra parte, hay variaciones de la trama vascular de los distintos tumores ya que éstos utilizarían distintos tipos de métodos de acuerdo a su microambiente y al fenotipo vascular dominante en el órgano que estén colonizando, características a tener en cuenta cuando se administra medicación en Oncología.

Los promotores e inhibidores angiogénicos pueden originarse de las células neoplásicas, que a su vez pueden reclutar células inflamatorias como macrófagos, plaquetas y mastocitos, ambos ricos suministros de factores angiogénicos y citoquinas, o liberar factores de crecimiento o sus receptores reclutados de la matriz extracelular.

La producción de la neovascularización es un proceso complejo en múltiples pasos. Las células endoteliales tienen una "*conducta invasora*" en base a la secreción de colagenasas, uroquinasas y factor activador del plasminógeno, enzimas que a su vez facilitan la diseminación de las células neoplásicas a través del estroma y de los vasos colindantes. Tal es así, que se han hallado niveles elevados de activador-inhibidor-1 plasminógeno y activador de plasminógeno uroquinasa, en asociación con un mal pronóstico.

Numerosas sustancias podrían desencadenar el proceso de angiogénesis tumoral, causando una reprogramación de las células vasculares por acción de numerosos factores angiogénicos (Ortiz Hidalgo y Reynoso, 1994; Marcoval Caus y col., 1999).

Dos grupos de factores de crecimiento del receptor tirosina kinasa se expresarían en las células endoteliales:

1) La familia del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) está compuesta por cinco miembros: FCEV-A, FCEV-B, FCEV-C, FCEV-D, Factores de Crecimiento Placentario 1 y 2

(FCP-1 y FCP-2) y tres receptores de Factores de Crecimiento Endotelial Vascular FCEVR-1 (FCEVR-Ftl-1), FCEVR-2 (FCEVR-Kdr o Flk-1) y FCEVR-3 (Flt-3), unidos a ligandos endógenos o a un Factor de Crecimiento Plaquetario (FCP-1). El mayor receptor mitógeno (FCEVR-2) es crucial para la angiogénesis, a punto tal que la delección de un alelo del gen que lo regula causa la muerte embrionaria. Se ha hallado sobreexpresado en numerosas neoplasias, por lo que se lo podría aplicar en el control terapéutico de la angiogénesis tumoral.

Recientemente se descubrieron además dos co-receptores: neuropilina 1 y 2.

El rol regulador de FCEV en la angiogénesis terapéutica ha sido sugerido en experimentos donde la administración de FCEV exógena ha demostrado aumento del flujo colateral sanguíneo en animales con isquemia de inducida en miembros o isquemia miocárdica. Así, la neovascularización del músculo isquémico podría ser suficiente para preservar la integridad y función de los tejidos, y podría ser considerada terapéutica (Couffinhal y Silver, 1998).

2) El otro grupo está compuesto por dos miembros: la Inmunoglobulina con tirosina quinasa (Tie1) y el Factor de Crecimiento Epidérmico Homólogo (Tie2 o Tek), que está relacionado con dos ligandos: Angiopoyetina 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2s). La Angiopoyetina-2 inicialmente favorecería la disminución de la

interacción de las células endoteliales con su entorno (pericitos y células mesenquimáticas) promoviendo la aparición de fenotipos inmaduros, los cuales bajo la acción de Ang-1 y FCEV pueden sinérgicamente desencadenar la angiogénesis (Weidner, 1995; Lauren y col., 1998).

V. FACTORES ANGIOGÉNICOS.

Los inductores comprometidos en el proceso obedecen a mecanismos fisiológicos y patológicos:

1- Proteínas del microambiente: *Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF), Interleuquina 6 (IL-6), Factor de Crecimiento Plaquetario (FCDP) y Factor Tisular (FT).*

2- Stress metabólico: con hipoxia, hipoglucemia y descenso del pH.

3- Stress mecánico: generado por la presión de las células proliferantes.

4- Mediadores de la inflamación: ciclogenasa-2, prostaglandinas y productos de la activación de mastocitos.

5- Alteraciones genéticas: activación de *oncogenes* como RAS y SRC e inactivación de genes de supresión tumoral como P53. Normalmente está regulada por factores *proangiogénicos*: *Factor de*

Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) (Mukhopadhyay y col.,1995), Factor de Crecimiento Celular derivado de Plaquetas (FCDP) (Takahashi y col., 1996), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF-1) (Jouanneau y col. , 1995), Factor Tisular (FT) y sustancias antiangiogénicas: trombospondina, angiostatina (O´Reilly y col., 1994) y endostatina (O´Reilly y col., 1997).

Dentro de los factores enumerados en el párrafo anterior podemos citar:

a- El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (FCEV), también conocido como *Factor de Permeabilidad Vascular (FPV)* por su habilidad para producir la fenestración vascular, es un potente y específico mitógeno de las células endoteliales vasculares que estimula el incremento de su permeabilidad en situaciones fisiológicas y patológicas. Según una hipótesis, la principal acción de FCEV sería permitir el pasaje de proteínas plasmáticas las cuales formarían un gel extravascular de fibrina, que permitiría el crecimiento de los vasos y de las células neoplásicas.

Es de cierta relevancia el hecho de que FCEV-C esté relacionado con la linfangiogénesis embrionaria y pueda estarlo a su vez con la linfangiogénesis asociada a tumores. Es secretado por una amplia variedad de tipos celulares incluyendo neutrófilos, plaquetas y células endoteliales, ante estímulos tales como la hipoxia, por medio

del *Factor Inducido por Hipoxia* (FIH), tanto en células normales como tumorales.

Es específico para células endoteliales (arteriales, venosas y linfáticas), donde se encuentran predominantemente sus receptores, pero está desprovisto de actividad mitógena para otros tipos celulares. Sus principales acciones son:

- ⌘ Iniciar directamente la angiogénesis al estimular la proliferación, migración y formación de brotes por parte de las células endoteliales, en forma temprana y a partir del lecho vascular normotípico preexistente, colindante al tumor.
- ⌘ Aumentar el flujo sanguíneo mediante el estímulo de la vasodilatación, aunque se ha demostrado que la permeabilidad y velocidad de los eritrocitos es independiente del estímulo angiogénico inicial y estaría relacionado con el *microambiente* local. Ambos parámetros son más marcados a nivel del cuero cabelludo que en la piel dorsal torácica, por ejemplo.
- ⌘ Contribuir indirectamente con la angiogénesis al inducir la hiperpermeabilidad vascular, facilitando el tránsito de agua, micro y macromoléculas
- ⌘ Facilitar el transporte de hexosa, fuente de energía útil para la angiogénesis.

- ⌘ Actuar como factor de supervivencia impidiendo la apoptosis que sufrirían las células endoteliales en su ausencia, facilitando la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y A1.
- ⌘ Inducir a la expresión de metaloproteinasas de la matriz que proveen espacio para que las células endoteliales migren.
- ⌘ Incentivar la expresión de moléculas de adherencia celular como las Integrinas en las células endoteliales.
- ⌘ Promover la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células endoteliales, que llevarían a la adherencia de IL-2 en *linfocitos supresores naturales o natural killers* activados.
- ⌘ Poseer efectos reguladores sobre otras células: promueve la quimiotaxis de los monocitos; induce la formación de colonias de granulocitos y macrófagos; inhibe la maduración de las células dendríticas, que actúan como células presentadoras de antígeno.

La expresión de FCEV está regulada por la hipoxia, citoquinas (Factor de Crecimiento Epidérmico y Factor de Crecimiento Tumoral FCT-B, por ejemplo) y la diferenciación de determinadas líneas celulares (ej. adipocitos). Se han medido altas concentraciones de FCEV en distintos tumores (mama, colon, pulmón, tiroides, riñón, ovario, etc).

EL FCEV-A se sobreexpresa en muchos tumores de pulmón, cerebro, tractos digestivo y urogenital. Es posible que cuando los tumores no se valen de FCEV-A, otros FCEV homólogos puedan ser inducidos, tal como se ha visto en algunos casos de cáncer de mama, riñón y ovario donde se observa la expresión de FCEV-B y FCEV-C (Abdulkadir y Carvalhal, 2000). Se ha comunicado que la Herregulina estimularía la secreción de FCEV y la angiogénesis en distintos tipos de tumores (Yen y You, 2000).

b- El Factor Tisular (FT), es una glicoproteína de transmembrana que funciona como iniciador primario fisiológico de la cascada de la coagulación a través de su interacción con el Factor de Coagulación VIIa. Interviene además, en sistemas de señal intracelular, proliferación celular y en el desarrollo de vasos sanguíneos. Experimentalmente se ha observado que FT regularía el switch o desvío angiogénico en sarcomas de ratón y este rol es independiente de su acción como mediador de la coagulación y se ha observado que regula la angiogénesis *in vivo*, a través de la producción de FCEV.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de FT incrementa la habilidad de las células de melanoma y cáncer de páncreas para metastatizar, y también existiría correlación con carcinoma de pequeñas células de pulmón y en algunos estudios, con cáncer de mama (Brem y col., 1998).

c- El Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF):

- ⌘ Induce la expresión de FCEV por mecanismos autocrinos y paracrinos.
- ⌘ Induce la angiogénesis mediante mecanismos independientes del FCEV.
- ⌘ Regula la migración de las células endoteliales.
- ⌘ Estimula la síntesis de proteasas en las células endoteliales.
- ⌘ Induce a la producción de integrinas.

d- El Factor de Crecimiento Plaquetario (FCDP)

- ⌘ Es mediador de la proliferación y estabilizador de las células endoteliales por medio de sus efectos en los pericitos.
- ⌘ Interviene en la formación de tubos.
- ⌘ Potencia la producción de FCEV y otros factores de crecimiento angiogénico. Además, las células endoteliales activadas producen metaloproteinasas de la matriz que permiten la migración endotelial y la formación de tubos.

VI. DESARROLLO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN:

A- Reguladores "corriente arriba" del FCEV :

- ⌘ La *hipoxia* que induce la formación de ARN mensajero del FCEV, en forma rápida y reversible en células normales y atípicas.

- ⌘ La *inactivación de los genes de supresión tumoral* como P53 y VHL.
- ⌘ Las *Citoquinas, Factores de Crecimiento y moléculas de señal intracelular* como COX-2, GF, FCF, IGF, IL1B, IL6, FCDP, PrgIE2.
- ⌘ Los *oncogenes celulares* como RAS, RAF y SRC.

B- Pasos de señal activados por FCEV:

El FCEV se une a sus *receptores de transmembrana*: FCEVR-1 (Flt-1), FCEVR-2 (Flk-1/KDR), FCEVR 3 (Flt-4). FCEVR se une a FCEVR2, el que parece ser el más importante y que se expresa casi exclusivamente en endotelio. De ahí en más, se desencadena una cascada de señales que resultan en la transcripción de genes en el núcleo y varias respuestas celulares: retracción de los pericitos, aumento del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico, alteraciones de la permeabilidad celular, quimiotaxis y crecimiento celular. El endotelio por sí solo comienza a secretar gran cantidad de *Factores de Crecimiento*: como *Factor de Crecimiento Fibroblástico* (FCF), *Factor de Crecimiento Plaquetario* (FCDP) y *Factor de Crecimiento insulina-like o insulino-símil* (IGF-1).

C- Proliferación de las células endoteliales, migración y diferenciación:

La degradación de la matriz extracelular y la membrana basal alrededor de los capilares da espacio a las células endoteliales para

movilizarse hacia ella, gracias a los *Factores de Crecimiento* derivados de tumores, formando un pequeño brote. Las moléculas de adherencia como las *Integrinas* favorecen la migración de las células, uniéndose al tripéptido (Arg)-(Gly)-(Asp), secuencia presente en un número de proteínas de la matriz. El receptor de adherencia de Integrina $\alpha 2\text{-}\beta 3$, presente en la superficie de las células endoteliales activadas es crítico para la maduración, diferenciación y supervivencia de los vasos, permitiendo a las células diseminarse, formar protrusiones y participar en la formación de luces vasculares. Los Factores de Crecimiento como FCF estimulan la expresión de estos receptores.

Los pequeños vasos neoformados inicialmente se mueven como una cuerda sólida hacia el tumor, pero más tarde se desarrollan espacios inter e intracelulares que forman la luz vascular, y finalmente los vasos se anastomosan para formar una malla vascular nueva. Hay que recordar que las células endoteliales, en ausencia de los factores de supervivencia, sufrirían apoptosis. Ellos son: FCEV, angiopoyetina I, integrinas, fibronectina y fibrinógeno.

El análisis de la angiogénesis tumoral en los distintos subtipos de EBC puede ser abordado mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos del proceso en estudio. Este fenómeno ha sido estudiado en la actualidad en un número creciente de neoplasias (Weidner y col., 1993; Gasparini y Harris, 1995; Williams y col.,

1994; 1995; Folkman, 1987; Maeda y col., 1995; Lindmark y col., 1996; Fernández Aceñero y col., 1998), considerando las posibilidades futuras de desarrollar terapéuticas específicas que regulen el sustento nutricional de la masa celular en crecimiento.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES.

Efectuar un aporte al conocimiento del proceso de angiogénesis en los diferentes subtipos de EBC, analizando la relación entre los diferentes parámetros angiogénicos mediante técnicas inmunohistoquímicas morfométricas con marcadores específicos.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.1 Estudiar el proceso de angiogénesis tumoral en los diferentes subtipos histopatológicos de EBC: Superficial, Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, *mediante microscopía óptica, aplicando técnicas de rutina, histoquímicas e inmunohistoquímicas morfométricas.*

2.2 Analizar los valores del Índice de Vascularización Tumoral (ITV) de los diferentes subtipos de EBC, por medio de los parámetros del Area Vascular Inmunomarcada (AVI) y del Area de Referencia (AR), considerando que $ITV = AVI : AR \times 100$, utilizando marcadores inmunohistoquímicos: el FACTOR VIII (marcador de células endoteliales) y el FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (FCEV) que marca las células tumorales, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas.

2.3 Detectar posibles cambios histopatológicos en las áreas vasculares intra y peri tumorales en los diferentes subtipos de EBC.

2.4 Correlacionar los parámetros de la Densidad Microvascular (DM), Mitosis (M), Extensión (E) y Profundidad (P) del tumor, con los marcadores inmunohistoquímicos (Factor VIII y FCEV) en los diferentes subtipos de EBC.

2.5 Analizar la conducta biológica de los EBC Superficial, Lobulado, Siringoide y Desmoplásico para evaluar el proceso de angiogénesis, a través de los parámetros enunciados.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL-OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se diseñó un estudio de 35 piezas operatorias con resección completa, en pacientes de ambos sexos, de los grupos etáreos más expuestos a la radiación solar y provenientes de Institutos Privados. Fueron diagnosticadas considerando los distintos subtipos clásicos de EBC: *Superficial*: 8, *Lobulado*: 10, *Siringoide*: 7 y *Desmoplásico*: 10.

El trabajo inmunohistoquímico morfométrico fue realizado en la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP que cuenta con laboratorios de técnica histológica y un analizador de imágenes mediante videomicroscopía (Imaging Technology, programa Optimas 5.2).

Se procedió a evaluar el **ÍNDICE DE VASCULARIZACIÓN TUMORAL (IVT)** de los diferentes subtipos de EBC, utilizando los marcadores inmunohistoquímicos: el **FACTOR VIII** (marcador endotelial) y el **FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (FCEV)**. Se correlacionó con los parámetros de la *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión (E)* y *Profundidad (P)* del tumor. Se tomaron como controles de cada subtipo muestras de piel sanas, correspondientes a bordes de sección libres de neoplasia de la pieza quirúrgica considerada.

METODOLOGÍA APLICADA:

1. Técnicas de microscopía óptica:

Las muestras fueron fijadas en formol tamponado, incluidas en parafina y cortadas con microtomos de deslizamiento a un espesor de 4 µm. Para procedimientos de rutina, fueron coloreadas con hematoxilina-eosina, usándose para coloraciones especiales: tricrómicos, reticulina, PAS, van Gieson, alcian blue, para determinar cambios en la membrana basal (PAS) y en el estroma tumoral.

2. Técnicas de inmunohistoquímica:(Cónsole y col., 2001).

Se eligió el **Factor VIII** como marcador de células endoteliales y entre los factores de angiogénesis, se eligió el **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular** (FCEV) que marca las células tumorales, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas. En una explicación breve, las muestras de piel de 4 µm de espesor fueron obtenidas a diferentes niveles de los tacos de parafina. Los cortes histológicos fueron inmunomarcados mediante incubación por 1 hora a temperatura ambiente, con anticuerpo primario *anti- Factor VIII / anti- Factor de Crecimiento Endotelial (FCEV)* (humano, Dako, CA, USA), diluído 1:100. Luego, los cortes fueron tratados con un sistema EnVision (Dako, CA, USA). El cromógeno sensible al peróxido fue la diaminobenzidina. En todos los casos, la especificidad del antisuero primario fue monitoreada

observando la habilidad para bloquear la reacción inmunocitoquímica después de una preabsorción con un exceso del antígeno relacionado o mediante su reemplazo con suero normal de conejo o solución salina-buffer.

3. Técnicas de morfometría: (Cónsole y col., 1999; 2002).

Se identificaron las áreas de vascularización a menor aumento (objetivo 4x) y se tomaron un número suficiente de muestras (mínimo de 10 campos de obj x 25) por preparado, midiéndose en dos niveles (a y b) por tacos representativos de la lesión en cada paciente. Se utilizó un método computarizado de videomicroscopía (Analizador de Imágenes Imaging Technology, programa Optimas 5.2). El Macro preparado a tal fin, está diseñado para analizar las áreas vasculares inmunomarcadas sacando el "background o fondo" en forma automática. Se calculó el número de vasos sanguíneos inmunomarcados positivamente o *Densidad Microvascular* (DM), así como las áreas y perímetros individuales y el *Area Vascular Inmunomarcada* (AVI). Esto permitió establecer un *Indice Vascular Tumoral* (IVT) = $\Sigma AVI/RA$, siendo Σ = *sumatoria* y RA el *Area de Referencia*.

4. Tratamiento estadístico:

Los datos en cada parámetro evaluado (ver Tablas: media de un mínimo de 10 campos con obj x 25 y de los niveles de corte a y b) fueron expresados como promedios \pm ES (calculados

automáticamente por el analizador de imágenes). Los mismos se analizaron mediante un Test ANOVA para comparaciones múltiples y un test de Fischer. Además, se aplicó el Coeficiente de Correlación de Pearson.

RESULTADOS

La **figura 1** muestra un **Epitelioma Basocelular (EBC)** de subtipo **Superficial** en el que puede apreciarse una isla tumoral lobular compuesta por células basaloides con disposición en empalizada periférica, en contacto con el epitelio de superficie (Hematoxilina-eosina, obj. x 40). La técnica de *PAS* permite observar las diferentes estructuras del EBC y, en especial, facilita el estudio de su membrana basal (**fig. 2**, obj. x 40). El *trícromico* permite el estudio del estroma peritumoral (**fig. 3**, obj. x 40). En algunos de nuestros casos de EBC se observaron lesiones asociadas con infiltrados de mastocitos y linfocitos a nivel estromal peritumoral.

La técnica de inmunohistoquímica para **Factor VIII** permite observar la tinción positiva para el endotelio vascular tumoral (**fig. 4**, Factor VIII, obj. x 40).

El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*, muestra tinción positiva tumoral con mayor inmunorreactividad a nivel de la empalizada periférica, la trama vascular y el infiltrado inflamatorio colindante, en una biopsia de EBC Superficial (**fig. 5**, obj. x 40).

En la **tabla 1** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Superficial**, consignándose los valores (\pm ES) de las *Áreas Vasculares Inmunomarcadas (AVI)* y de las *Áreas de Referencia (AR)*, que permitieron calcular el *Índice Vascular Tumoral (IVT)* para el **Factor VIII**, inmunomarcador de las células endoteliales. También

se consignaron los valores de *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión del tumor (E)*, *Profundidad del tumor (P)* y el resultado de las inmunomarcaciones para el factor angiogénico elegido: el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*.

De acuerdo al tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) en el parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII**, se detectó un descenso significativo ($p < 0.002$) en el subtipo **Superficial** respecto a los subtipos **Lobulado**, **Siringoide** y **Desmoplásico**. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos 2, 3 y 4 que corresponden a los EBC **Lobulado**, **Siringoide** y **Desmoplásico** respectivamente, que presentaron en promedio igual comportamiento.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** registró un descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Superficial** respecto a los subtipos **Lobulado**, **Siringoide** y **Desmoplásico**. Hubo menores valores en el **Desmoplásico** respecto a los subtipos **Lobulado** y **Siringoide**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un descenso significativo ($p < 0.01$) en el subtipo **Superficial** respecto a los subtipos **Lobulado** y **Desmoplásico**, no hallándose diferencias significativas con el subtipo **Siringoide**.

Respecto a la inmunomarcación con el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*, el subtipo **Superficial** registró un

promedio de 3 +, en una escala de 0 a 3 de inmunomarcación intratumoral, con mayor reacción a nivel de la empalizada peritumoral, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas (fig.5). El valor promedio de FCEV para el subtipo **Superficial** resultó ser el más alto de los distintos subtipos en estudio, mostrando incremento no significativo con el subtipo **Desmoplásico** y **Lobulado**. No existieron prácticamente diferencias con el subtipo **Siringoide**.

Los datos de *Mitosis* (**M**) mostraron un descenso no significativo en el subtipo **Superficial** respecto los subtipos **Lobulado**, **Siringoide** y **Desmoplásico**.

Además, se halló disminución significativa ($p < 0.001$) en la *Extensión* (**E**) y desarrollo en *Profundidad* (**P**) en el subtipo **Superficial** al compararlo con los subtipos **Lobulado**, **Siringoide** y **Desmoplásico**.

En la **tabla 2** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Lobulado**, consignándose los valores (\pm ES) de las *Areas Vasculares Inmunomarcadas* (**AVI**) y las *Areas de Referencia* (**AR**), que permitieron calcular el *Indice Vascular Tumoral* (**IVT**) para el **Factor VIII** que inmunomarca las células endoteliales. También se consignaron los valores de *Densidad Microvascular* (**DM**), *Mitosis* (**M**), *Extensión del tumor* (**E**), *Profundidad del tumor* (**P**) y el

resultado de las inmunomarcaciones para el factor angiogénico elegido: el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*.

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) del parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII** para el **subtipo Lobulado**, mostró incremento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** también detectó aumento significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Lobulado** respecto al **Superficial**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un incremento significativo ($p > 0.01$) en el subtipo **Lobulado** al compararlo con los subtipos **Superficial y Siringoide**.

El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* mostró un promedio de **1.9 +**, con buena inmunomarcación de los vasos y de las células epidérmicas. Los valores para **FCEV** fueron los menores obtenidos en el estudio de los cuatro subtipos de EBC, mostrando diferencias que no resultaron significativas con los demás subtipos.

En el subtipo **Lobulado** hay un aumento no significativo de las *Mitosis (M)* respecto al subtipo **Superficial**.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y desarrollo en *Profundidad (P)* en el subtipo **Lobulado** al compararlo con el subtipo **Superficial**.

La **figura 6** (obj. x 40) correspondiente a un EBC **Lobulado** presenta un lóbulo tumoral con empalizada periférica y un infiltrado linfocitario en el estroma intercalar. En otro campo, la técnica de inmunohistoquímica para **FCEV** permite apreciar una marcada positividad a nivel de la empalizada periférica (**fig. 7**, obj x 40).

En la **tabla 3** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Siringoide**, consignándose los valores (\pm ES) de las *Areas Vasculares Inmunomarcadas (AVI)* y *Areas de Referencia (AR)*, que permitieron calcular el *Indice Vascular Tumoral (IVT)* para el **Factor VIII** que inmunomarca las células endoteliales. También se consignaron los valores de *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión (E)*, *Profundidad del tumor (P)* y el resultado de las inmunomarcaciones para el factor angiogénico elegido: el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*.

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) correspondiente al parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII** para el subtipo **Siringoide**, registró un aumento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** también detectó aumento significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Siringoide** respecto al subtipo **Superficial**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un descenso significativo ($p < 0.01$) en el subtipo **Siringoide** al compararlo con los subtipos **Lobulado y Desmoplásico**. No hubo diferencias significativas con el subtipo **Superficial**.

Respecto al *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* se halló un promedio de **2.9 +**, con alta inmunomarcación de los vasos y de las células epidérmicas. Los valores obtenidos en esta serie fueron similares a los obtenidos para los EBC **Superficiales**, no hallándose diferencias significativas entre los diferentes subtipos.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y el desarrollo en *Profundidad (P)* en el subtipo **Siringoide** y un ligero incremento no significativo de las *Mitosis (M)*, al compararlo con el subtipo **Superficial**.

La **figura 8** (obj. x 40) corresponde a un EBC **Siringoide** formado por células basaloideas con formación focal de estructuras luminales y característico patrón en encaje. En la **figura 9** (obj. x 40), puede observarse un EBC Siringoide con marcada positividad mediante la inmunohistoquímica para el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (**FCEV**).

En la **tabla 4** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Desmoplásico**, consignándose los valores (\pm ES) de las *Areas Vasculares Inmunomarcadas (AVI)* y *Areas de Referencia*

(AR), que permitieron calcular el *Indice Vascular Tumoral (IVT)* para el **Factor VIII** que inmunomarca las células endoteliales. También se consignaron los valores de *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión del tumor (E)*, *Profundidad del tumor (P)* y el resultado de las inmunomarcaciones para el factor angiogénico elegido: el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (**FCEV**).

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) del parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII** para el subtipo **Desmoplásico**, mostró incremento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** detectó un descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Desmoplásico** respecto al **Siringoide y Lobulado**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un incremento significativo ($p > 0.01$) en el subtipo **Desmoplásico** al compararlo con los subtipos **Superficial y Siringoide**.

El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* mostró un promedio de **2.5 +**, con buena inmunomarcación de los vasos y de las células epidérmicas. Los valores para FCEV fueron los menores obtenidos en el estudio de los cuatro subtipos de EBC, mostrando diferencias que no resultaron significativas con los demás subtipos.

En el subtipo **Desmoplásico** hay un aumento no significativo de las *Mitosis (M)* respecto al subtipo **Superficial**.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y desarrollo en *Profundidad (P)* del tumor en el subtipo **Desmoplásico** al compararlo con el subtipo **Superficial**.

El subtipo **Desmoplásico o Esclerodermiforme** presenta células basaloides en patrón cordonal con abundante estroma desmoplásico intercalar (**fig. 10**, obj. x 40).

La inmunohistoquímica para **Factor VIII** pone de manifiesto la marcación de los vasos sanguíneos en este subtipo de EBC (**fig. 11**, obj. x 40).

La inmunomarcación mediante el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* muestra alta positividad en los islotes tumorales y en el infiltrado inflamatorio peritumoral (**fig. 12**, obj. x 40).

De lo expuesto, se deduce que el **Factor VIII** fue muy eficaz para inmunomarcarse y calcular **AVI, DMV e IVT**, mientras que el **FCEV** parece expandirse en el área tumoral con altos valores en los subtipos **Superficial y Siringoide**, no permitiendo inferir un pronóstico de mayor agresividad en la conducta biológica de los EBC, respecto a lo comunicado en carcinomas, melanomas y epitelomas espinocelulares.

En las **tablas 5, 6, 7 y 8**, se relacionaron los diferentes parámetros según el **Coefficiente de Correlación de Pearson**. Se

tuvieron en cuenta la *Densidad Microvascular (DM)*, el *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)*, el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*, el conteo de *Mitosis (M)*, la *Extensión tumoral (E)* y la *Profundidad tumoral (P)*.

En la **tabla 5** se correlacionaron los parámetros angiogénicos de los **EBC Superficiales**. Se relacionó *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* con los otros parámetros no obteniéndose resultados significativos. La relación entre la *Densidad Microvascular (DM)* con los otros parámetros tuvo similares características. En cambio, al confrontar *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con otros parámetros, la correlación fue significativa (-0.745) con respecto al conteo de *Mitosis (M)*.

En la **tabla 6**, correspondiente a los **EBC Lobulados**, no se obtuvieron datos significativos en ninguno de los cálculos contemplados.

En la **tabla 7** correspondiente a los **EBC Siringoides** se registraron datos significativos al relacionar *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con la *Densidad Microvascular (DM)* (0.726) y la *Densidad Microvascular (DM)* con la *Extensión (E)* (0.991) y *Profundidad (P)* (0.999) tumoral. El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* se correlacionó de modo significativo con la *Profundidad (P)* en el desarrollo tumoral (-0.950).

Por último, en la **tabla 8** correspondiente a los **EBC Desmoplásicos**, se hallaron resultados altamente significativos al relacionar al relacionar el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con el desarrollo en *Profundidad (P)* del tumor (0.700). Los restantes cálculos realizados para estudiar la correlación entre los parámetros angiogénicos, no fueron significativos.

TABLA 1.
EBC DE TIPO SUPERFICIAL.

SUPERFIC. N°	AVI ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)	AR ($\mu\text{m}^2 \times 10^7$)	IVT	DM (CGA)	FCEV	M (CGA)	E (mm^2)	P (mm^2)
104636	13.0 ± 1.6	1.9 ± 0.4	0.07 ± 0.02	2 ± 0.6	3+	0	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2
107219	31.6 ± 2.7	2.6 ± 0.5	0.12 ± 0.03	10 ± 1.4	3+	0	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.3
93305	37.1 ± 3.2	1.6 ± 0.3	0.23 ± 0.07	5 ± 0.9	3+	1 ± 0.1	1 ± 0.3	0.3 ± 0.1
174982	29.6 ± 2.8	2.3 ± 0.4	0.13 ± 0.04	11 ± 2	3+	0	12.7 ± 2.1	1 ± 0.1
173503	16.2 ± 1.4	2.1 ± 0.3	0.08 ± 0.02	2 ± 0.2	3+	0	1 ± 0.2	1.5 ± 0.2
175431	11.2 ± 1.3	1.8 ± 0.2	0.06 ± 0.01	5 ± 0.4	2+	1 ± 0.1	3.5 ± 0.8	1 ± 0.2
113197	25.4 ± 2.5	2.1 ± 0.3	0.12 ± 0.02	10 ± 1.8	3+	0	0.7 ± 0.3	1 ± 0.2
120720	18.7 ± 1.6	2.4 ± 0.5	0.08 ± 0.03	3 ± 0.2	2+	1 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4
X (promedio)	22.9 ± 2.1	2.1 ± 0.4	0.11 ± 0.03	6 ± 0.9	3+	1 ± 0.1	2.6 ± 0.5	0.7 ± 0.2

Datos ± ES.

AVI: Area vascular inmunomarcada.

AR: Area de referencia.

IVT: Indice vascular tumoral.

DM: Densidad microvascular (CGA: campo de gran aumento: 40x).

FCEV: Factor de crecimiento endotelial vascular.

M: mitosis (CGA: campo de gran aumento: 40x).

E: extensión del tumor.

P: profundidad del tumor.

**TABLA 2.
EBC DE TIPO LOBULADO..**

LOBUL. N°	AVI ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)	AR ($\mu\text{m}^2 \times 10^7$)	IVT	DM (CGA)	FCE V	M (CGA)	E (mm²)	P (mm²)
120750	171.9 ± 6.5	4.2 ± 0.8	0.41 ± 0.12	14 ± 2.1	3+	4 ± 0.7	24 ± 3.4	11.2 ± 1.6
153743	86.7 ± 3.4	2.6 ± 0.3	0.33 ± 0.09	12 ± 1.5	2+	5 ± 0.8	26 ± 4.4	12 ± 1.9
107220	45.5 ± 2.1	1.5 ± 0.2	0.30 ± 0.08	12 ± 2	0+	1 ± 0.4	14 ± 2.1	5 ± 0.8
174177	170.6 ± 5.8	5.6 ± 0.8	0.30 ± 0.07	27 ± 5.3	1+	4 ± 0.8	23 ± 3.9	8 ± 1.6
99984	178.9 ± 3.6	6.1 ± 0.8	0.29 ± 0.07	18 ± 3	3+	1 ± 0.2	23 ± 2.8	3.5 ± 0.7
104897	65.3 ± 2.6	3.1 ± 0.8	0.21 ± 0.05	9 ± 1.8	2+	1 ± 0.3	16 ± 2.3	6 ± 1.2
147824	124.1 ± 3.2	6.3 ± 0.7	0.20 ± 0.04	13 ± 1.2	2+	5.3 ± 0.8	5.4 ± 1.2	5.3 ± 0.9
99645	60.3 ± 2.5	2.8 ± 0.5	0.22 ± 0.05	18 ± 2.8	3+	1 ± 0.1	15 ± 2.8	8 ± 1.7
174093	56.7 ± 2.7	2.9 ± 0.6	0.20 ± 0.03	11 ± 1.7	0+	1 ± 0.4	30 ± 4.5	10 ± 1.7
120508	184.0 ± 5.3	6.0 ± 1.2	0.30 ± 0.08	20 ± 3.8	3+	5 ± 0.9	60 ± 7.3	37 ± 3.7
X (promedio)	114.4 ± 3.7 * * p < 0.002	4.1 ± 0.7	0.3 ± 0.07* * p < 0.001	15.4 ± 2.5* * p < 0.01	1.9+	3 ± 0.5	23.6 ± 3.5* *p < 0.001	10.6 ± 1.4* *p < 0.001

Datos ± ES.

AVI: Area vascular inmunomarcada.

AR: Area de referencia.

IVT: Indice vascular tumoral.

DM: Densidad microvascular (CGA: campo de gran aumento: 40x).

FCEV: Factor de crecimiento endotelial vascular.

M: mitosis (CGA: campo de gran aumento: 40x).

E: extensión del tumor.

P: profundidad del tumor

TABLA 3.

EBC DE TIPO SIRINGOIDE.

SIRINGOIDES N°	AVI ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)	AR ($\mu\text{m}^2 \times 10^7$)	IVT	DM (CGA)	FCEV	M (CGA)	E (mm^2)	P (mm^2)
105041	75.4 ± 2.8	2.5 ± 0.7	0.30 ± 0.04	9 ± 1.5	3+	3 ± 0.8	17 ± 3.4	6 ± 0.8
104534	81.2 ± 2.7	2.2 ± 0.6	0.37 ± 0.05	3 ± 0.3	3+	4 ± 1.1	25 ± 3.1	10 ± 1.5
155132	66.2 ± 2.5	1.8 ± 0.5	0.37 ± 0.03	8 ± 0.9	3+	1 ± 0.6	15 ± 2.8	3 ± 0.7
173686	160.2 ± 5.3	5.8 ± 0.6	0.28 ± 0.04	13 ± 1.8	3+	7 ± 1.3	40 ± 4.3	10 ± 1.2
125464	180.5 ± 4.7	5.1 ± 0.7	0.35 ± 0.05	4 ± 0.2	2+	1 ± 0.3	60 ± 5.2	34 ± 3.1
103366	66.8 ± 2.9	3.4 ± 0.9	0.20 ± 0.06	3 ± 0.2	3+	4 ± 0.8	30 ± 2.8	9 ± 1.7
174173	178.6 ± 2.7	3.9 ± 0.6	0.45 ± 0.05	9 ± 1.7	3+	3 ± 0.2	0.4 ± 0.01	0.8 ± 0.01
X (promedio)	115.6 ± 3.4 * * p < 0.002	3.5 ± 0.7	0.3 ± 0.05 * * p < 0.001	7 ± 0.9	2.9 +	3 ± 0.7	26.8 ± 3.1 * * p < 0.001	10.4 ± 1.3* * p < 0.001

AVI: Area vascular inmunomarcada.

AR: Area de referencia.

IVT: Indice vascular tumoral.

DM: Densidad microvascular (CGA: campo de gran aumento: 40x).

FCEV: Factor de crecimiento endotelial vascular.

M: mitosis (CGA: campo de gran aumento: 40x).

E: extensión del tumor.

P: profundidad del tumor.

Datos ± ES.

TABLA 4.
EBC DE TIPO DESMOPLÁSICO.

DESMOPL. N°	AVI ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$)	AR ($\mu\text{m}^2 \times 10^7$)	IVT	DM (CGA)	FCEV	M (CGA)	E (mm^2)	P (mm^2)
166931	152.4 ± 4.9	7.0 ± 0.7	0.22 ± 0.06	14 ± 2.2	1+	1 ± 0.1	10 ± 1.5	4 ± 0.5
186034	76.1 ± 2.7	3.4 ± 0.5	0.23 ± 0.05	7 ± 1.3	2+	1 ± 0.2	22 ± 4.4	11 ± 1.9
173607	63.1 ± 2.5	5.1 ± 0.6	0.12 ± 0.02	18 ± 3	3+	1 ± 0.3	15 ± 2.1	5 ± 0.8
155140	134.7 ± 4.3	6.8 ± 0.6	0.20 ± 0.05	9 ± 1.4	3+	4 ± 0.2	24 ± 3.1	14 ± 2.2
147824	260.1 ± 7.6	7.2 ± 0.8	0.36 ± 0.12	15 ± 3.2	3+	1 ± 0.2	50 ± 5.8	6 ± 0.7
120761	151.1 ± 5.6	7.1 ± 0.8	0.21 ± 0.05	9 ± 1.6	3+	5 ± 0.7	43 ± 4.3	25 ± 3.2
216562	160.2 ± 3.2	5.3 ± 0.7	0.30 ± 0.09	8 ± 1.2	2+	0 ± 0	5 ± 0.9	2 ± 0.4
216841	65 ± 2.5	2.7 ± 0.5	0.24 ± 0.05	13 ± 2.6	2+	1 ± 0.1	10 ± 1.8	3 ± 0.7
107715	88.4 ± 2.7	6.5 ± 0.6	0.14 ± 0.03	11 ± 1.5	3+	1 ± 0.3	20 ± 4.5	8 ± 1.7
215285	134 ± 5.3	6.0 ± 0.7	0.22 ± 0.04	10 ± 1.3	3+	3 ± 0.4	26 ± 2.8	15 ± 2.4
X (promedio)	128.5 ± 4.1* * p < 0.002	5.7 ± 0.7	0.22 ± 0.06* * p < 0.001	11.4 ± 1.9* * p < 0.01	2.5 +	1.8 ± 0.3	22.5 ± 3.1* * p < 0.001	9.3 ± 1.5* * p < 0.001

Datos ± ES.

AVI: Area vascular inmunomarcada.

AR: Area de referencia.

IVT: Indice vascular tumoral.

DM: Densidad microvascular (CGA: campo de gran aumento: 40x).

FCEV: Factor de crecimiento endotelial vascular.

M: mitosis (CGA: campo de gran aumento: 40x).

E: extensión del tumor.

P: profundidad del tumor.

ANALISIS ESTADISTICO:

Grupo 1: ECB Superficial.
 Grupo 2: ECB Lobulado.
 Grupo 3: ECB Siringoide.
 Grupo 4: ECB Desmoplásico.

I. Para Factor VIII:

AVI: *Area vascular inmunomarcada.*

AR: *Area de referencia.*

IVT: *Indice vascular tumoral.*

IVT= AVI : (AR X 100)

ANOVA Table for super by Col_2

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	37300,9	3	12433,6	6,45	0,0023
Within groups	46272,8	24	1928,03		
Total (Corr.)	83573,7	27			

El test de Fisher supone por hipótesis que no hay diferencia entre los promedios de los grupos.

El valor de F = 6,45 que con un valor de P = 0,0023 resulta ser altamente significativo y se rechaza la hipótesis de nulidad.

Multiple Range Tests for super by Col_2

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Col_2	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	8	22,85	X
2	10	102,68	X
3	6	103,133	X
4	4	106,575	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-79,83	57,4711
1 - 3	*-80,2833	65,4337
1 - 4	*-83,725	74,1949
2 - 3	-0,453333	62,5666
2 - 4	-3,895	71,6791
3 - 4	-3,44167	78,2083

* denotes a statistically significant difference.

En el parámetro AVI, se concluye que el grupo 1 (subtipo Superficial) presenta diferencias significativas ($P < 0.002$) con todos los demás. No existen diferencias entre los grupos 2, 3 y 4 que tienen en promedio igual comportamiento.

Es decir, el tratamiento estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.002$) en las AVI, entre grupos Superficial-Lobulado, Superficial-Siringoide y Superficial-Desmoplásico.

B. Para IVT:

ANOVA Table for Col_5 by Col_6

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	0,19495	3	0,0649833	19,17
Within groups	0,0813358	24	0,00338899	
Total (Corr.)	0,276286	27		

Las diferencias son altamente significativas.

Tiene diferencias el 1 con el 2 y con el 3.

Tiene diferencias el 3 con el 4

El *Indice Vasclar Tumoral (IVT)* detectó diferencias significativas ($p < 0.001$) entre Superficial-Lobulado, Superficial-Siringoide y Siringoide-Desmoplásico.

Multiple Range Tests for Col_5 by Col_6

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Col_6	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	8	0,11125	X
4	4	0,1925	XX
2	10	0,266	XX
3	6	0,333333	X
Contrast			Difference
1 - 2			*-0,15475
1 - 3			*-0,222083
1 - 4			-0,08125
2 - 3			-0,0673333
2 - 4			0,0735
3 - 4			*0,140833

* denotes a statistically significant difference.

TABLA 5.
COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.
EBC DE TIPO SUPERFICIAL.

EBS	r =	IVT	DM	FCEV	M	E	P
N=8	Signif.		0,332	0,466	0,183	0,072	-0,330
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBS	r =	DM	FCEV	M	IVT	E	P
N=8	Signif.		0,327	-0,365	0,332	0,494	-0,023
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBS	r =	FCEV	DM	IVT	M	E	P
N=8	Signif		0,327	0,466	-0,745	0,036	-0,205
			N/S	N/S	A/S	N/S	N/S

IVT: *Indice Vacular Tumoral*

DM: *Densidad Microvascular (CGA 400X)*

FCEV: *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.*

M: *Mitosis (CGA 400 X)*

E: *Extensión tumoral*

P: *Profundidad tumoral*

r: *Coefficiente de Correlación de Pearson*

Se obtuvieron resultados significativos al comparar *Factor de Crecimiento Vascular (FCEV)* con conteo mitótico (**M**).

TABLA 6.
COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.
EBC DE TIPO LOBULADO.

EBL	r =	IVT	DM	FCEV	M	E	P
N=10	Signif.		0,232	0,267	0,379	0,349	0,136
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBL	r =	DM	FCEV	M	IVT	E	P
N=10	Signif.		0,214	0,263	0,232	0,135	-0,062
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBL	r =	FCEV	DM	IVT	M	E	P
N=10	Signif.		0,214	0,267	0,274	0,229	0,320
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S

IVT: *Indice Vacular Tumoral*

DM: *Densidad Microvascular (CGA 400X)*

FCEV: *Factor deCrecimiento Endotelial Vascular.*

M: *Mitosis (CGA 400 X)*

E: *Extensión tumoral*

P: *Profundidad tumoral*

r: *Coeficiente de Correlación de Pearson*

No se obtuvieron resultados significativos en este grupo

TABLA 7.
COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.
EBC DE TIPO SIRINGOIDE.

EBSIR.	r =	IVT	DM	FCEV	M	E	P
N=7	Signif.		0,726	-0,103	-0,418	-0,033	0,182
			A/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBSIR	r =	DM	FCEV	M	IVT	E	P
N=7	Signif.		0,174	-0,164	0,726	0,991	0,999
			N/S	N/S	A/S	A/S	A/S
EBSIR	r =	FCEV	DM	IVT	M	E	P
N=7	Signif.		0,317	-0,103	0,490	-0,760	-0,950
			N/S	N/S	N/S	N/S	A/S

IVT: *Indice Vacular Tumoral*

DM: *Densidad Microvascular (CGA 400X)*

FCEV: *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.*

M: *Mitosis (CGA 400 X)*

E: *Extensión tumoral*

P: *Profundidad tumoral*

r: *Coeficiente de Correlación de Pearson*

Se encontraron datos significativos al confrontar el *Indice Vacular Tumoral (IVT)* con la *Densidad Microvascular (DM)*. La *Densidad Microvascular (DM)* con la *Extensión tumoral(E)* y la *Profundidad tumoral (P)*. El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con la *Profundidad tumoral (P)*.

TABLA 8.
COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.
EBC DE TIPO DESMOPLASICO.

EBD	r =	IVT	DM	FCEV	M	E	P
N=10	Signif.		-0,19	-0,204	-0,181	-0,331	-0,174
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBD	r =	DM	FCEV	M	IVT	E	P
N=10	Signif.		0,111	-0,212	-0,16	0,014	-0,428
			N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
EBD	r =	FCEV	DM	IVT	M	E	P
N=10	Signif.		0,045	-0,204	-0,485	0,600	0,700
			N/S	N/S	N/S	N/S	A/S

IVT: *Indice Vacular Tumoral*

DM: *Densidad Microvascular (CGA 400X)*

FCEV: *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.*

M: *Mitosis (CGA 400 X)*

E: *Extensión tumoral*

P: *Profundidad tumoral*

r: *Coeficiente de Correlación de Pearson*

Se encontraron datos significativos al confrontar el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con la *Profundidad tumoral (P)*.

FIGURA 1

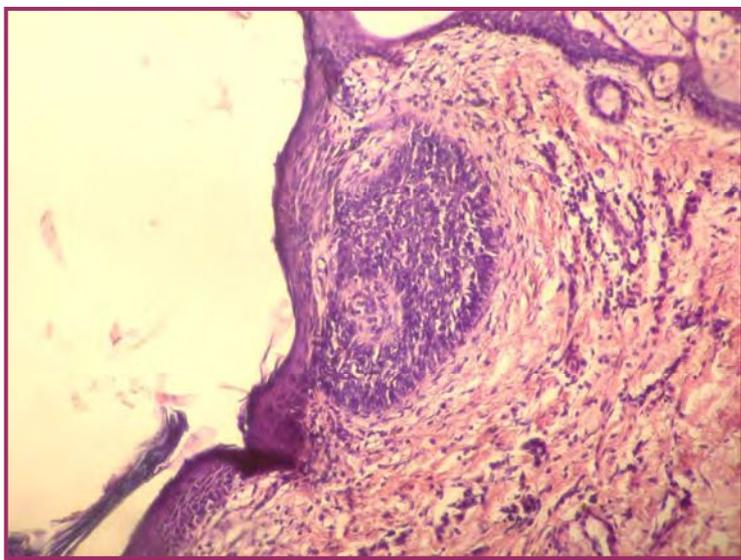


FIGURA 2

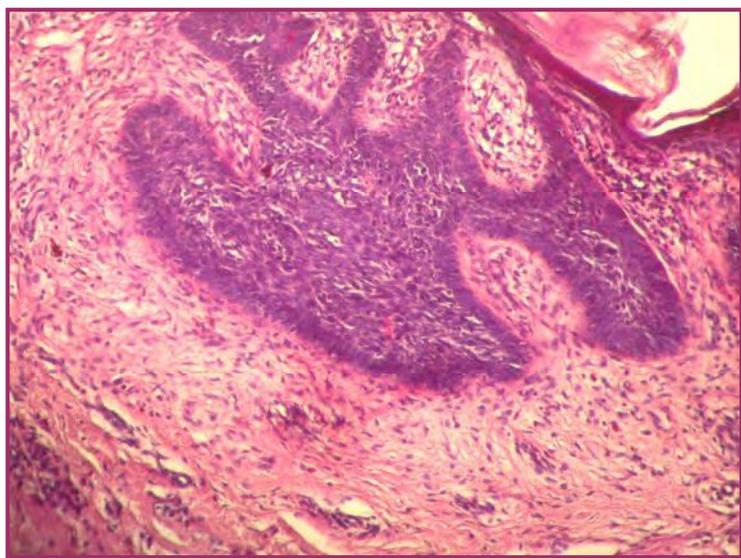


FIGURA 3

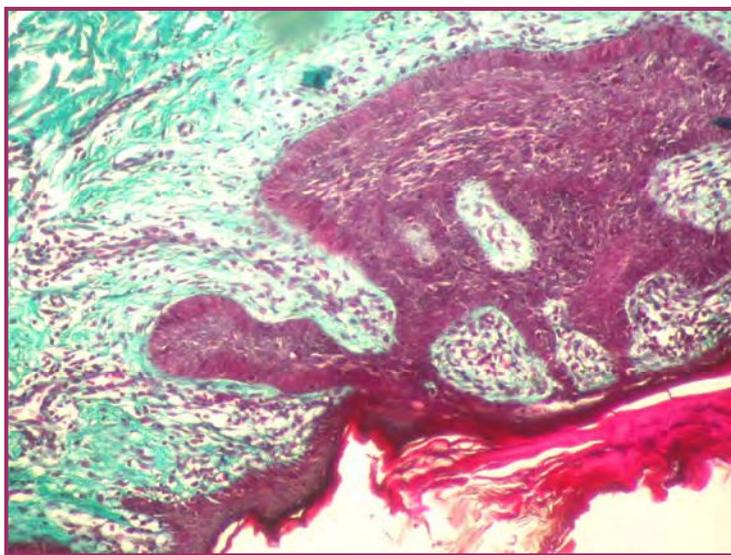


FIGURA 4

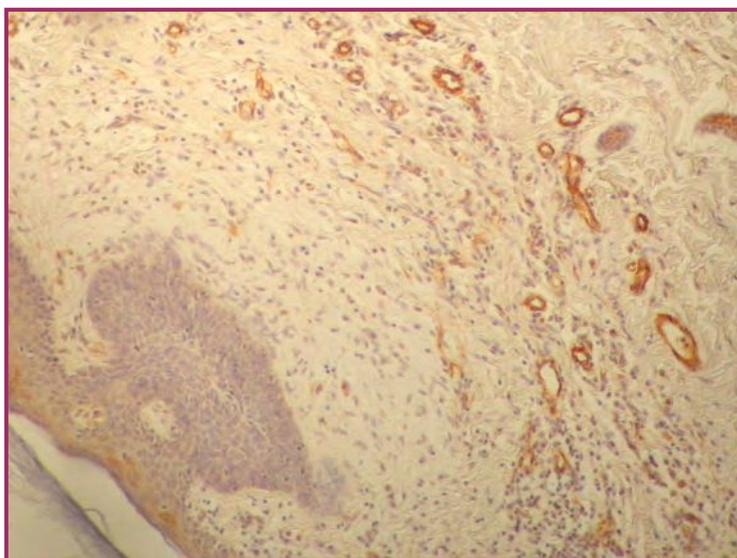


FIGURA 5

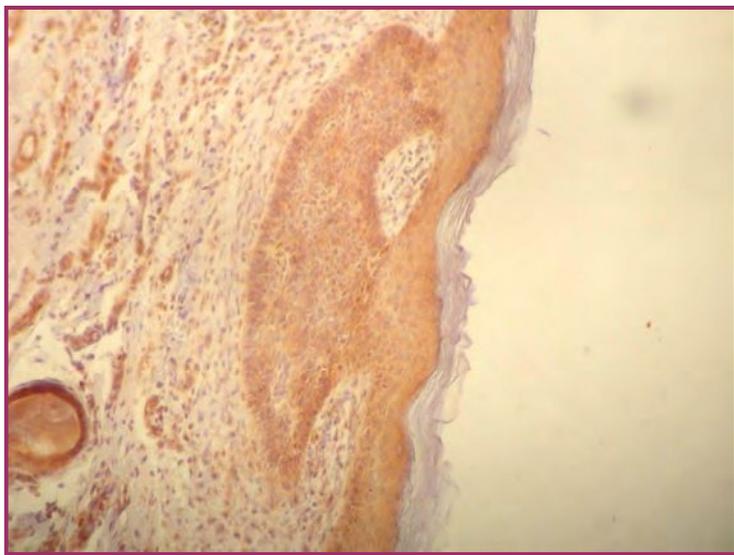


FIGURA 6

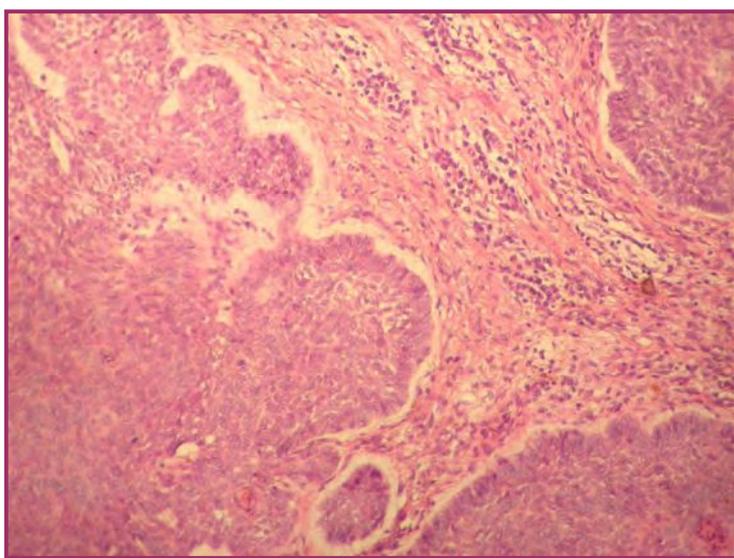


FIGURA 7

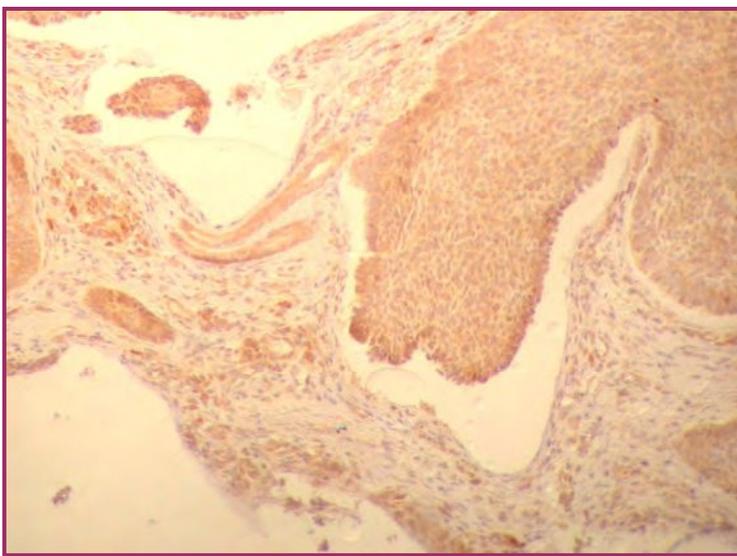


FIGURA 8

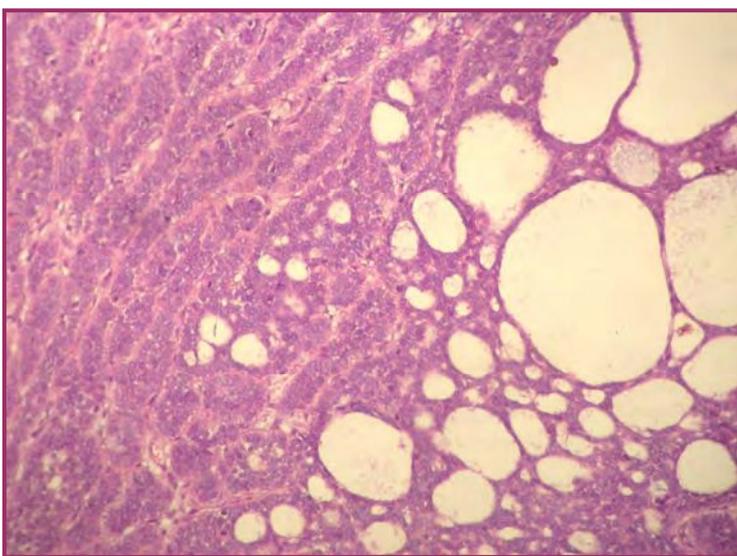


FIGURA 9

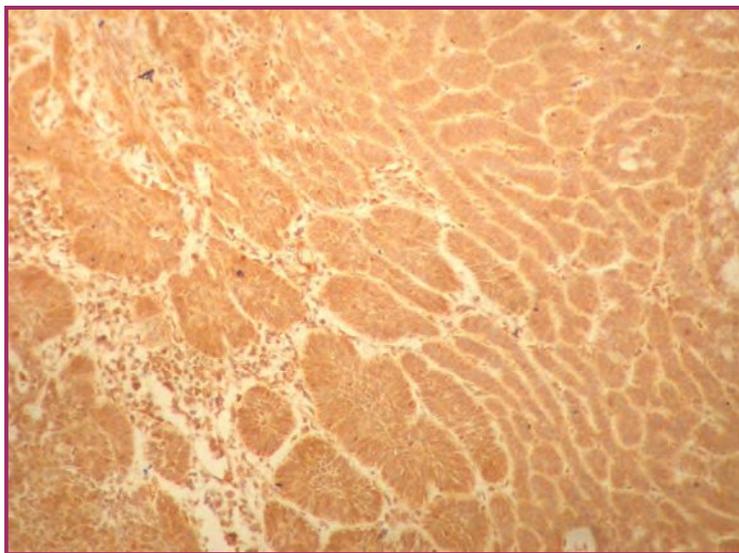


FIGURA 10

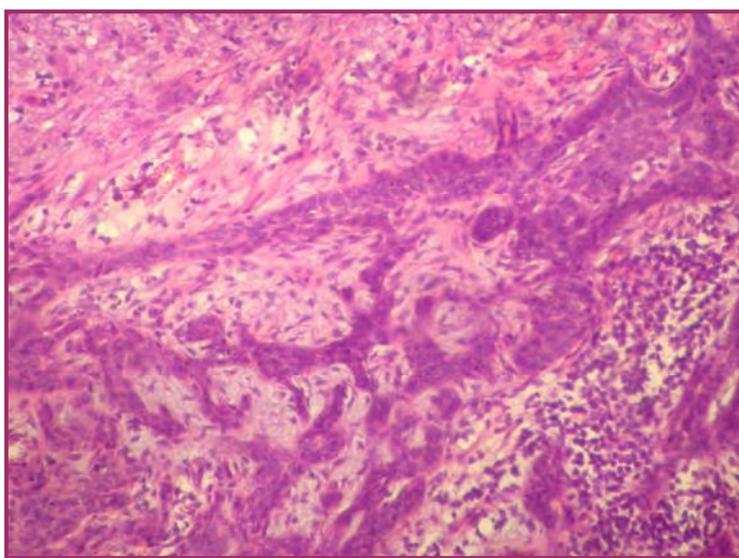


FIGURA 11

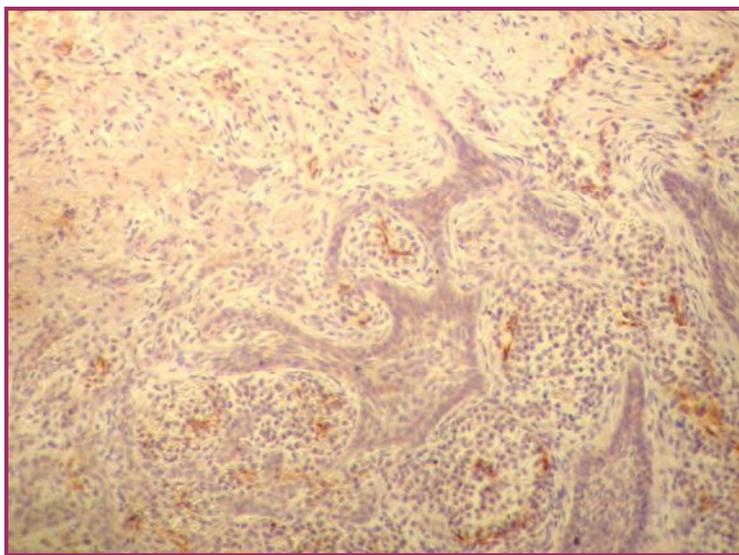
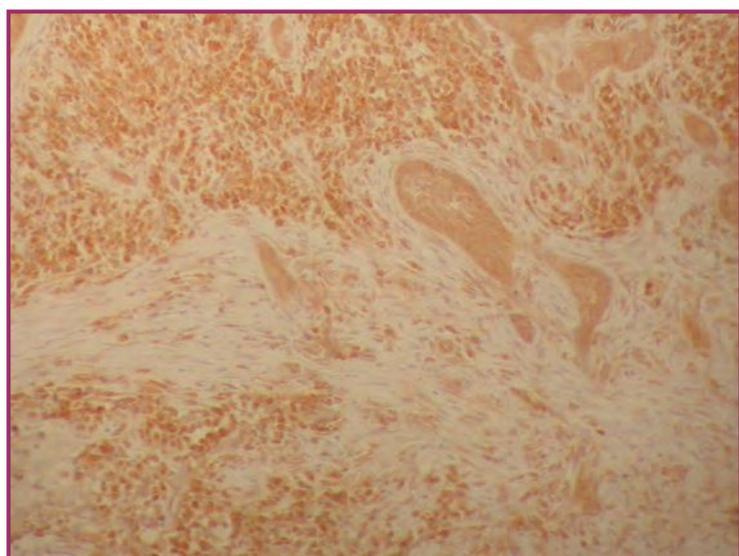


FIGURA 12



DISCUSIÓN

Numerosos autores han evaluado parámetros diversos a fin de analizar la angiogénesis en diferentes neoplasias. En nuestro estudio hemos analizado el *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* de los diferentes subtipos de EBC: Superficial, Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, y la *Densidad Microvascular (DM)*, mediante inmunomarcadores como el **Factor VIII** (marcador de células endoteliales) y entre los factores de angiogénesis, se eligió el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEFG)*. Nuestros datos mostraron que el *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* para **Factor VIII**, se correlacionó con la *Densidad Microvascular (DM)*, las *Mitosis (M)*, la *Extensión (E)* y la *Profundidad (P)* del tumor, hallándose valores significativamente ($p < 0.001$) elevados en los subtipos **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico** respecto al subtipo **Superficial**.

La expresión del *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* presentó altos valores para los subtipos Superficial y Siringoide. Distintos trabajos se han dedicado a su estudio tanto en patologías benignas como malignas, comunicándose datos interesantes sobre microvasculatura, factores angiogénicos y su relación con el pronóstico tumoral, que permitirían una comparación con nuestros resultados en los diferentes subtipos de EBC analizados. Se han comunicado significativos cambios en los diversos parámetros angiogénicos en correlación con el pronóstico clínico en

distintos tipos de neoplasias, como por ejemplo en melanomas y tumores de mama.

Al intentar establecer en qué momento de la progresión tumoral del melanoma se induce la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, diversos estudios analizaron melanomas cutáneos incipientes (con un espesor menor o igual a 1 mm), mostrando que la capacidad de inducción de la angiogénesis es adquirida por los mismos al pasar de la fase radial a la vertical, y que el desarrollo de dicha capacidad podría ser un paso decisivo en la adquisición del fenotipo metastásico en el melanoma cutáneo (Strivastava y col., 1986; Marcoval Caus y col, 1999).

La vascularización fue un factor independiente y de importante pronóstico en 9 trabajos con 695 pacientes, que estudiaron melanomas coroidal y de los cuerpos ciliares invasores (Fox, 2001). Uno de los trabajos que merece comentarse es el de Neitzel y Neitzel (1999), que demostró la correlación entre angiogénesis y presencia simultánea de metástasis en melanoma, con la observación de que los pacientes con metástasis a distancia tienen mayor vascularización que los casos con metástasis ganglionar, planteando la necesidad de efectuar estudios prospectivos para determinar si un número determinado de vasos actuaría como indicador de la presencia de metástasis oculta, lo cual permitiría ubicar a estos pacientes en quimioterapia adyuvante y linfadenectomía. En otro estudio, la

expresión de FCEV-C, que posee alta especificidad por el endotelio linfático, se relacionó con la linfangiogénesis tumoral y la diseminación linfática metastásica. Por consiguiente, se correlacionó con la presencia de metástasis de melanoma en ganglios linfáticos, sugiriendo que la expresión de FCEV-C en melanoma primario cutáneo podría ser predictiva de diseminación ganglionar (Schietroma, 2003). Otros autores analizaron distintos estadios de melanoma y concluyeron que la expresión de FCEV en melanomas de 1.5 a 3 mm de espesor, podría ser considerada un factor pronóstico desfavorable por estar asociados a metástasis (Redondo, 2003). Se constató alta positividad (77%) para FCEV en melanomas invasores, baja positividad (25%) para melanomas *in situ*, y ausencia de reactividad en nevus melanocíticos benignos, nevus de Spitz y displásicos (Simonetti y Lucarini, 2002). Su sobreexpresión además promovió la aceleración en el crecimiento tumoral, el aumento de la angiogénesis y la formación de metástasis (Graells, 2004). También se habló acerca de diferentes expresiones de isoformas A de FCEV en diferentes estadios de progresión de melanomas, produciéndose más en la fase de crecimiento vertical que en la horizontal. A su vez, las metástasis ganglionares produjeron los niveles más altos de FCEV 121 y FCEV 165, pero no FCEV 189, sugiriendo que la formas soluble de FCEV-A podría ser un factor importante en las metástasis de melanoma en los ganglios regionales (Gorskhi, 2003). Nuestros

resultados, al ser comparados con lo comunicado en FCEV de melanomas, no reflejaron una correlación con el estadio de crecimiento tumoral.

La expresión del *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* en las células tumorales del Carcinoma *in situ* de mama (CDIS) fue mayor respecto al tejido benigno ductal o lobular adyacente, y podría asociarse significativamente con el grado de vascularización, lo cual sugirió que el FCEV actuaría como un factor angiogénico importante en la neovascularización relacionada con el CDIS mamario (Guidi y Schnitt, 1997). El FCEV se expresó más frecuentemente en las áreas tumorales que en las no tumorales y cada expresión se correlacionó con el área de angiogénesis de potencial metastático, aunque no se observó diferencia significativa en la expresión de FCEV entre tumores con o sin metástasis ganglionares (Keisei y Morisaki, 1996).

En el cáncer mamario invasor, la angiogénesis puede ser un predictor independiente de metástasis axilares, a distancia o de ambas. El conteo vascular podría ser válido entonces para seleccionar pacientes con cáncer mamario temprano, a fin de ser incluidos en tratamientos más agresivos (Weidner y Semple, 1991).

En 46 publicaciones sobre angiogénesis con 7345 pacientes en total, usando marcadores para Factor VIII, CD31, CD34, integrinas, CD105, FVI, se comunicaron resultados en estadios I y II de la

enfermedad y con un seguimiento de 2 a 16 años. Todos los estudios fueron retrospectivos, de los cuales 31 de 41 estudios presentaron un período libre de enfermedad y 23 de 30 estudios con supervivencia total, encontrándose una asociación estadística entre el conteo vascular y las metástasis (Fox, 2001).

Entre los factores proangiogénicos el más estudiado es el FCEV. En 12 estudios, incluyendo 3688 pacientes, se demostró la asociación entre FCEV y cáncer de mama. Inclusive en estudios recientes, se ha demostrado que no sólo posee valor pronóstico sino que predeciría el sitio anatómico de recurrencia. Las pacientes que desarrollaron metástasis cerebrales, viscerales y de partes blandas, tenían un contenido significativamente alto de FCEV, con respecto a aquéllas que presentaron recurrencias óseas. Ocho estudios retrospectivos de 1649 casos mostraron la asociación entre timidina fosforilasa y un período libre de enfermedad o supervivencia. La mayoría de los estudios encontraron que el FCEV tendría valor pronóstico en el subgrupo de pacientes tratadas con terapia adyuvante, y que estaría directamente relacionado con la efectividad de la terapia porque activaría una de las prodrogas utilizadas (Fox, 2001). También se intentó relacionar lesiones hiperplásicas mamarias con aumento de la vascularización y riesgo de transformación neoplásica (Brem y col., 1978).

Otro tipo tumoral en el que se comunicó información sobre el valor pronóstico de la vascularización es el cáncer de pulmón (descartando el de pequeñas células). Se analizaron 14 estudios, en los que se estudiaron 2450 pacientes con marcación del Factor VIII, CD31 y CD34, con un seguimiento de 2 a 8 años. De 14 estudios, 10 resultaron positivos en términos de supervivencia total, incluyendo 7 de 8 con análisis multivariado (Fox, 2001).

En el cáncer de próstata, se realizaron 4 estudios con 516 pacientes en los que se encontró correlación entre vascularización y pronóstico (Fox, 2001). Un trabajo interesante es el de García y Taylor (2000), donde se observó que dentro del cáncer prostático las paredes de las arterias nativas poseen marcada hiperplasia de la media, inclusive con ocasional aumento de la fibrosis con hialinización focal de la adventicia en los vasos asociados al tumor. La primera característica, cuando estuvo presente, puede predecir un estadio T3, asociándose a un Gleason grado 4.

Por otra parte, se observó que el *Factor tisular* (FT) se relacionó con el desvío angiogénico al promover la liberación de factores como *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* e inhibir a otros como la trombospondina 2. En esta ocasión, el 73% de los tumores estudiados expresaron altos niveles de FT en el epitelio glandular atípico, asimismo el FT se correlacionó con la densidad vascular y con el nivel sérico del antígeno prostático ácido (PSA) preoperatorio,

sugiriendo un rol en la regulación de la progresión del cancer prostático y angiogénesis (Abdulkadir y Carbalhal, 2000).

Otros grupos de trabajos han encontrado resultados contradictorios relacionados con el carcinoma papilar de tiroides, donde se observó que la angiogénesis fue importante para el desarrollo y mantenimiento de los carcinomas papilares, aunque no se lo identificó como un factor pronóstico independiente. Este estudio indicaría simplemente que el aumento de la angiogénesis no es necesario para el desarrollo de estos tumores, ya que es sabido que se diseminan preferentemente por vía linfática, tal como sucede con el cáncer de colon. Por lo tanto, no sería indicador pronóstico en este tipo de tumores (Weidner, 2000; Akslen y Livolsi, 2000). No se han obtenido los mismos resultados en el carcinoma medular de tiroides, donde la densidad vascular sí fue predictiva de su evolución (Fontanini y Viganati, 1996). Se observó que la expresión de niveles de FCEV en tumores malignos tiroideos fue a menudo más alta que en tejidos normales o en tumores menos agresivos. La expresión fue mayor en las células que cubren estructuras papilares que en las que forman folículos, lo cual sugeriría que los tipos histológicos de tumores tiroideos pueden determinar el patrón vascular a través de un mecanismo paracrino que involucraría al *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*. La expresión del mismo aumentaría además en carcinomas indiferenciados, concomitantes con focos de

necrosis en forma similar a lo que sucede en neoplasias del sistema nervioso central, lo cual representaría un evento importante en la transición de tumores de bajo a alto grado (Riohei, 1999).

Se ha observado que la progresión anaplásica de los astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas es anunciada por pequeñas zonas de expresión de células inmunomarcadas con FCEV y proliferación vascular temprana, seguida por una fase acelerada de angiogénesis estrechamente relacionada con inducción de FCEV alrededor de áreas de necrosis y expresión de receptores de FCEV en la vasculatura tumoral (Chan, 1998).

El carcinoma renal se caracteriza naturalmente por su abundante vascularización y se ha demostrado que sobreexpresa FCEV a nivel de ARN mensajero y ribosómico (Guangbin, 2001).

En un estudio con sobreexpresión de FCEV en Epiteliomas Espinocelulares y Epiteliomas basocelulares de cabeza y cuello, se encontró una relación estadística significativa entre la expresión de FCEV en los epiteliomas espinocelulares y el grado de diferenciación tumoral, no hallándose una relación con otras variables clínicopatológicas como son la profundidad de invasión y el tamaño tumoral. En los EBC, se comunicó que los tumores se inmunomarcaron predominantemente sobre su borde invasor, no observándose asociación con ninguna variable clínicopatológica como el tamaño

tumoral, el subtipo histológico o el tiempo de evolución tumoral (Bowden y col., 2002).

Otro trabajo comparativo mostró un mayor incremento de la vascularización y un aumento de niveles de FCEV en carcinomas epidermoides con respecto a epitelomas basocelulares, sugiriendo el posible rol de la angiogénesis como determinante de la conducta biológica más agresiva del primer tipo de tumores (Loggini y col., 2003).

Por lo expuesto, los resultados de valoración de los factores angiogénicos resultaron variables según el tipo tumoral y el estadio de evolución. Es por ello, que se eligió valorar el desarrollo del proceso de angiogénesis en los EBC mediante el análisis de sus promotores como el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* o por su expresión morfológica mediante el *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* con el marcador endotelial denominado **Factor VIII**. La ventaja del método morfológico es que permite apreciar topográficamente el lecho vascular neoformado y valorar el área peritumoral.

En nuestra casuística, se observaron variaciones del *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* para **Factor VIII** aplicado a cada subtipo de EBC. El **IVT** mostró descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo Superficial respecto a los subtipos de EBC Lobulado, Siringoide y Desmoplásico. Llama la atención el no haber encontrado

valores más altos de **IVT** en el caso de los Desmoplásicos, dada su naturaleza más agresiva pero quizás la explicación reside en la abundante cantidad de tejido conectivo denso intercalar característico de esta lesión. El **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)** mostró las más altas inmunomarcaciones en los subtipos Superficial y Siringoide. Es de remarcar, la mayor positividad en la empalizada periférica tumoral, fenómeno observado con mayor claridad en los subtipos Superficial y Lobulado, aparente *frente de expansión* de la neoplasia en desarrollo. Esto nos hablaría no tanto de agresividad tumoral, sino de un tumor en estadio incipiente, preparándose para una etapa de crecimiento y de invasión posterior, con posible evolución hacia cualquiera de los subtipos estudiados.

Si bien el conteo mitótico no sería un índice categórico en los EBC, dado que son tumores con amplia actividad mitótica *per se*, se observó correlación entre conteo de *Mitosis* elevado en los subtipos Lobulado y Siringoide. Con respecto al tamaño, se halló mayor *Extensión* y desarrollo en *Profundidad* en los subtipos Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, con muy bajos valores en el subtipo Superficial.

En nuestros resultados, la aplicación del *Coefficiente de Correlación de Pearson* permitió inferir una relación entre el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* y el conteo de *Mitosis* para el EBC Superficial, tumor relacionado en párrafos anteriores con

alto índice de marcación para **FCEV**. También se demostró correlación entre los valores de **FCEV** para los EBC Siringoides y Desmoplásicos con la *Profundidad (P)* del tumor. Estos últimos datos nos permitirían relacionar el FCEV con el tamaño tumoral y, en el caso de los Superficiales con un momento de crecimiento activo.

En algunos de nuestros casos se observaron lesiones asociadas con mastocitos y linfocitos estromales, resultando de interés ya que jugarían un rol activo en la angiogénesis de los EBC a través de la producción de FCEV, IL-8 y RANTES, al haber correlación significativa entre células FCEV positivas y conteo de microvasos. También se demostró que los linfocitos T memoria son la población linfocitaria predominante en estos casos, y habitualmente fueron vistos cerca de los mastocitos sugiriendo la posibilidad de activación por contacto directo de los mismos (Aoki y col., 2003).

En conclusión, de lo expuesto se deduce que el **Factor VIII** fue muy eficaz para calcular y analizar el *Area Vascolar Inmunomarcada (AVI)*, la *Densidad Microvascular (DMV)* y el *Indice Vascolar Tumoral (IVT)*, obteniéndose los valores más altos en los subtipos Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, que demostraron además un desarrollo más amplio en Extensión y Profundidad.

Por otra parte, el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar (FCEV)* se expande en el área tumoral con altos valores en los subtipos **Superficial y Siringoide**, no permitiendo inferir un

pronóstico de mayor agresividad en la conducta biológica de los EBC, respecto a lo comunicado en carcinomas, melanomas y epitelomas espinocelulares.

CONCLUSIONES

1. El crecimiento tumoral sería angiogénesis-dependiente. *La angiogénesis está regulada normalmente por numerosos factores proangiogénicos que estimulan el crecimiento tumoral. La neovascularización promueve el crecimiento porque aporta nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento proangiogénicos paracrinos a las células tumorales tales como: el Factor de Crecimiento Insulino-símil (IGF-1), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF-2) y el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV).* En las neoplasias, los cambios agudos en el flujo sanguíneo son regulados en respuesta a las necesidades tisulares por cambios en la perfusión tisular que determinan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos o su regresión. Para que los tumores crezcan, las células no sólo deben proliferar, sino que el tejido colindante, propio del huésped, debe aportar nuevos vasos sanguíneos al área peritumoral.

2. Los parámetros histométricos analizados *nos permitieron aportar datos al proceso de angiogénesis en los diferentes subtipos de EBC, mediante técnicas de microscopía óptica, aplicando histoquímica e inmunohistoquímica morfométrica (videomicroscopía).*

3. El Índice Vascular Tumoral (IVT) para el Factor VIII, *obtenido al relacionar el Area Vascular Inmunomarcada (AVI) y el Area de Referencia (AR),* **mostró un descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo Superficial respecto a los subtipos Lobulado,**

Siringoide y Desmoplásico. Llama la atención el no haber encontrado valores más altos de *IVT* en el caso de los Desmoplásicos, dada su naturaleza más agresiva, pero quizás la explicación resida en la abundante cantidad de tejido conectivo denso intercalar propio de esta lesión.

4. La Densidad Microvascular (DM) mostró ascenso significativo ($p < 0.01$) en los subtipos Lobulado y Desmoplásico respecto a los subtipos restantes.

5. El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) mostró las más altas inmunomarcaciones en los subtipos Superficial y Siringoide. Se halló mayor positividad en la empalizada periférica tumoral, característica de los EBC Superficiales, aparente *frente de expansión* de la neoplasia en desarrollo. Esto no indicaría agresividad tumoral, sino un tumor en estadio incipiente, preparándose para una etapa de crecimiento.

6. Las Mitosis (M) mostraron un incremento no significativo en los subtipos Lobulado, Siringoide y Desmoplásico respecto al Superficial.

7. La Extensión (E) y la Profundidad (P) tumoral presentaron un aumento significativo ($p < 0.001$) en los subtipos Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, con muy bajos valores en el Superficial.

8. El Coeficiente de Correlación de Pearson mostró datos significativos al relacionar el *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con la *Densidad Microvascular (DM)* (0.726); la *Densidad Microvascular (DM)* con la *Extensión (E)* (0.991) y la *Profundidad del tumor (P)* (0.999) para el subtipo Siringoide. También se correlacionó el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con las *Mitosis (M)* (-0.745) en el caso de los EBC Superficiales y con la *Profundidad (P)* del tumor en el caso de los EBC Siringoides (-0.950) y Desmoplásicos (0.700).

9. De lo expuesto se deduce que **el Factor VIII fue muy eficaz para analizar** el *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* y el *Indice Vascular Tumoral (IVT)*, obteniéndose los valores más altos en los subtipos Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, en concordancia con varias de las publicaciones en las que el IVT se relacionó con estadios tumorales más avanzados.

10. El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) se expande en el área tumoral con altos valores en los subtipos *Superficial* y *Siringoide*, no permitiendo inferir un pronóstico de mayor agresividad en la conducta biológica de los EBC, respecto a lo comunicado en carcinomas, melanomas y epitelomas espinocelulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkadir S and Carvalhal G: Tissue factor and angiogenesis in human prostate carcinoma. Human Pathol 31: 443-447, 2000.

- Akslen L and Livolsi V: Increased angiogenesis in papillary thiroyd carcinoma but lack of prognostic importance. Hum Pathol 31: 439-442, 2000.

- Aoki M: Mast Cells in Basal Cell Carcinoma express FCEV, IL-8 and Rantes. Allergy and Inmunology 130: 216-223, 2003.

- Bowden J and Brennan PA: Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. J Cutan Pathol 29: 585-589, 2002.

- Brem SS, Jensen HM, Gullino PM: Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. Cancer 41: 239-244, 1998.

- Chan A: Expression of Vascular endothelial Growth Factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma and ependimoma. Am J Surg Pathol 22 (7): 816-826, 1998.

- Compendio del Registro del Cáncer de la Pcia. de Bs As. Período 1996-1998. Registro Provincial del Cáncer. Ministerio de Salud de la Pcia. de Bs As. Fundación Fundonar. Ediciones CATA, 1999.

-Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology

and function of pituitary lactotropes in male golden hamster. *Neuroendocrinology* 75: 316-325, 2002.

-Cónsole GM, Rulli SB, Riccillo F, Calandra R, Gómez Dumm C. Effects of androgens and antiandrogens on the quantitative immunohistochemistry of gonadotrope cells in prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 70: 261-267, 1999.

-Cónsole GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by non steroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepuberal male rats. *Cells, Tissues & Organs* 169: 64-72, 2001.

- Couffinhal T and Silver M: Animal mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152(6): 1667-1679, 1998.

- Cueto JJ, Stoichevich FM, Daroda AJ, Castelletto RH: Epitelioma basocelular. Investigación de factores etiológicos, de su clínica y evaluación de su tratamiento. Publicado en

la Revista de la Fundación José M.Mainetti para el Progreso de la Medicina. Año 1975.

- Fernández Aceñero MJ, Fariña González J, Galindo Gallego M, Aragoncillo Ballesteros P: Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 16: 1684-1688, 1998.

- Folkman J: What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 361-363, 1987.

- Fontanini J and Vignati S : Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathology* 9: 636-641, 1996.

- Fox S: Angiogenesis: pathological, prognostic and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *The Lancet Oncology* 2: 27-89, 2001.

- Frede S: Aspectos biomoleculares del carcinoma basocelular y su relación con las metástasis. *Arch Argent Dermatol* 52: 137-141, 2002.

- García F and Taylor C: Increased cellularity of tumor-encased native vessels in prostate carcinoma is a marker for tumor progression. *Mod Pathol* 13(7): 717-722, 2000.

- Gasparini G and Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in Breast carcinoma. Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 13: 765-782, 1995.

- Gorski DH: Differential expression of vascular endothelial growth factor. A isoforms at different stages of melanoma progression. *J Am Coll Surg* 197 (3): 408-18, 2003.

- Graells J: Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells

trough MAPK and P13K signaling. *J Invest Dermatol* 123 (6): 1151-1161, 2004.

- Guangbin M: Regulation of vascular endothelial growth factor transcription by endothelial PAS domain protein 1 (EPAS 1) and possible involvement of EPAS 1 in the angiogenesis of renal cell carcinoma. *Cancer* 91: 1429-36, 2001.

- Guidi A and Schnitt S: Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 80: 1945-53, 1997.

- Ionescu M and Arida M : Metastatic Basal cell carcinoma : four case reports, review of literature, and Immunohistochemical evaluation. *Arch Pathol Lab Med*: 130 (1): 45-51, 2006

- Jouanneau J, Moens G, Montesano R, Thiery JP: FCF-1 but not FCF-4 secreted by carcinoma cells promotes in vitro and in vivo angiogenesis and rapid tumor proliferation. *Growth Factors* 12: 37-47, 1995.

- Keisei A and Morisaki T: Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 119: 333-339, 1996.

- Lauren J, Gunji Y, Alitalo K: Is angiopoietin-2 necessary for initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153 (5): 1333-1339, 1998.

- Lindmark G, Gedin B, Sundberg C: Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 461-466, 1996.
- Loggini B: CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 199 (11): 705-712, 2003.
- Maeda K, Chung YS, Takatsuka S: Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 13: 477-481, 1995.
- Marcoval Caus J, Moreno Carazo A, Fabra Fres A: Angiogénesis en el melanoma cutáneo. *Piel* 13 (1): 1-3, 1999.
- McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surgery* 85: 1044-1055, 1998.
- Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP: Wild-type P53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 55: 6161-6165, 1995.
- Murphy P: Chemokines and the molecular bases of cancer metastasis. *New England Journal Med* 345 (11): 833-835, 2001.
- Neitzel L and Neitzel C: Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Annals of Surgical Oncology* 6 (1) :70-74, 1999.

- O' Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285, 1997.

- O' Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M : Angiostatin: an novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328, 1994.

- Ortiz Hidalgo C and Reynoso G: Angiogenesis tumoral. *Patología* 32: 43-48, 1994.

- Redondo P: Immunologic escape and angiogenesis in human malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 49 (2): 255-63, 2003.

- Riohei K: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and human thyroid neoplasms. *Hum Pathol* 30: 891-897, 1999.

- Rippey JJ : Why classify basal cell carcinoma? *Histopathology* 32: 393-398, 1996.

- Robinson J and Dahy M: Basal Cell Carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death. *Arch Dermatopathol* 139(5): 643-648, 2003.

- Schietroma C :Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastasis. *Cancer* 98 (4): 789-97, 2003.

- Simonetti O and Lucarini G: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 95 (9): 1963-1970, 2002.

- Staibano MD, Boscaino A, Salvatore G, Orabona P, Palombini L, De Rosa G: The prognostic significance of tumor angiogenesis in nonagresive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol* 27: 695-700, 1996.

- Strivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcok J, Shedden EJ: Neovascularization in human cutaneous melanoma: A quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 1205-1209, 1986.

- Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR: Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Nat Cancer Inst* 88: 1146-1151, 1996.

- Tarin D: Prognostic markers and mechanisms of metastasis. *Recent Advances in Histopatology* 17:15-47, 1997.

- Weider N and Semple J: Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *New England J Med* 324: 1-8, 1991.

- Weidner N. Editorial Note: Angiogenesis as a Predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol* 31 (4): 403-405, 2000.
- Weidner N: Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 147(1): 9-19, 1995.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143: 401-409, 1993.
- World Health Organization, Classification of Tumours. Skin Tumours Pathology and Genetics. Edited by Philip E. Le Boit, G. Buró, D. Weedon, A. Sarasin. IARC. Press, Lyon, pp 13-19, 2006.
- Williams JK, Carlson GW, Cohen C: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 168: 373-380, 1994.
- Yen L and You XL: Heregulin selectively upregulates FCEV secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 19: 3460-3469, 2000.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN:

El Epitelioma (Carcinoma) Basocelular (EBC) es una neoplasia epitelial maligna de la piel que se localiza con frecuencia en las áreas de exposición solar, siendo el cáncer más común en el ser humano. Junto con el carcinoma epidermoide abarcan el 90 % de los tumores cutáneos malignos con una relación de 5:1 del EBC con respecto al epidermoide. La exposición solar tiene capital importancia en la histogénesis del EBC, presentando un efecto radiante acumulativo. La relación causa-efecto (radiación solar / EBC) justifica la ubicación preferencial del EBC en áreas expuestas: en un 80% se presenta en la zona de cabeza y cuello, mientras que en un 15% en hombros, espalda y pecho.

El EBC muestra una amplia variabilidad citomorfológica; no obstante se refieren características comúnmente observadas, con algún predominio alternante según el subtipo observado, a saber:

1-Agregados de células basaloideas formando estructuras de distinto tamaño y forma.

2-Células de núcleo algo alargado dispuestos en la periferia de los agregados conformando dibujos en empalizada.

3-Estroma con abundantes mucopolisacáridos o en otros casos, desmoplasia significativa.

4-Clivaje periepitelial debido a la acumulación de mucopolisacáridos.

5-Cantidad variable de infiltrado inflamatorio constituido habitualmente por linfocitos T colaboradores.

6-En líneas generales, predominio del componente epitelial sobre el estromal.

Es evidente que a los fines prácticos es conveniente acotar las variantes, y es así que para el presente estudio consideramos los principales subtipos siguientes:

1. Superficial o pagetoide: pequeñas islas de tejido tumoral, que representan algo así como un facsímil de un brote germinal folicular en conexión con la superficie epidérmica, y habitualmente, relegadas a la dermis superficial.

2. Lobulado-quístico: corresponde al 70% de los casos, presentando células tumorales que se disponen en islas o lóbulos de aspecto geográfico, con empalizada periférica.

3. Siringoide o infiltrante: elongadas ramificaciones tumorales que infiltran el tejido conectivo colindante, siguiendo un patrón reticular, con mucina estromal muchas veces prominente. Este patrón es bastante infrecuente en forma pura, pudiendo ocurrir con más frecuencia asociado a las formas sólidas.

4. Desmoplásico o esclerodermiforme: pequeñas islas y elongados regueros de células tumorales embebidos en abundante tejido conectivo denso.

El proceso de angiogénesis comprende la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente, normalmente suprimida y observable sólo en forma fisiológica y temporariamente durante la reproducción, desarrollo embrionario y cicatrización. La angiogénesis sostenida se observa en enfermedades como diabetes, psoriasis y artritis reumatoidea, siendo esencial para el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

Los promotores e inhibidores angiogénicos pueden originarse de células neoplásicas, que a su vez pueden reclutar células inflamatorias como macrófagos, plaquetas y mastocitos, ambos ricos suministros de factores angiogénicos y citoquinas, o liberar factores de crecimiento o sus receptores reclutados de la matriz extracelular. La producción de la neovascularización es un proceso complejo en múltiples pasos. Las células endoteliales tienen una conducta "invasora" en base a la secreción de colagenasas, uroquinasas y factor activador del plasminógeno, enzimas que a su vez facilitan la diseminación de las células neoplásicas a través del estroma y de los vasos colindantes. Tal es así, que se han hallado niveles elevados de activador-inhibidor-1 plasminógeno y activador de plasminógeno uroquinasa, en asociación con un mal pronóstico. Los pequeños vasos neoformados inicialmente se mueven como una cuerda sólida hacia el tumor, pero más tarde se desarrollan espacios inter e intracelulares que forman la luz vascular, y finalmente los vasos se anastomosan

para formar una malla vascular nueva. Hay que recordar que las células endoteliales, en ausencia de los factores de supervivencia, sufrirían apoptosis. Ellos son: *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*, angiopoyetina I, integrinas, fibronectina y fibrinógeno. El análisis de la angiogénesis tumoral en los distintos subtipos de EBC puede ser abordado mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos de la angiogénesis. Este fenómeno ha sido estudiado en la actualidad en un número creciente de neoplasias, considerando las posibilidades futuras de desarrollar terapéuticas específicas que regulen el sustento nutricional de la masa celular en crecimiento.

1. OBJETIVOS GENERALES.

Efectuar un aporte al conocimiento del proceso de angiogénesis en los diferentes subtipos de EBC, analizando la relación entre los diferentes parámetros angiogénicos mediante técnicas inmunohistoquímicas morfométricas con marcadores específicos.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.1 **Estudiar el proceso de angiogénesis tumoral** en los diferentes subtipos histopatológicos de EBC: Superficial, Lobulado, Siringoide y Desmoplásico, *mediante microscopía óptica, aplicando técnicas de rutina, histoquímicas e inmunohistoquímicas morfométricas.*

2.2 Analizar los valores del Índice de Vascularización Tumoral (ITV) de los diferentes subtipos de EBC, por medio de los parámetros del Area Vascular Inmunomarcada (AVI) y del Area de Referencia (AR), considerando que $IVT = AVI : AR \times 100$, utilizando marcadores inmunohistoquímicos: el FACTOR VIII (marcador de células endoteliales) y el FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (FCEV) que marca las células tumorales, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas.

2.3 Detectar posibles cambios histopatológicos en las áreas vasculares intra y peri tumorales en los diferentes subtipos de EBC.

2.4 Correlacionar los parámetros de la Densidad Microvascular (DM), Mitosis (M), Extensión (E) del tumor y Profundidad (P) del tumor, con los marcadores inmunohistoquímicos (Factor VIII y FCEV) en los diferentes subtipos de EBC.

2.5 Analizar la conducta biológica de los EBC Superficial, Lobulado, Siringoide y Desmoplásico para evaluar el proceso de angiogénesis, a través de los parámetros enunciados.

3. MATERIAL Y METODOS

Se diseñó un estudio de 35 piezas operatorias con resección completa, en pacientes de ambos sexos, de los grupos etáreos más expuestos a la radiación solar y provenientes de Institutos Privados.

Fueron diagnosticadas considerando los distintos subtipos clásicos de EBC: *Superficial*: 8, *Lobulado*: 10, *Siringoide*: 7 y *Desmoplásico*: 10.

El trabajo inmunohistoquímico morfométrico fue realizado en la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP que cuenta con laboratorios de técnica histológica y un analizador de imágenes mediante videomicroscopía (Imaging Technology, programa Optimas 5.2).

Se procedió a evaluar el ÍNDICE DE VASCULARIZACIÓN TUMORAL (IVT) de los diferentes subtipos de EBC, utilizando los marcadores inmunohistoquímicos: el **FACTOR VIII** (marcador endotelial) y el FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (**FCEV**). Se correlacionó con los parámetros de la *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión (E)* y *Profundidad (P)* del tumor. Se tomaron como controles de cada subtipo muestras de piel sanas, correspondientes a bordes de sección libres de neoplasia de la pieza quirúrgica considerada.

METODOLOGÍA APLICADA:

1. Técnicas de microscopía óptica:

Las muestras fueron fijadas en formol tamponado, incluidas en parafina y cortadas con microtomos de deslizamiento a un espesor de 4 μm . Para procedimientos de rutina, fueron coloreadas con hematoxilina-eosina, usándose para coloraciones especiales: tricrómicos, reticulina, PAS, van Gieson, alcian blue, para determinar cambios estromales.

2. Técnicas de inmunohistoquímica:(Cónsole y col., 2001).

Se eligió el **Factor VIII** como marcador de células endoteliales y entre los factores de angiogénesis, se eligió el **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular** (FCEV) que marca las células tumorales, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas. En una explicación breve, las muestras de piel de 4 μm de espesor fueron obtenidas a diferentes niveles de los tacos de parafina. Los cortes histológicos fueron inmunomarcados mediante incubación por 1 hora a temperatura ambiente, con anticuerpo primario *anti- Factor VIII / anti- Factor de Crecimiento Endotelial (FCEV)* (humano, Dako, CA, USA), diluído 1:100. Luego, los cortes fueron tratados con un sistema EnVision (Dako, CA, USA). El cromógeno sensible al peróxido fue la diaminobenzidina. En todos los casos, la especificidad del antisuero primario fue monitoreada observando la habilidad para bloquear la reacción inmunocitoquímica después de una preabsorción con un exceso del antígeno relacionado

o mediante su reemplazo con suero normal de conejo o solución salina-buffer.

3. Técnicas de morfometría: (Cónsole y col., 1999; 2002).

Se identificaron las áreas de vascularización a menor aumento (objetivo 4x) y se tomaron un número suficiente de muestras (mínimo de 10 campos de obj x 25) por preparado, midiéndose en dos niveles (a y b) por tacos representativos de la lesión en cada paciente. Se utilizó un método computarizado de videomicroscopía (Analizador de Imágenes Imaging Technology, programa Optimas 5.2). El Macro preparado a tal fin, está diseñado para analizar las áreas vasculares inmunomarcadas sacando el "background o fondo" en forma automática. Se calculó el número de vasos sanguíneos inmunomarcados positivamente o *Densidad Microvascular* (DM), así como las áreas y perímetros individuales y el *Area Vascular Inmunomarcada* (AVI). Esto permitió establecer un *Indice Vascular Tumoral* (IVT) = $\Sigma AVI/RA$, siendo Σ = *sumatoria* y RA el *Area de Referencia*.

4. Tratamiento estadístico:

Los datos en cada parámetro evaluado (ver Tablas: media de un mínimo de 10 campos con obj x 25 y de los niveles de corte a y b) fueron expresados como promedios \pm ES (calculados automáticamente por el analizador de imágenes). Los mismos se

analizaron mediante un Test ANOVA para comparaciones múltiples y un test de Fischer. Además, se aplicó el Coeficiente de Correlación de Pearson.

4. RESULTADOS:

En la **tabla 1** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Superficial**, consignándose los valores promedio (\pm ES) de las mediciones efectuadas.

De acuerdo al tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) en el parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII**, se detectó un descenso significativo ($p < 0.002$) en el subtipo **Superficial** respecto a los subtipos **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico**. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos 2, 3 y 4 que corresponden a los EBC **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico** respectivamente, que presentaron en promedio igual comportamiento.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** registró un descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Superficial** respecto a los subtipos **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico**. Hubo menores valores en el **Desmoplásico** respecto a los subtipos **Lobulado y Siringoide**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un descenso significativo ($p < 0.01$) en el subtipo **Superficial** respecto

a los subtipos **Lobulado** y **Desmoplásico**, no hallándose diferencias significativas con el subtipo **Siringoide**.

Respecto a la inmunomarcación con el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)*, el subtipo **Superficial** registró un promedio de 3 +, en una escala de 0 a 3 de inmunomarcación intratumoral, con mayor reacción a nivel de la empalizada peritumoral, los vasos sanguíneos, el infiltrado inflamatorio estromal y las células epidérmicas (**fig.5**). El valor promedio de FCEV para el subtipo **Superficial** resultó ser el más alto de los distintos subtipos en estudio, mostrando incremento no significativo con el subtipo **Desmoplásico** y **Lobulado**. No existieron prácticamente diferencias con el subtipo **Siringoide**.

Los datos de *Mitosis (M)* mostraron un descenso no significativo en el subtipo **Superficial** respecto los subtipos **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico**.

Además, se halló disminución significativa ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y desarrollo en *Profundidad (P)* en el subtipo **Superficial** al compararlo con los subtipos **Lobulado, Siringoide y Desmoplásico**.

En la **tabla 2** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Lobulado**, consignándose los valores (\pm ES) promedio de las mediciones realizadas.

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) del parámetro *Area Vascular Inmunomarcada* (**AVI**) con el **Factor VIII** para el **subtipo Lobulado**, mostró incremento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral* (**IVT**) con el **Factor VIII** también detectó aumento significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Lobulado** respecto al **Superficial**.

La *Densidad Microvascular* (**DM**) con **Factor VIII** mostró un incremento significativo ($p > 0.01$) en el subtipo **Lobulado** al compararlo con los subtipos **Superficial y Siringoide**.

El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular* (**FCEV**) mostró un promedio de **1.9 +**, con buena inmunomarcación de los vasos y de las células epidérmicas (**fig. 7**). Los valores para **FCEV** fueron los menores obtenidos en el estudio de los cuatro subtipos de EBC, mostrando diferencias que no resultaron significativas con los demás subtipos.

En el subtipo **Lobulado** hay un aumento no significativo de las *Mitosis* (**M**) respecto al subtipo **Superficial**.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión* (**E**) y desarrollo en *Profundidad* (**P**) en el subtipo **Lobulado** al compararlo con el subtipo **Superficial**.

En la **tabla 3** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Siringoide**, consignándose los valores (\pm ES) promedio de las mediciones realizadas.

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) correspondiente al parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII** para el subtipo **Siringoide**, registró un aumento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** también detectó aumento significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Siringoide** respecto al subtipo **Superficial**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un descenso significativo ($p < 0.01$) en el subtipo **Siringoide** al compararlo con los subtipos **Lobulado y Desmoplásico**. No hubo diferencias significativas con el subtipo **Superficial**.

Respecto al *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* se halló un promedio de **2.9 +**, con alta inmunomarcación de los vasos y de las células epidérmicas (**figura 9**). Los valores obtenidos en esta serie fueron similares a los obtenidos para los EBC **Superficiales**, no hallándose diferencias significativas entre los diferentes subtipos.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y el desarrollo en *Profundidad (P)* en el subtipo

Siringoide y un ligero incremento no significativo de las *Mitosis (M)*, al compararlo con el subtipo **Superficial**.

En la **tabla 4** pueden apreciarse los datos obtenidos en los **EBC de Tipo Desmoplásico**, consignándose los valores (\pm ES) de las *Areas Vasculares Inmunomarcadas (AVI)* y *Areas de Referencia (AR)*, que permitieron calcular el *Indice Vascular Tumoral (IVT)* para el **Factor VIII** que inmunomarca las células endoteliales. También se consignaron los valores de *Densidad Microvascular (DM)*, *Mitosis (M)*, *Extensión del tumor (E)*, *Profundidad del tumor (P)* y el resultado de las inmunomarcaciones para el factor angiogénico elegido: el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (**FCEV**).

El tratamiento estadístico de los datos (\pm ES) del parámetro *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)* con el **Factor VIII** para el subtipo **Desmoplásico**, mostró incremento significativo ($p < 0.002$) al ser contrastado con el subtipo **Superficial**.

El *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con el **Factor VIII** detectó un descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo **Desmoplásico** respecto al **Siringoide y Lobulado**.

La *Densidad Microvascular (DM)* con **Factor VIII** mostró un incremento significativo ($p > 0.01$) en el subtipo **Desmoplásico** al compararlo con los subtipos **Superficial y Siringoide**.

El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* mostró un promedio de **2.5 +**, con buena inmunomarcación de los vasos y de

las células epidérmicas (**fig. 12**). Los valores para FCEV fueron los menores obtenidos en el estudio de los cuatro subtipos de EBC, mostrando diferencias que no resultaron significativas con los demás subtipos.

En el subtipo **Desmoplásico** hay un aumento no significativo de las *Mitosis (M)* respecto al subtipo **Superficial**.

Además, se halló incremento significativo ($p < 0.001$) en la *Extensión (E)* y desarrollo en *Profundidad (P)* del tumor en el subtipo **Desmoplásico** al compararlo con el subtipo **Superficial**.

De lo expuesto, se deduce que el **Factor VIII** fue muy eficaz para inmunomarcarse y calcular **AVI, DMV e IVT**, mientras que el **FCEV** parece expandirse en el área tumoral con altos valores en los subtipos **Superficial y Siringoide**, no permitiendo inferir un pronóstico de mayor agresividad en la conducta biológica de los EBC, respecto a lo comunicado en carcinomas, melanomas y epitelomas espinocelulares.

En la **tabla 5** se correlacionaron los parámetros angiogénicos de los **EBC Superficiales**. Se relacionó *Índice de Vascularización Tumoral (IVT)* con los otros parámetros no obteniéndose resultados significativos. La relación entre la *Densidad Microvascular (DM)* con los otros parámetros tuvo similares características. En cambio, al confrontar *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con

otros parámetros, la correlación fue significativa (-0.745) con respecto al conteo de *Mitosis (M)*.

En la **tabla 6**, correspondiente a los **EBC Lobulados**, no se obtuvieron datos significativos en ninguno de los cálculos contemplados.

En la **tabla 7** correspondiente a los **EBC Siringoides** se registraron datos significativos al relacionar *Indice Vascular Tumoral (IVT)* con la *Densidad Microvascular (DM)* (0.726) y la *Densidad Microvascular (DM)* con la *Extensión (E)* (0.991) y *Profundidad (P)* (0.999) tumoral. El *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* se correlacionó de modo significativo con la *Profundidad (P)* en el desarrollo tumoral (-0.950).

Por último, en la **tabla 8** correspondiente a los **EBC Desmoplásicos**, se hallaron resultados altamente significativos al relacionar al relacionar el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* con el desarrollo en *Profundidad (P)* del tumor (0.700). Los restantes cálculos realizados para estudiar la correlación entre los parámetros angiogénicos, no fueron significativos.

5. DISCUSION:

Numerosos autores han evaluado parámetros diversos a fin de analizar la angiogénesis en diferentes neoplasias. La valoración de los factores angiogénicos en diferentes neoplasias resultó variable según

el tipo tumoral y el estadio de evolución. Es por ello, que se eligió evaluar el desarrollo del proceso de angiogénesis en los EBC mediante el análisis de sus promotores como el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* o por su expresión morfológica mediante el *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* con el marcador endotelial denominado **Factor VIII**. La ventaja del método morfológico es que permite apreciar topográficamente el lecho vascular neoformado y valorar el área peritumoral.

La expresión del *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* presentó altos valores para los subtipos *Superficial* y *Siringoide*. Distintos trabajos se han dedicado a su estudio tanto en patologías benignas como malignas, comunicándose datos interesantes sobre microvasculatura, factores angiogénicos y su relación con el pronóstico tumoral, que permitirían una comparación con nuestros resultados en los diferentes subtipos de EBC analizados. Se han comunicado significativos cambios en los diversos parámetros angiogénicos en correlación con el pronóstico clínico en distintos tipos de neoplasias, como por ejemplo en melanomas y tumores de mama. Un trabajo en carcinomas epidermoides mostró un mayor incremento de la vascularización y un aumento de niveles de FCEV, con respecto a epitelomas basocelulares, sugiriendo el posible rol de la angiogénesis como determinante de la conducta biológica más agresiva del primer tipo de tumores.

En nuestra casuística, se observaron variaciones del *Indice de Vascularización Tumoral (IVT)* para **Factor VIII** aplicado a cada subtipo de EBC. El **IVT** mostró descenso significativo ($p < 0.001$) en el subtipo *Superficial* respecto a los subtipos de EBC *Lobulado*, *Siringoide* y *Desmoplásico*. Llama la atención el no haber encontrado valores más altos de **IVT** en el caso de los *Desmoplásicos*, dada su naturaleza más agresiva pero quizás la explicación resida en la abundante cantidad de tejido conectivo denso intercalar característico de esta lesión. El **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)** mostró las más altas inmunomarcaciones en los subtipos *Superficial* y *Siringoide*. Es de remarcar, la mayor positividad en la empalizada periférica tumoral, fenómeno observado con mayor claridad en los subtipos *Superficial* y *Lobulado*, aparente frente de *expansión* de la neoplasia en desarrollo. Esto nos hablaría no tanto de agresividad tumoral, sino de un tumor en estadio incipiente, preparándose para una etapa de crecimiento y de invasión posterior, con posible evolución hacia cualquiera de los subtipos estudiados.

Si bien el conteo mitótico no sería un índice categórico en los EBC, dado que son tumores con amplia actividad mitótica *per se*, se observó correlación entre conteo de *Mitosis* elevado en los subtipos *Lobulado* y *Siringoide*. Con respecto al tamaño, se halló mayor *Extensión* y desarrollo en *Profundidad* en los subtipos *Lobulado*,

Siringoide y Desmoplásico, con muy bajos valores en el subtipo *Superficial*.

En nuestros resultados, la aplicación del *Coefficiente de Correlación de Pearson* permitió inferir una relación entre el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* y el conteo de *Mitosis* para el EBC *Superficial*, tumor relacionado en párrafos anteriores con alto índice de marcación para **FCEV**. También se demostró correlación entre los valores de **FCEV** para los EBC *Siringoides y Desmoplásicos* con la *Profundidad (P)* del tumor. Estos últimos datos nos permitirían relacionar el FCEV de los tumores con el tamaño tumoral, y en el caso de los *Superficiales* con un momento de crecimiento activo. Los datos obtenidos nos permitirían relacionar al FCEV con un "estadio" de crecimiento tumoral activo.

En conclusión, de lo expuesto se deduce que el **Factor VIII** fue muy eficaz para calcular y analizar el *Area Vascular Inmunomarcada (AVI)*, la *Densidad Microvascular (DMV)* y el *Indice Vascular Tumoral (IVT)*, obteniéndose los valores más altos en los subtipos *Lobulado, Siringoide y Desmoplásico*, que demostraron además un desarrollo más amplio en *Extensión y Profundidad*, en concordancia con varias de las publicaciones consideradas en párrafos anteriores en las que el IVT se relacionó con estadios tumorales más avanzados.

Por otra parte, el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV)* se expande en el área tumoral con altos valores en los

subtipos *Superficial* y *Siringoide*, no permitiendo inferir un pronóstico de mayor agresividad en la conducta biológica de los EBC, respecto a lo comunicado en carcinomas, melanomas y epitelomas espinocelulares.