

11201 3  
2ej.

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

"LA DENSIDAD MICROVASCULAR INTRATUMORAL COMO  
FACTOR PRONOSTICO EN EL CARCINOMA  
DE LA PROSTATA"

TESIS DE POSGRADO  
QUE PRESENTA

DR. ENRIQUE ALEJANDRO BLANCO LEMUS

PARA OBTENER EL TITULO DE  
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLOGICA

ASESOR DE TESIS: DRA. MARIA DE LOURDES CABRERA MUÑOZ

JEFE DE ANATOMIA PATOLOGICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1997

TESIS CON  
FAJETA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TITULAR DEL CURSO**



**DRA. MARÍA DE LOURDES CABRERA MUNOZ**

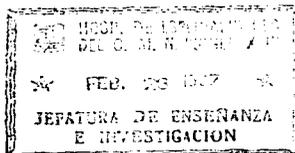
**Jefe de Anatomía Patológica  
Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social**

**JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION**



**DR. NIELS H. WACHER RODARTE**

**Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social**



**"NO ES EL CONOCIMIENTO MISMO,  
SINO LA SATISFACCION DE SABER QUE ALGO SE CONOCE".**

**Sir Peter B. Medawar.**

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	12
DISCUSION.....	15
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFIA.....	20
ANEXO.....	24

## INTRODUCCION

El carcinoma de la próstata es uno de los tipos más frecuentes de cáncer en el varón (1). Se ha calculado que de los casos diagnosticados cada año, aproximadamente una quinta parte tienen una evolución mortal (2). Además de estos casos letales, hay una forma anatómica cada vez más frecuente de cáncer de próstata en la que la neoplasia se descubre accidentalmente en la autopsia o en una pieza quirúrgica extirpada por otros motivos, por ejemplo, por una hiperplasia nodular. En casi todos estos casos se trata de una lesión pequeña, a veces compuesta únicamente por focos microscópicos. Alrededor del 90% de estas lesiones no llegan a producir problemas durante la vida del paciente, pero, ¿cuáles de ellas son potencialmente agresivas?

El desarrollo de indicadores pronósticos adecuados que se correlacionen con el potencial de comportamiento biológico de estas neoplasias podría ayudar a determinar que pacientes requieren de una terapia adyuvante vigorosa debido a un alto riesgo de recurrencia y muerte.

Existe mucha evidencia experimental mostrando que el crecimiento tumoral y las metástasis son dependientes de la angiogénesis tumoral, que representa el crecimiento de nuevos vasos alrededor y dentro de un tumor. Este hecho biológico parece ser común a una amplia variedad de tumores sólidos, así como al crecimiento tisular bajo condiciones normales.

En este marco conceptual, el significado de una terapéutica antiangiogénica tumoral, aunque incompleta en la actualidad, cobra especial interés conforme se establecen nuevos indicadores pronósticos con significado biológico, en lo particular para el carcinoma de la próstata.

## ANTECEDENTES

En 1971, Folkman (3) propuso que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis. Actualmente existen considerables evidencias indirectas y directas que muestran que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente, que las células tumorales pueden producir moléculas reguladoras de la angiogénesis y que los antagonistas pueden prevenir o disminuir el crecimiento tumoral.

La evidencia directa es que los tumores, tanto "in vivo" como "in vitro", que no poseen acceso a vasos sanguíneos, crecerán hasta el punto en que la difusión pasiva no pueda proporcionar los nutrientes necesarios o remover los productos de desecho hacia el ambiente inmediato adyacente (4). En equilibrio, estos esferoides avasculares alcanzan tamaños de solo 4mm "in vitro" (5) y 2mm "in vivo" (6). El crecimiento adicional y las metástasis no ocurren a menos que se establezca la vascularización (7).

La evidencia directa ha sido presentada en varios estudios en donde por métodos diferentes se inhibe de manera específica la angiogénesis (no citostáticos para células tumorales in vitro) con la demostración de la inhibición tumoral in vivo (8,9).

En tiempos recientes se ha hecho evidente que, además de su efecto de perfusión e intercambio de productos con las células tumorales, el endotelio puede liberar factores de crecimiento parácrinos como factor de crecimiento fibroblástico básico, factor de crecimiento 2 relacionado a la insulina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y factores estimuladores de colonias (10,11).

Alternativamente, se ha demostrado que el comportamiento invasivo por quimiotaxis de las células endoteliales en las "puntas" de los capilares es facilitado por su secreción de colagenasas, uroquinasas y activador del plasminógeno (12).

Así pues, el impacto sumatorio de la perfusión y efectos parácrinos del tumor, más la invasión asociada a enzimas endoteliales parecen contribuir a la fase de crecimiento tumoral rápido y cambiar la señal a un fenotipo angiogénico potencialmente letal. Las células tumorales pueden invadir linfáticos adyacentes que se forman concomitantemente con los vasos capilares o, hipotéticamente pueden pasar del torrente sanguíneo hacia los linfáticos vía las uniones linfaticovenosas (5).

Brem y cols. (13) fueron de los primeros en sugerir que la intensidad de la angiogénesis intratumoral podría correlacionar con el grado del tumor y su agresividad. A este respecto, las primeras evidencias cuantitativas se establecieron en melanomas cutáneos (14). Se observó que en ausencia de neovascularización no había metástasis, mientras que con el desarrollo de nuevos vasos capilares (que coincidió con el crecimiento vertical tumoral), la probabilidad de metástasis fue significativamente mayor.

En 1990, Weidner y cols. (15) se plantearon hasta dónde la magnitud de la angiogénesis (medida por la densidad microvascular intratumoral) se correlacionaba con la presencia de metástasis en el carcinoma de mama. Se encontró que los carcinomas invasores de pacientes con metástasis mostraron una densidad promedio de microvasos de 101 por campo de 200x, en comparación a pacientes sin metástasis en los que el valor correspondiente fue de 45 por campo de 200x ( $p=0.003$ ).

De forma subsecuente, una serie de estudios realizados en pacientes diferentes, por distintos investigadores en varios centros médicos, han demostrado ésta misma asociación entre la densidad microvascular intratumoral y mediciones de la agresividad tumoral tales como mayor incidencia de metástasis y/o menor sobrevida. En la mayoría de estos estudios la densidad microvascular mostró, mediante análisis multivariado, un significado pronóstico independiente cuando se comparó con parámetros pronósticos tradicionales.

Lo anterior se ha demostrado para pacientes con carcinoma de mama (16), pulmón (17), cabeza y cuello (carcinoma escamoso)(18), recto (19), testículo (20), vejiga (21), así como tumores de tejidos blandos (22), mieloma múltiple (23), carcinoma de ovario (24) y en grados variables en el carcinoma de próstata (25) y tumores del sistema nervioso central (26).

Por otra parte, las variaciones metodológicas en la medición de la densidad microvascular podrían explicar por qué algunos investigadores no han encontrado esta asociación. Van Hoef y cols. (27) estudiaron este parámetro en tumores de 93 pacientes con carcinoma de mama sin afección metastásica. Estos autores no encontraron correlación entre el período libre de enfermedad o la sobrevida global y la densidad microvascular intratumoral. Sin embargo, el número de microvasos reportado en su estudio es mucho mayor que aquél obtenido por Weidner y cols. (28) aún cuando éste último empleó áreas de conteo mayores y las mismas técnicas de inmunohistoquímica. La media y la mediana en los conteos del estudio de Weidner y cols. fueron de 60 y 56 respectivamente, con un área de conteo de 0.74mm<sup>2</sup>. En contraste, Van Hoef y cols. obtuvieron valores de 80 y 72 respectivamente con un área de conteo de 0.476mm<sup>2</sup>, o sea 64% del campo utilizado por Weidner.

Por su parte, Hall y cols. (29) no encontraron relación entre la densidad microvascular y la frecuencia de metástasis en el carcinoma de mama. Ellos reportaron conteos utilizando campos microscópicos de 0.1256mm<sup>2</sup>, mucho menor al de 0.74mm<sup>2</sup> usado por Weidner y cols. (28). De forma adicional, en el estudio de Hall y cols. se excluyeron del conteo vascular las células individualmente positivas para el marcador endotelial, ya que los criterios para clasificar una formación como vascular incluían la presencia de un espacio luminal. De manera similar, Carnochan y cols (30) y Leedy y cols. (31) no encontraron relación entre la densidad microvascular y el pronóstico en pacientes con melanoma maligno y metástasis linfáticas y en pacientes con carcinoma epidermoide de la lengua, respectivamente. El porqué éstos reportes son contradictorios no está claro; sin embargo, Leedy y cols. notaron que la lengua es en sí una región muy vascularizada.

Es evidente que la variación en el conteo microvascular dependiera, además del campo microscópico a utilizar, del método para determinar la presencia de células endoteliales. Los antígenos expresados por el endotelio vascular son diferentes dependiendo del tipo de vaso y del tejido en donde éste se encuentra. Los anticuerpos que pueden detectar antígenos endoteliales resistentes a formol incluyen aquéllos contra el factor von Willebrand, también denominado antígeno relacionado a factor VIII (F8RA/vWF), y los marcadores de superficie para CD31, que representa una glicoproteína de adhesión celular endotelial. Hasta ahora, ningún marcador está libre de inconvenientes. Cuando se usa de manera adecuada, el anti-F8RA/vWF resulta ser uno de los marcadores endoteliales más específicos (32) con buen contraste entre la microvasculatura y otros componentes tisulares. Desafortunadamente, el anti-F8RA/vWF puede no resaltar todos los microvasos intratumorales.

Aparentemente más adecuado, el CD31 tiene reactividad cruzada con las células plasmáticas (33). Este anticuerpo, (también conocido como endoCAM-1) no obstante su aparente especificidad, puede oscurecer los vasos en tumores con fondo inflamatorio prominente que incluye células plasmáticas. El anticuerpo CD34 (anti-células progenitoras humanas) es una alternativa aceptable; sin embargo, este resalta también algunas células del estroma perivascular y se ha descrito que tiñe diversos tipos de células de neoplasias del estroma (34).

Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal (Mab-E9) contra las células endoteliales en proliferación o "activadas", desarrolladas en cultivo de tejido de cordón umbilical humano (35). El Mab-E9 reacciona intensamente con las células endoteliales de todos los tumores y órganos fetales, así como tejidos regenerativos y/o con fondo inflamatorio y muy rara vez de forma débil con las células endoteliales de tejidos normales. Sin embargo, este anticuerpo sólo puede ser usado en cortes de tejido congelado.

Se han desarrollado varios marcadores del potencial maligno que pueden correlacionarse con el estadio patológico y proporcionar información pronóstica en el cáncer de la próstata. Estos incluyen el grado histológico, el volumen tumoral, el análisis de ploidia de DNA y los niveles de antígeno prostático específico (36). Sin embargo, de forma general, no proporcionan información pronóstica útil en cuanto al paciente individual (37).

Algunos otros indicadores potenciales incluyen marcadores para factores de crecimiento y receptores, oncogenes, genes de supresión tumoral y la expresión de proteínas relacionadas a proliferación y potencial invasivo (38). No obstante la información útil proporcionada por éstos indicadores, existe la necesidad de parámetros predictivos, de tecnología más accesible, para determinar la progresión biológica en los pacientes individuales.

El patrón histológico del cáncer prostático se correlaciona con el potencial biológico de la neoplasia; este hecho ha sido explotado por algunos sistemas de graduación histológica. Estos sistemas identifican con éxito el carcinoma bien diferenciado que tiene progresión lenta y el carcinoma poco diferenciado que progresa de forma rápida.

Sin embargo, los sistemas de graduación son menos exitosos en subdividir la mayoría de carcinomas moderadamente diferenciados, que tienen un potencial clínico y biológico teóricamente intermedio.

En nuestro medio, el sistema de gradificación más utilizado es el diseñado por Gleason, que se basa en la arquitectura de la diferenciación glandular (39). Sin embargo, este sistema no toma en consideración los modelos morfogenéticos o histogenéticos y refleja la heterogeneidad tumoral por la combinación de los patrones histológicos primarios y secundarios en un sistema de puntaje. No obstante la capacidad predictiva de este sistema, que incluye en cierta medida el potencial invasor y metastásico de la neoplasia, éste no es lo suficientemente confiable cuando se considera en forma aislada para predecir el estadio patológico y pronóstico de un paciente determinado (36).

En este sentido, la cuantificación de la vascularización tumoral puede ser considerada como un potencial indicador pronóstico en el carcinoma de la próstata; además este indicador podría ser útil en la selección de pacientes de alto riesgo con metástasis linfáticas negativas, para terapias sistémicas coadyuvantes.

## MATERIAL Y METODOS

Con la finalidad de hacer extensivos los estudios sobre angiogénesis a nuestro medio, nos cuestionamos hasta qué punto ésta se correlaciona con la presencia de metástasis. La hipótesis que deseamos probar es que aquéllos adenocarcinomas de próstata que muestran angiogénesis limitada tienen un potencial metastásico menor en comparación con los que muestran angiogénesis intensa.

Para tal efecto, se diseñó un estudio observacional, retrospectivo y comparativo de efecto a causa, que incluyó todos los casos de pacientes con carcinoma de próstata pertenecientes al archivo del departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en el lapso de 5 años comprendido entre el 10. de Enero de 1990 y el 10. de Enero de 1995.

Los criterios de selección incluyeron especímenes quirúrgicos obtenidos por prostatectomía radical o resección transuretral diagnosticados como carcinoma de próstata con información sobre seguimiento en el expediente clínico, y la especificación de la presencia o no de actividad metastásica en el reporte de patología quirúrgica inicial, o mediante determinaciones alternativas expresadas en el expediente (rastreo óseo metastásico y/o niveles de antígeno prostático específico elevados posteriores a la cirugía no considerados atribuibles a recurrencia local).

No se incluyeron los casos que mostraran evidencia clínica o histológica de una segunda neoplasia, aquéllos con expedientes incompletos o con seguimiento inferior a seis meses posteriores a la cirugía y/o con material quirúrgico escaso o en malas condiciones de archivo, que impidieran el correcto procesamiento de los tejidos.

El grado de angiogénesis tumoral fue valorado cuantitativamente y expresado como la densidad microvascular intratumoral para cada caso. Se procedió al conteo individual de estructuras microvasculares y/o células endoteliales en un campo microscópico de 200x (ocular 10x y objetivo 20x) que representó un área calculada de 0.961mm<sup>2</sup>. Los resultados se especificaron como el número de microvasos para cualquier campo tumoral con el mayor número de estructuras contables ("zonas activas"). No se considero necesaria la presencia de luz vascular para definir una estructura como microvaso.

Los microvasos intratumorales fueron identificados mediante la tinción inmunohistoquímica de las células endoteliales con anticuerpos policlonales de conejo para antígeno relacionado a factor VIII (anti-F8RA/vWF, Dako A0082, Santa Barbara, CA) isotipo IgG1 clona F8/86 a dilución 1:600 en cortes del tumor con grosor de 5 micras y utilizando la técnica de avidina-biotina (ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA) de peroxidasa, con la adición de diaminobencidina como revelador. (figuras 1 y 2)

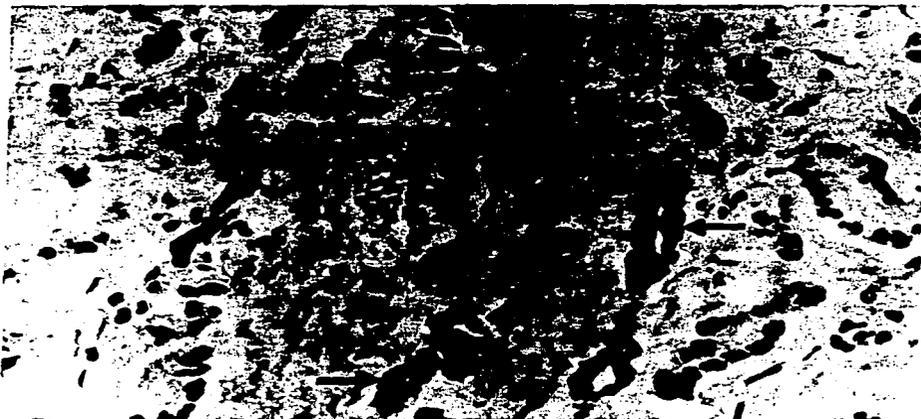


Figura 1.- Fotomicrografía que muestra la positividad de las células endoteliales (flechas), para el anticuerpo F8RA/vWF en un ejemplo de carcinoma poco diferenciado sin metástasis (suma de Gleason 8). (Caso No. 16). (400x)

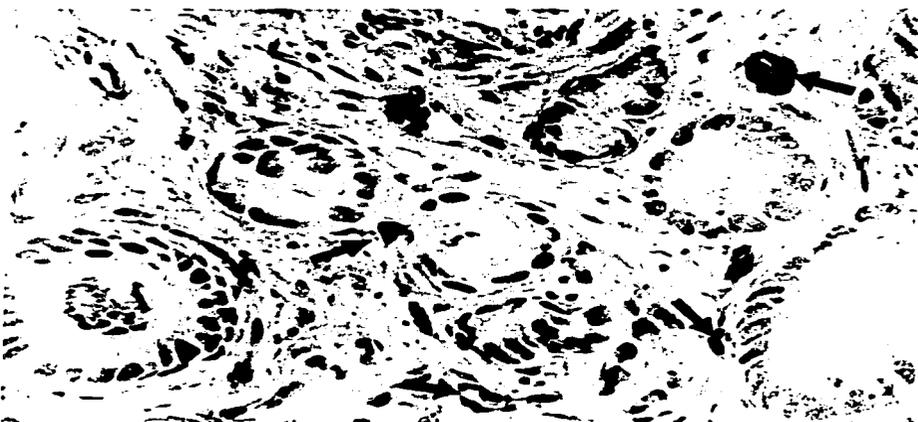


Figura 2.- Fotomicrografía que muestra la elevada angiogénesis en un carcinoma moderadamente diferenciado (suma de Gleason 5) con metástasis (Caso No.85). Las flechas indican algunos microvasos representativos. Se contaron 13 microvasos en el campo mostrado (400x).

En todos los casos se determinó el grado tumoral (en cortes teñidos con hematoxilina y eosina) siguiendo los criterios de Gleason (39). (Anexo 1)

La suma del puntaje obtenido mediante la combinación de los patrones primario y secundario para cada caso fueron agrupados en tres categorías tumorales, a saber: tumores bien diferenciados (sumatorias iguales a 2,3 o 4), moderadamente diferenciados (sumatorias iguales a 5 o 6) y tumores poco diferenciados (sumatorias de 7 a 10).

Se utilizó la prueba de coeficiente de correlación de rangos de Spearman para examinar la relación entre el puntaje de Gleason y el conteo microvascular (38). Debido a que los conteos microvasculares no tienen distribución normal, se realizó análisis univariado mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney) para determinar la existencia de diferencias significativas entre la media de los conteos microvasculares en los tumores con y sin metástasis, así como en las categorías tumorales formadas por la suma de los puntajes de Gleason (38). Finalmente, para determinar si el conteo microvascular contribuye con información significativa con respecto a las metástasis en mayor o menor grado al puntaje de Gleason, se realizó análisis multivariado por regresión logística y el cálculo de razón de probabilidad (38).

## RESULTADOS

### PACIENTES.

De los 85 casos de pacientes seleccionados con carcinoma prostático invasor, 24 mostraron metástasis y 61 no desarrollaron metástasis durante el período de seguimiento. El promedio de seguimiento para pacientes con metástasis fue de 22.2 meses (mediana 17, desviación estándar 18.5 meses, rango 3.7-41); mientras que la media de seguimiento para pacientes sin metástasis fue de 26.7 meses (mediana 25, desviación estándar 18.15, rango 8.5-44.8).

La media de edad para los pacientes con metástasis fue 73.5 años (mediana 64, desviación estándar 8.23, rango 63-93); mientras que la media correspondiente para los pacientes sin metástasis fue de 72.3 años (mediana 61, desviación estándar 7.77, rango 60-88). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos para la edad de presentación ( $p=0.89$ ) y la duración del seguimiento ( $p=0.24$ ) (Tabla 1).

### DENSIDAD MICROVASCULAR Y METASTASIS.

En los carcinomas prostáticos de pacientes con metástasis la media del conteo microvascular fue de 95.5 por campo de 200x (mediana 90, desviación estándar 30.4, rango 42-161) (Tabla 1). Para aquellos carcinomas de pacientes sin metástasis el conteo microvascular promedio fue de 49.9 por campo de 200x (mediana 40, desviación estándar 29.04, rango 10-127). La prueba de suma de rangos de Wilcoxon mostró que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ). (Tabla 1)

**Tabla 1. Comparación de los pacientes con carcinoma de próstata con y sin enfermedad metastásica.**

	<b>Pacientes con Metástasis (24)</b>	<b>Pacientes sin Metástasis (61)</b>	
	<b>Media (D.S., rango)</b>	<b>Media (D.S., rango)</b>	<b>Valor P</b>
Conteo vascular*	95.5 (30.4, 42-161)	49.9 (29.0, 10-127)	<0.001
Puntaje Gleason	7.16 (1.9, 3-10)	4.9 (2.3, 2-9)	0.009
Edad (años)	73.5 (8.23, 63-93)	72.3 (7.77, 60-88)	0.89
Seguimiento (meses)	22.2 (18.5, 3.7-41)	26.7 (18.1, 8.5-44)	0.24

**D.S. = Desviación estándar.**

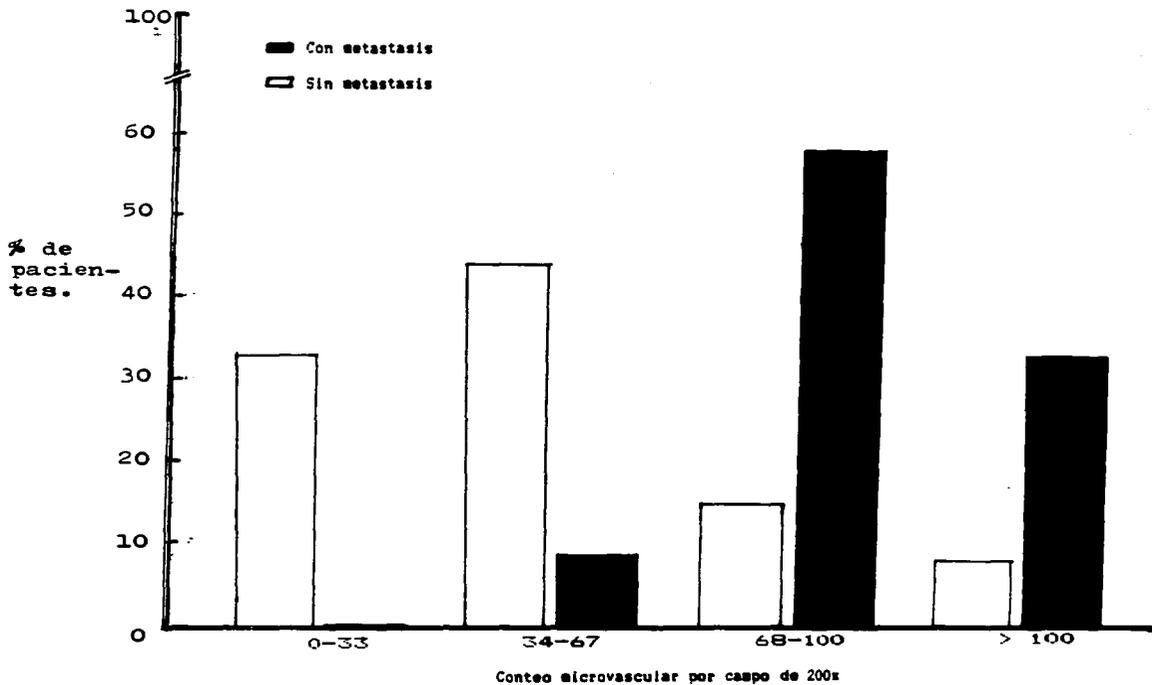
**\* por campo de 200x.**

Se representa gráficamente el porcentaje de pacientes con y sin metástasis, en los que el conteo vascular se muestra en grupos por incrementos de 33 microvasos (Figura 3). Esta gráfica muestra que la incidencia de enfermedad metastásica aumenta conforme el conteo microvascular se incrementa y señala una relación inversa con respecto a los casos sin metástasis.

#### GRADO HISTOLOGICO (PUNTAJE DE GLEASON) Y SU ASOCIACION CON LA DENSIDAD MICROVASCULAR INTRATUMORAL.

En los carcinomas prostáticos de los pacientes con metástasis la media del puntaje de Gleason fue de 7.16 (mediana 7, desviación estándar 1.9, rango 3-10). Para aquéllos carcinomas de pacientes sin metástasis, la media del puntaje de Gleason fue 4.9 (mediana 4, desviación estándar 2.3, rango 2-9). La prueba de suma de rangos de Wilcoxon mostró que éstas diferencias son estadísticamente significativas ( $p=0.009$ ) (Tabla 1).

Los conteos microvasculares aumentaron significativamente en relación a los incrementos del puntaje de Gleason, siendo ésto más aparente entre los tumores poco diferenciados (Spearman  $R=0.60$ ,  $p<0.001$ ) (Figura 4). La media del conteo microvascular para los carcinomas bien diferenciados (suma de Gleason 2, y 4) fue 41.8 (mediana 39, desviación estándar 25.07; rango, 10-127); para los carcinomas moderadamente diferenciados (suma de Gleason 5 o 6) fue 52.4 (mediana 44, desviación estándar 25.66; rango, 15-94); y para los carcinomas poco diferenciados (Suma de Gleason 7 a 10) fue 83.5 (mediana 53, desviación estándar 35.10; rango, 16-137).



**Figura 3.- Gráfica que muestra el porcentaje de pacientes con y sin metástasis según la densidad microvascular en incrementos de 33 microvasos.**

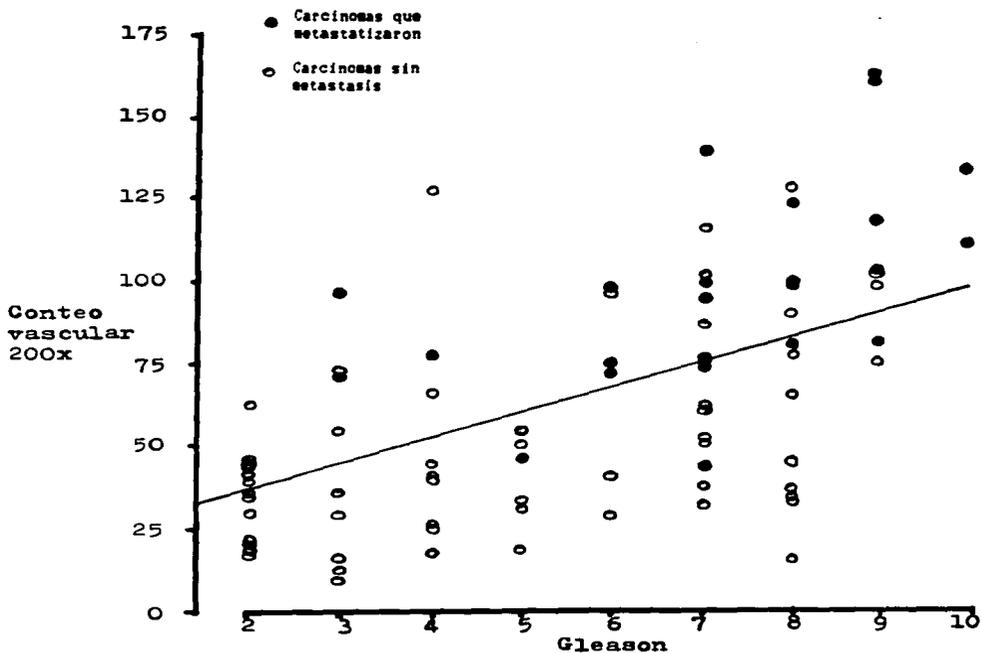


Figura 4.- Gráfica que muestra que los conteos microvasculares aumentaron con el grado histológico (determinado por el puntaje de Gleason).  $n=85$ , Spearman  $R=0.60$ ,  $p<0.001$ . Se muestra una línea que representa la regresión lineal simple.

Dentro del grupo de tumores poco diferenciados, la densidad microvascular media en tumores de pacientes con metástasis fue 104.3 (mediana 97, desviación estándar 30.84; rango 42-161); en comparación, el conteo microvascular en tumores de pacientes sin metástasis mostró una media de 67.5 (mediana 61, desviación estándar 29.84; rango 16-127) ( $p=0.004$ ) (Figura 5).

En contraste, dentro del grupo de tumores bien diferenciados, la media del conteo microvascular en tumores de pacientes con metástasis fue 79 (mediana 79, desviación estándar 10.50; rango 69-90); y la media de microvasos en tumores de pacientes sin metástasis fue 38.2 (mediana 39, desviación estándar 23.27; rango 12-127). No obstante que los conteos microvasculares dentro de este grupo de tumores mejor diferenciados fueron mayores para los tumores con metástasis en comparación a los tumores sin metástasis, éstas diferencias no mostraron significado estadístico ( $p=0.24$  y  $0.08$ , respectivamente).

Para el análisis multivariado se utilizaron el modelo de regresión logística y el cálculo de razón de probabilidad  $X_2$ , para determinar si alguna combinación de variables proporciona el mejor estimado del riesgo relativo de metástasis en comparación a una sola variable. La regresión logística mostró que existe un riesgo aumentado de 1.39 veces para metástasis por cada incremento de 1 punto en la sumatoria de Gleason (ver Modelo 1; Tabla 2) (95% de intervalo de confianza, 1.07-1.82;  $p=0.01$ ). Cuando se considera además el conteo microvascular (ver Modelo 2; Tabla 2), la razón de probabilidad mostró que la densidad microvascular añade información adicional significativa ( $p<0.001$ ).

La regresión logística mostró un riesgo aumentado de 1.55 veces para enfermedad metastásica por cada aumento de 10 microvasos en el conteo (95% de intervalo de confianza, 1.19 a 2.02,  $p=0.002$ ).

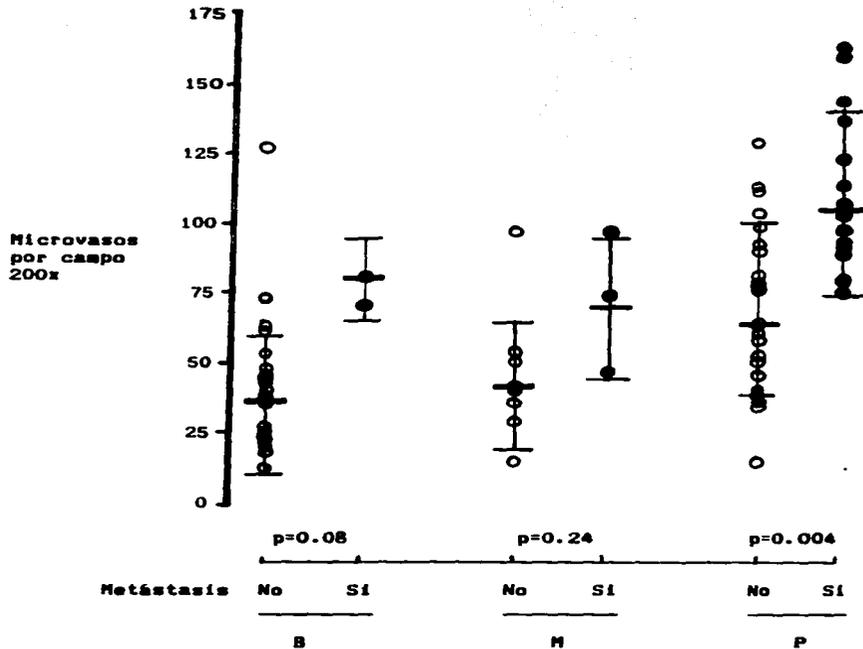


Figura 5.- Gráfica que muestra la variación de los conteos microvasculares según las metástasis y el grado de diferenciación. B= Bien diferenciados, (Gleason 2 a 4); M= Moderadamente diferenciados, (Gleason 5 y 6); P= Poco diferenciados, (Gleason 7 a 10). Se muestran los valores de p para cada categoría determinados mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

**Tabla 2. Análisis Multivariado en la Predicción de Metástasis en Pacientes con Carcinoma de Próstata.**

Modelo	Indicador	Razón de Disparidad (±95% IC)*	Modelo X <sub>1</sub> y P	LR X <sub>1</sub>	LR P
1	Puntaje de Gleason	1.39(1.07-1.82)	6.58 0.01		
2	Gleason + conteo microvascular/10	0.98(0.69-1.38) 1.55(1.19-2.02)	23.37 0.002	16.79	<0.001

Nota: La tabla muestra los modelos de regresión logística en la predicción de metástasis en pacientes con carcinoma de próstata. Las proporciones de disparidad se determinaron en incrementos de 10 microvasos. La n para todos los modelos es 85.

\* Proporción de disparidad con 95% de intervalo de confianza.

## DISCUSION

El presente estudio muestra una correlación significativa entre la densidad de microvasos demostrados con anti-F8RA/vWF en cortes histológicos de carcinoma prostático y la incidencia de metástasis. Estos resultados son congruentes con el conocimiento actual del papel de la angiogénesis en el proceso metastático. Para metastatizar, una célula tumoral debe vencer una serie de obstáculos, así como presentar y responder a una serie de factores de crecimiento o citocinas. Las células tumorales deben tener acceso a la vasculatura del tumor primario, sobrevivir en la circulación, escapar a la vigilancia inmunológica, instalarse en la microcirculación del órgano blanco, salir (o crecer dentro de) la microvasculatura de dicho órgano e inducir la angiogénesis tumoral. En la mayoría de los tumores primarios, menos de 1 célula en 1000 o 10,000 tiene estas propiedades (40).

Se ha demostrado que a mayor número de microvasos tumorales aumenta la posibilidad de que las células tumorales entren a la circulación (40). Debido al origen clonal de las metástasis, un tumor primario que contenga una alta proporción de células neoplásicas angiogénicas, "sembrará" el torrente circulatorio con células tumorales que son en sí angiogénicas. De forma similar al tumor primario, la angiogénesis es necesaria para establecer el crecimiento metastático, que a su vez podrá establecer nuevas metástasis, de manera que se amplifica el proceso de crecimiento y diseminación. Es claro que la angiogénesis se requiere tanto al principio como al final de la cascada metastática (5).

Sin embargo, es importante mencionar que la neovascularización permite, pero no garantiza, la diseminación tumoral progresiva. Por ejemplo, los tumores carcinoides típicos son muy vascularizados, pero rara vez producen metastasis a distancia (41). Por lo tanto, otros procesos diferentes a la angiogénesis están involucrados en las metastasis.

Se necesita de un método adecuado y simple para predecir el comportamiento del carcinoma prostático en estadios tempranos. Nuestros resultados muestran que el número de microvasos por campo de 200x en las zonas de neovascularización más intensa dentro del carcinoma puede ser un factor predictivo importante de enfermedad metastásica, ya sea en ganglios linfáticos pélvicos y/o en sitios distantes, especialmente en los carcinomas poco diferenciados. Bigler y cols. (42) estudiaron la densidad microvascular en el carcinoma invasor de la próstata y encontraron un aumento significativo en la densidad de microvasos en el carcinoma, en comparación al estroma prostático normal ( $p < 0.001$ ). Más aún, estos autores notaron que había una diferencia significativa en la vascularidad de los carcinomas con grado histológico alto (poco diferenciados) que metastatizaron y aquellos que permanecieron confinados ( $p = 0.005$ ). Sin embargo, nuestros hallazgos y aquellos de Bigler y cols. (42) difieren en cierto sentido con los de Wakui y cols. (43). Estos últimos investigadores encontraron que la proporción de densidad de capilares sanguíneos (BCDR; definido como la proporción entre el área de capilares sanguíneos y el área tumoral, determinado mediante análisis de imagen) fue significativamente mayor en los carcinomas que desarrollaron metastasis óseas en comparación a aquellos que no ( $p < 0.001$ ), pero sólo en los tumores de grado histológico bajo o intermedio definidos según el puntaje de Gleason. Estos autores concluyen que "el BCDR puede ser útil en predecir la progresión tumoral en relación a las metastasis óseas del carcinoma prostático con puntajes de Gleason bajos e intermedios".

No obstante los dos estudios mencionados, y el presente, muestran una correlación entre la angiogénesis tumoral y las metástasis, es difícil saber con certeza el porque Wakui y cols. (43) encontraron una asociación diferente con el puntaje de Gleason. Las posibles razones son que estos investigadores usaron un punto final diferente (metástasis óseas exclusivamente), cuantificaron los microvasos mediante análisis de imágenes en un área tumoral mayor (más que en "zonas activas"), y utilizaron la inmunotinción con vimentina (un marcador menos específico que el FBRA/vWF para células endoteliales).

La observación de que la densidad microvascular fue mayor en los carcinomas prostáticos poco diferenciados, sugiere que el cambio a un fenotipo altamente angiogénico ocurre relativamente tarde en la historia natural de esta enfermedad. De manera similar, nuestra observación de que los carcinomas poco diferenciados que metastatizan tienen una media de densidad microvascular mayor, que aquellos tumores que no metastatizaron, sugiere que una histología poco diferenciada no es suficiente para que ocurran las metástasis. De hecho, el cambio a un fenotipo altamente angiogénico parece ser tan importante, o más, que el desarrollo de una morfología poco diferenciada, como lo demuestra el análisis multivariado.

Ya que los conteos microvasculares se basan en la tinción de inmunohistoquímica estándar para células endoteliales con anti-FBRA/vWF, la prueba es fácil de realizar usando tecnología y reactivos disponibles comercialmente en muchos laboratorios de anatomía patológica, de manera que esta técnica es altamente reproducible y por lo tanto aplicable a nuestro medio.

La prueba debe ser realizada en un corte histológico que contenga una cantidad de tumor representativa y suficiente para permitir el conteo de al menos un campo de 200x (28). Esto se logra mejor en especímenes obtenidos mediante prostatectomía radical o resección transuretral; sin embargo, se necesitan más estudios que evalúen la posibilidad de utilizar en biopsias por aguja. No obstante que otros marcadores para células endoteliales tales como CD31 pueden marcar un número mayor de células endoteliales que el F8RA/vWF, no existen reportes comparativos entre ambos métodos en el carcinoma de la próstata y este podría ser objetivo de estudios posteriores.

Los resultados reportados en el presente estudio expanden nuestros conceptos sobre angiogénesis tumoral en el carcinoma de la próstata en pacientes de nuestro medio, y proporcionan evidencia adicional a la reportada en la literatura mundial acerca de que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente; así mismo, proporcionan evidencia inicial sobre el comportamiento tumoral individual que podría ser útil en el diseño de esquemas adyuvantes en el tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

## **CONCLUSIONES**

La evaluación de la angiogénesis tumoral mediante el conteo de microvasos marcados por inmunohistoquímica en las áreas de carcinoma prostático, puede ser una prueba pronóstica práctica y valiosa en la selección de pacientes para terapias adyuvantes vigorosas en el carcinoma en etapas iniciales, especialmente en el grupo de carcinomas poco diferenciados.

La metodología para evaluar la densidad microvascular en el carcinoma de la próstata es sencilla, reproducible y aplicable a nuestro medio.

Se debe establecer en un estudio prospectivo, institucional y multicéntrico, la utilidad de el conteo microvascular como un factor predictivo de metástasis en el carcinoma de la próstata.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Boring, CC. et al: Cancer Statistics. 1994. CA 44:7.
- 2.- Smith, PH.: The case for no initial treatment of localized prostatic cancer. Urol Clin North Am 1990: 17-827.
- 3.- Folkman, J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971: 285:1182.
- 4.- Sutherland, RM.: Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. Science 1988: 240:177.
- 5.- Blood, CH. et al.: Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. Biochem Biophys Acta 1990: 1032:89. (Resumen)
- 6.- Gimbrone, MA. et al.: Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med 1972: 136:261.
- 7.- Folkman, J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990:82:4.
- 8.- Gross, JL. et al.: Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. Proc Am Cancer Res 1990: 31:79.
- 9.- Kim, KJ. et al.: Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 1994: 367:576.
- 10.-Rak, WJ. et al.: Progressive loss of sensitivity to endothelium derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. J Cell Physiol 1994; 159:245.
- 11.-Hasada, J. et al.: Separable growth and migration factors for large cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. Br J Cancer 1992; 66:349.

- 12.-Moscatelli, D. et al.: Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by endothelial cells. J Cell Biol 1981; 91:201a. (Resumen)
- 13.-Brem, SA. et al.: Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. J Natl Cancer Inst 1972; 48:347. (Resumen)
- 14.-Srivastava, A. et al.: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness skin melanoma. Am J Pathol 1988; 133:419.
- 15.-Weidner, N. et al.: Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991;324:1
- 16.-Bundred, NJ. et al.: Angiogenesis in breast cancer predicts node metastasis and survival. Br J Surg 1994; 81:768.
- 17.-Yamazaki, K. et al.: Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. Cancer 1992; 340:145.
- 18.-Gasparini, G. et al.: Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head and neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 1993;55:739.
- 19.-Saclarides, TJ. et al.: Tumoral angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 1994; 37:921.
- 20.-Olivares, D. et al.: Neovascularization in clinical stage A testicular germ-cell tumor: prediction of metastatic disease. Cancer Res 1994; 54:2800.
- 21.-Jaeger, TM. et al.: Tumor angiogenesis and lymph node metastasis in invasive bladder carcinoma. J Urol 1994; 151:348.
- 22.-Ewaskow, SP. et al.: Quantitative assessment of blood vessel density and size in soft-tissue tumors. Mod Pathol 1993; 6:6A.
- 23.-Vacca, A. et al.: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. Br J Haematol 1994; 87:503.
- 24.-Hollingsworth, HC. et al.: Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol 1995; 147:33.

- 25.-Fregene, T. et al.: Tumor associated angiogenesis in prostate cancer. *Anticancer Res* 1993; 13:2377. (Resumen)
- 26.-Li, VW. et al.: Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 1994; 334:82.
- 27.-Van Hoef, MEHM. et al.: Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A:1141.
- 28.-Weidner, N. et al.: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1875.
- 29.-Hall, NR. et al.: Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992; 1:223.
- 30.-Carnochan, O. et al.: The vascularity of cutaneous melanoma: A quantitative histologic study of lesions 0.8-1.25mm in thickness. *Br. J Cancer* 1991; 64:102.
- 31.-Leedy, DA. et al.: Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in cervical carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111:417. (Resumen)
- 32.-Nadji, M. y Morales, AR.: Immunoperoxidase techniques: a practical approach. Chicago, American Society of Clinical Pathologists Press, 1986, p.234.
- 33.-De Young, BR. et al.: CD31: an immunospecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1993; 1:97. (Resumen)
- 34.-Traweek, ST. et al.: The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1991; 96:25
- 35.-Wang, JM. et al.: A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues. *Int J Cancer* 1993; 54:363.
- 36.-Honn, KV. et al.: Prostate Cancer: Old problems and New approaches. Part II. Diagnostic and prognostic markers. Pathology and Biological aspects. *Pathol Oncol Res* 1996; 2:191.
- 37.-Netto, GC. et al.: Molecular Biologic aspects of human prostatic carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994; 102(Suppl1):S57.

38.-Brawer, MK. et al.: Predictors of pathologic stage in prostate carcinoma. Cancer 1994; 73:678.

39.-Gleason, DF.: Histologic grading of prostate cancer. Hum Pathol 1992; 23:237.

40.-Nicolson, G.: Cancer Metastasis. Sci Am 1979; 240:66.

41.-Gould, VE. et al.: Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hiperplasias, dysplasias and neoplasms. Lab Invest 1983; 49:519.

42.-Bigler, SA. et al.: Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. Hum Pathol 1993; 24:220.

43.-Wakui, S. et al.: Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. J Pathol 1992; 168:257.

44.-Dawson, BS. y Trapp, RG.: Bioestadística Medica. Ed. Manual Moderno, Mexico, D.F., 1993.

**TABLE 1. GLEASON GRADING SYSTEM FOR PROSTATIC ADENOCARCINOMA: HISTOLOGIC PATTERNS**

<i>Pattern</i>	<i>Peripheral Borders of Tumor</i>	<i>Stromal Invasion</i>	<i>Appearance of Glands</i>	<i>Size of Glands</i>	<i>Architecture of Glands</i>	<i>Cytoplasm</i>
1	Circumscribed, pushing, expansile	Minimal	Simple, round, monotonously replicated	Medium, regular	Closely packed, rounded masses	Similar to benign epithelium
2	Less circumscribed, early infiltration	Mild, with definite separation of glands by stroma	Simple, round, some variability in shape	Medium, less regular	Loosely packed, rounded masses	Similar to benign epithelium
3A	Infiltration	Marked	Angular, with variation in shape	Medium to large	Variably packed, irregular masses	More basophilic than patterns 1 and 2
3B	Infiltration	Marked	Angular, with variation in shape	Small	Variably packed, irregular masses	More basophilic than patterns 1 and 2
3C	Smoothed, rounded	Marked	Papillary and cribriform	Irregular	Round to elongate masses	More basophilic than patterns 1 and 2
4A	Ragged infiltration	Marked	Microacinar, papillary, and cribriform	Irregular	Fused, with chains and cords	Dark
4B	Ragged infiltration	Marked	Microacinar, papillary, and cribriform	Irregular	Fused, with chains and cords	Clear (hyponephroid)
5A	Smooth, rounded	Marked	Comedocarcinoma	Irregular	Round to elongate masses	Variable
5B	Ragged infiltration	Marked	Difficulty to identify gland lumens	Sheets of glands	Fused sheets and masses	Variable