



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL ESTADO DE MADUREZ DE LA
MICROVASCULATURA EN SUBTIPOS HISTOLÓGICOS
DE ADENOCARCINOMA PULMONAR”**

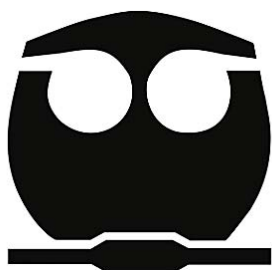
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOEL MONTIEL GONZÁLEZ



México, Ciudad de México

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: José Sullivan López González
VOCAL: Enrique Ortega Soto
SECRETARIO: Oscar Armando Pérez Méndez
1er. SUPLENTE: Sonia Mayra Pérez Tapia
2° SUPLENTE: Julio Cesar Martínez Álvarez

Sitio donde se desarrolló el tema:




Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”
Unidad de investigación,
Laboratorio de Cáncer Pulmonar

Asesor del tema: _____
Dr. José Sullivan López González

Supervisor técnico: _____
M. en C. Manuel Meneses Flores

Sustentante: _____
Joel Montiel González



“En el camino, tanto de la vida como en el vascular, debemos de ir rectos, alejándonos del parloteo tumoral y estromal que nos hará disfuncionales y nos enredará”.

Joel Montiel, 2015

D E D I C A T O R I A

Este trabajo se lo dedico a las personas que me han ayudado a lo largo de la vida:

A mis padres Lulú y Miguel que me han guiado desde los primeros pasos de mi vida.

A mis hermanos Guadalupe y Miguel con quienes crecí, aprendí a compartir y jugué muchas veces.

A mis abuelitas Lupita e Isabel, que me han brindado su soporte y cariño.

A los compañeros y profesores que he tenido a lo largo de la vida en las instituciones escolares, con quienes he podido intercambiar y enriquecer ideas y conocimientos.

A mi familia Libertad y Sophia que cada me brindan su tiempo y cariño.

A aquellos que ocultos me apoyan en cada paso que doy y a aquellos que sin saberlo han contribuido en apoyo de mi desarrollo.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de adquirir en sus aulas los conocimientos necesarios para mi desarrollo profesional.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que con uso de sus instalaciones pude desarrollar el presente trabajo.

Al Dr. José Sullivan López González quien me invito a desarrollar el proyecto y a Manuel Meneses Flores quien me dirigió durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del laboratorio de cáncer pulmonar Dolores, Susana, Ángeles, Eriberto y Miriam quienes enriquecieron este trabajo con sus valiosos comentarios.

A mis compañeros en el laboratorio Rodolfo, Andrea, Christian, Verónica, Lorenzo, Alma, Jimena, Antonio, Ethelia y Rosa con quienes pude pasar buenos momentos.

C O N T E N I D O

“ESTUDIO DEL ESTADO DE MADUREZ DE LA MICROVASCULATURA EN SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR”

CONTENIDO.....	1
RESUMEN	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
<i>Etiología del cáncer</i>	4
<i>Lecho vascular</i>	15
<i>Terapias anti-angiogénicas</i>	28
<i>Epidemiología del Cáncer pulmonar</i>	29
<i>Clasificación del Cáncer pulmonar</i>	30
ANTECEDENTES	35
<i>Estudios del lecho vascular en cáncer</i>	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
<i>Justificación</i>	42
<i>Hipótesis</i>	42
<i>Objetivo</i>	42
<i>Estrategia experimental</i>	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
<i>Material biológico</i>	44
<i>Procedimiento metodológico</i>	44
<i>Controles de reactividad empleados</i>	47
<i>Selección de campos</i>	47
<i>Cuantificación de la densidad microvascular</i>	47
<i>Análisis estadístico</i>	47
RESULTADOS	48
<i>Frecuencias de los subtipos histológicos</i>	48
<i>Células endoteliales (cd34⁺) y pericitos (α-sma⁺) en vasos sanguíneos de adenocarcinoma pulmonar de acuerdo al subtipo histológico</i>	49
<i>Comparación de la variables estudiadas de acuerdo al subtipo de adenocarcinoma pulmonar</i>	54
<i>Densidad microvascular en adenocarcinomas pulmonares mediana y altamente invasivos</i>	56
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS	61

R E S U M E N

Introducción: El cáncer involucra cambios dinámicos en el genoma. Estos cambios producen oncogenes con carácter dominante (ganancia de función) y genes recesivos llamados genes supresores de tumor (pérdida de función).

En el cáncer se presentan seis alteraciones esenciales en su fisiología que, colectivamente, dirigen el crecimiento maligno. Una de estas alteraciones es la angiogénesis sostenida. Los vasos recién formados (inmaduros) son diferentes de los vasos preexistentes (maduros). Los primeros carecen de organización y jerarquía, además de que se encuentran distribuidos de manera desigual en el tejido tumoral. En cambio, los vasos maduros se encuentran recubiertos con células periciticas. Se considera que, en los vasos presentes en los tumores, los pericitos presentan una asociación laxa con las células endoteliales, dejando la mayor parte de los microvasos tumorales descubiertos o inmaduros.

Recientemente la International Association for the Study of Lung Cancer, la American Thoracic Society y la European Respiratory Society (IASLC/ATS/ERS) han propuesto una nueva clasificación para los tumores pulmonares tipo adenocarcinoma. Tomando en cuenta las características histológicas, moleculares, clínicas, radiológicas y quirúrgicas, el adenocarcinoma pulmonar se ha dividido en cinco subtipos histológicos designados: lepidico, papilar, acinar, micropapilar y sólido.

Objetivo: En este trabajo se evaluó, en cortes histológicos, la densidad microvascular en los subtipos histológicos de adenocarcinoma antes mencionados para conocer el porcentaje de vasos maduros e inmaduros en cada uno de ellos.

Materiales y Métodos: Para alcanzar esta meta se empleó el doble marcaje inmunohistoquímico usando anticuerpos dirigidos contra la molécula CD34 presente en la membrana de las células endoteliales, y el anticuerpo anti α -actina de músculo liso, molécula presente en el citoplasma de los pericitos. Se localizaron en una misma sección histológica ambos tipos celulares para determinar y conocer el estado de madurez de la microvasculatura tumoral. Se recolectó una muestra de 32 casos de adenocarcinoma pulmonar, que de acuerdo la clasificación de las asociaciones IASLC/ATS/ERS fueron: 9 Acinares, 7 Papilares, 4 Lepídicos, 10 Sólidos y 2 Micropapilares.

Resultados: La densidad microvascular (MVD) fue similar entre todos los subtipos histológicos. El índice de madurez microvascular (VMI) fue diferente entre los subtipos histológicos acinar con respecto al papilar y el sólido. Al agrupar los subtipos histológicos de acuerdo a su pronóstico y su invasividad, en tumores medianamente invasivos (conformado por los tumores tipo lepidico, papilar y acinar) y altamente invasivos (sólido y micropapilar), se encontró diferencia significativa en la densidad de microvasos inmaduros (MVDi) ($p < 0.05$), mientras que la MVD y el VMI fueron similares entre ambos grupos.

Conclusión: De acuerdo con el VMI los pacientes diagnosticados con subtipos histológicos con patrón predominantemente sólido y papilar pudieran ser mejores candidatos para recibir la terapia antiangiogénica, a diferencia de los pacientes diagnosticados con subtipo acinar.

A B R E V I A T U R A S

- AAH:** Hiperplasia adenomatosa atípica
- ABC:** Complejo Streptoavidina-Biotina- peroxidasa
- AIS:** Adenocarcinoma *in situ*
- ANOVA:** Análisis de varianza
- α SMA:** Actina de músculo liso- α
- DAB:** Tetrahidrocloreuro de 3,3'diaminobenzidina
- DNA:** Acido desoxirribonucleico
- EC:** Célula endotelial
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- EPC:** Células endoteliales progenitoras
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos
- Flt-1:** Tirosina cinasa similar a fms
- GMP:** Proliferación glomeruloide microvascular
- HIF:** Factor de transcripción inducible por hipoxia
- KDR:** Receptor contenedor de dominio cinasa insertado
- MIA:** Adenocarcinoma mínimamente invasivo
- MRI:** Imágenes de resonancia magnética
- MPI%:** Índice porcentual de recubrimiento pericítico de microvasos
- MVD:** Densidad microvascular
- MVDi:** Densidad de microvasos inmaduros
- MVDm:** Densidad de microvasos maduros
- NSCLC:** Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PHD:** Proteínas con dominio prolil hidroxilasa
- PLGF:** Factor de crecimiento derivado de placenta
- SCLC:** Carcinoma pulmonar de células pequeñas
- TAM:** Macrófago asociado a tumor
- VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular
- VHL:** Proteína supresora de tumor Von Hippel-Lindau
- VSMC:** Células del músculo liso vascular
- vWF:** Factor von Willebrand

INTRODUCCIÓN

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades que tienen en común la proliferación celular descontrolada, debido a la desregulación de protooncogenes, genes supresores de tumor y genes guardianes de la estabilidad genómica. Esta desregulación es causada por las alteraciones genéticas inducidas por exposición a factores físicos, químicos y biológicos, por defectos en el proceso de reparación del DNA o por errores aleatorios en la replicación celular (Horn, 2012; Anisimov, 2009).

CARCINOGENÉISIS

Al proceso por el cual una célula sufre una transformación neoplásica se le conoce como carcinogénesis, este proceso es gradual y se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Anisimov, 2009).

INICIACIÓN

En la etapa de iniciación, el agente carcinógeno o sus metabolitos activos interactúan con el material genético provocando alteraciones como deleciones, inserciones o translocaciones de genes; o bien alteraciones epigenéticas como la metilación de DNA y la acetilación de histonas (Ponder, 2001; Hanahan, 2011). De esta manera se generan células con oncogenes y alteraciones de los genes supresores de tumor.

Los oncogenes son genes dominantes que codifican proteínas involucradas en la proliferación celular irrestricta, mientras que los genes supresores de tumor son genes recesivos que regulan la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis y metástasis. Ambas alteraciones genéticas causan que la célula transformada no lleve a cabo el proceso de muerte celular y, en cambio, favorecen su proliferación descontrolada. Lo anterior promoverá la formación de la masa tumoral (Weinberg, 1996; Barret, 1993; Pitot, 1991). Las alteraciones genéticas y epigenéticas producidas durante la iniciación son: irreversibles, persistentes y transmisibles a las células hijas (Anisimov, 2009).

PROMOCIÓN

Durante la promoción, la exposición a un agente mitogénico (promotor) estimula la proliferación de las células iniciadas. El efecto del promotor, aunado al del carcinógeno, promueve que distintas células iniciadas adquieran nuevas alteraciones genéticas generación tras generación. Este proceso conlleva a la transformación neoplásica de distintas clonas tumorales, clonas que en su conjunto formarán una masa tumoral heterogénea (heterogeneidad tumoral) (Weinberg, 1996; Barret, 1993; Pitot, 1991). La promoción es modulada por factores del medio externo (promotores y antipromotores) y se caracteriza por una selección reversible de las células iniciadas que se multiplicarán (Anisimov, 2009).

PROGRESIÓN

Una característica de la progresión es el crecimiento de células tumorales hacia los tejidos adyacentes, conocida como **invasión**. Esta propagación de las células neoplásicas es lograda, principalmente, mediante alteraciones en el patrón de expresión de las moléculas del complejo de adhesión celular, E-cadherina-cateninas. Este complejo participa en la arquitectura tisular y es parcialmente responsable de la diferenciación celular. Alteraciones en las moléculas que conforman este complejo provocan que las células pierdan cohesión celular, se presenten cambios morfológicos y las células incrementen su motilidad. Otra alteración adquirida por las células neoplásicas en esta etapa es la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar la membrana basal de los vasos. La producción de estas enzimas permite que las células tumorales entren al torrente sanguíneo y/o linfático y se diseminen a órganos distantes. A esta última capacidad se le conoce como **metástasis** y es propia de un tumor maligno (Weinberg, 1996; Barret, 1993; Pitot, 1991).

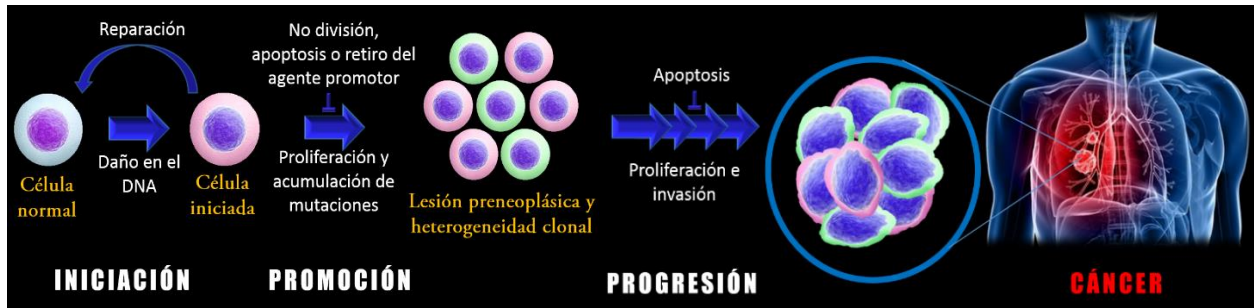


Figura 1. Modelo de carcinogénesis. En la iniciación hay daño al DNA celular por agentes mutagénicos. Las células dañadas que no entran en un proceso de reparación o apoptosis, constituyen las células iniciadas que difieren fenotípicamente en sus capacidades de proliferación y evasión de la apoptosis. Posteriormente, durante la promoción, las células iniciadas a través de la constante exposición a agentes mutagénicos y mitógenos adquieren distintas alteraciones genéticas lo que las lleva a presentar distintos fenotipos (heterogeneidad tumoral). Durante la progresión, las células neoplásicas adquieren la capacidad de invasión y metástasis para diseminarse a todo el cuerpo.

Se ha demostrado en modelos experimentales, *in vivo* e *in vitro*, que la carcinogénesis involucra varios cambios progresivos (Greemberg, 2002) llamados:

- 1) Hiperplasia, que es la proliferación celular excesiva sin alteraciones cromosómicas ni cambios citológicos.
- 2) Metaplasia que implica la exacerbación de un tipo celular determinado, lo que origina un cambio en el tejido sano por otro distinto al que se produce normalmente (como ocurre frecuentemente al momento de regenerar un tejido),
- 3) Displasia que es un estado de degeneración celular debido a la pérdida de caracteres morfológicos y al incremento de anormalidades cromosómicas en las células iniciadas, frecuentemente consideradas como lesiones preneoplásicas.
- 4) Anaplasia, que es la regresión de las células a una forma muy primitiva e indiferenciada, conocida también como atrofia regresiva o desdiferenciación. Este proceso comprende alteraciones en número o estructura de uno o más cromosomas, así como la pérdida parcial o total de los caracteres morfológicos celulares en forma irreversible, por lo que se considera como el inicio del establecimiento de una neoplasia o tumor *in situ*.

Se estima que la célula transformada y en constante división, requiere de un periodo relativamente largo (años) para llegar a alcanzar una masa celular clínicamente detectable llamada tumor (Greemberg, 2002).

CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER (HALLMARKS OF CANCER)

El cáncer es una patología compleja y progresiva que se manifiesta a través de seis alteraciones en la fisiología celular que colectivamente dirigen el crecimiento maligno. Estas alteraciones son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, replicación celular ilimitada, metástasis y **angiogénesis sostenida** (Hanahan, 2000). Recientemente se ha propuesto además a la reprogramación metabólica y a la evasión de la respuesta inmune como posibles características distintivas (hallmarks) adicionales (Hanahan, 2011).

ANGIOGÉNESIS TUMORAL

El término angiogénesis es comúnmente usado para referenciar el proceso de crecimiento vascular, denotando en sentido estricto, el brote proveniente de los vasos preexistentes. No obstante, en el estudio del cáncer el término angiogénesis o angiogénesis tumoral es usado para describir otros procesos fisiológicos -como la intususcepción y vasculogénesis- y procesos característicos -como la coopción y mimetismo vascular- que usan las células tumorales para formar y remodelar su red vascular (Potente, 2011).

En cáncer, la angiogénesis cobra importancia debido a que el crecimiento tumoral es, en gran parte, dependiente de la actividad angiogénica (Folkman, 1989; Vermaulen, 2002). Esto último se explica ya que procesos esenciales para la función y supervivencia celular (como el abastecimiento de oxígeno y nutrientes, así como la capacidad de desechar residuos metabólicos y dióxido de carbono) se llevan a cabo a través del lecho vascular. Esto obliga virtualmente a todas las células de un tejido a residir a una distancia no mayor de 100 μm de un vaso sanguíneo capilar (Carmeliet, 2000).

Inicialmente, las células con proliferación aberrante son incapaces de efectuar el proceso angiogénico, lo que limita su posibilidad de expansión, manteniendo la lesión en un tamaño menor de 2 mm de diámetro. En la promoción tumoral, el switch angiogénico es

activado por un desequilibrio entre las moléculas pro-angiogénicas y las anti-angiogénicas a favor de las primeras. Lo anterior causa que de la vasculatura quiescente, constantemente surjan nuevos vasos que mantienen el crecimiento neoplásico expansivo (Hanahan, 2011). Para alcanzar un tamaño y una velocidad de crecimiento mayor, las neoplasias incipientes suelen desarrollar una alta capacidad angiogénica (Bouck, 1996; Hanahan, 1996; Folkman, 1989).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)-A y la trombospondina 1 son los prototipos mejor estudiados de los factores que inducen o inhiben la angiogénesis, respectivamente (Hanahan, 2011). El VEGF-A puede ser sobreexpresado por la activación del oncogen en las células tumorales, o bien en condiciones de hipoxia a través del factor de transcripción inducible por hipoxia, tanto en células tumorales como del estroma.

Además, la capacidad angiogénica del tumor está íntimamente asociada con el desarrollo de metástasis, ya que la formación de nuevos vasos sanguíneos incrementa la posibilidad de que las células malignas puedan entrar al torrente sanguíneo e invadir otros tejidos. Los vasos sanguíneos recién formados son más permeables, debido a que su membrana basal no es continua, lo que permite el acceso de células tumorales. No obstante, la capacidad angiogénica por sí misma, no es suficiente para desarrollar metástasis (Meert, 2002).

Tipos de angiogénesis utilizadas en el crecimiento tumoral:

ANGIOGÉNESIS POR BROTE O GEMACIÓN

La angiogénesis por brote es el proceso mejor estudiado en cáncer. En este tipo de neovascularización, algunas células endoteliales atraídas por señales proangiogénicas llegan a ser móviles e invasivas generando proyecciones citoplasmáticas llamadas filopodios. Estas células llamadas “células guía”, dirigen a los nuevos brotes hacia señales quimiotácticas, generadas por gradientes de VEGF. Siguiendo a las células guía, las células tallo extienden sus *filopodia* para establecer un lumen y proliferar para soportar la elongación del brote. Las células guía realizan anastomosis con células de brotes vecinos para construir bucles vasculares. Estas nuevas conexiones se estabilizan con el

establecimiento de una membrana basal, el reclutamiento de células murales y la iniciación del flujo sanguíneo.

En condiciones fisiológicas, este proceso se repite hasta que las señales proangiogénicas se abaten y la quiescencia es reestablecida. Sin embargo, en cáncer este proceso es permanente y sostenido por las moléculas proangiogénicas producidas por las células tumorales y del estroma (Potente, 2011).

VASCULOGÉNESIS

En este proceso ocurre la formación y expansión de vasos a partir de una población de células circulatorias denominadas Células Endoteliales Progenitoras (EPC's), las cuales se movilizan en respuesta a la baja concentración de oxígeno en tejidos y a la producción de factores pro-angiogénicos, como los encontrados en el microambiente tumoral donde, debido a su capacidad para proliferar, migrar y diferenciarse promueven la formación de un lecho vascular. En el estroma tumoral, estas células secretan factores pro-angiogénicos (Moschetta, 2014).

COOPCIÓN VASCULAR

La coopción vascular es un proceso mediante el cual los tumores aprovechan la vasculatura preexistente en el tejido invadido para sus necesidades fisiológicas. Este proceso es observado con frecuencia en tumores secundarios que inician la colonización de tejidos altamente vascularizados como el cerebro, hígado y pulmón. De tal forma que la coopción vascular puede considerarse como un proceso inicial de vascularización, ya que otros mecanismos como la "regresión vascular", la hipoxia tumoral y la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos, activan la angiogénesis propiamente dicha para continuar el crecimiento tumoral.

La coopción vascular se ha propuesto como una explicación al hecho de que la terapia anti-angiogénica no sea efectiva en el tratamiento de los tumores que adoptan este mecanismo de vascularización (Donnem, 2013).

MIMETISMO VASCULAR

El término "mimetismo vascular" hace referencia a la capacidad de las células tumorales para diferenciarse en células semejantes a las endoteliales (por plasticidad

transendotelial) e integrarse a las redes vasculares formadas *de novo* y, de esta manera, conectarse con la vasculatura normal formada de células endoteliales. Estas células tumorales, que mimetizan a las endoteliales, suelen coexpresar marcadores de células endoteliales, células madre y células tumorales; además de genes relacionados con la angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular e inhibidores de la coagulación.

El cambio fenotípico, de tumoral a endotelial, se ha relacionado con un microambiente hipóxico. En estudios recientes se ha observado que las llamadas células madre tumorales tienen la plasticidad suficiente para diferenciarse en células endoteliales (Seftor, 2012).

Ya que algunos tipos de vascularización identificados no requieren de la derivación de los vasos preexistentes (como el mimetismo vascular y la coopción), la afirmación de Judah Folkman de que todos los tumores necesitan de la angiogénesis para crecer, invadir y hacer metástasis, ya no es aplicable a todos los tumores (Vermeulen, 2002). Los distintos procesos de vascularización, en conjunto con los procesos de angiogénesis fisiológica, reclutan los vasos dentro de la mayoría de los tumores.

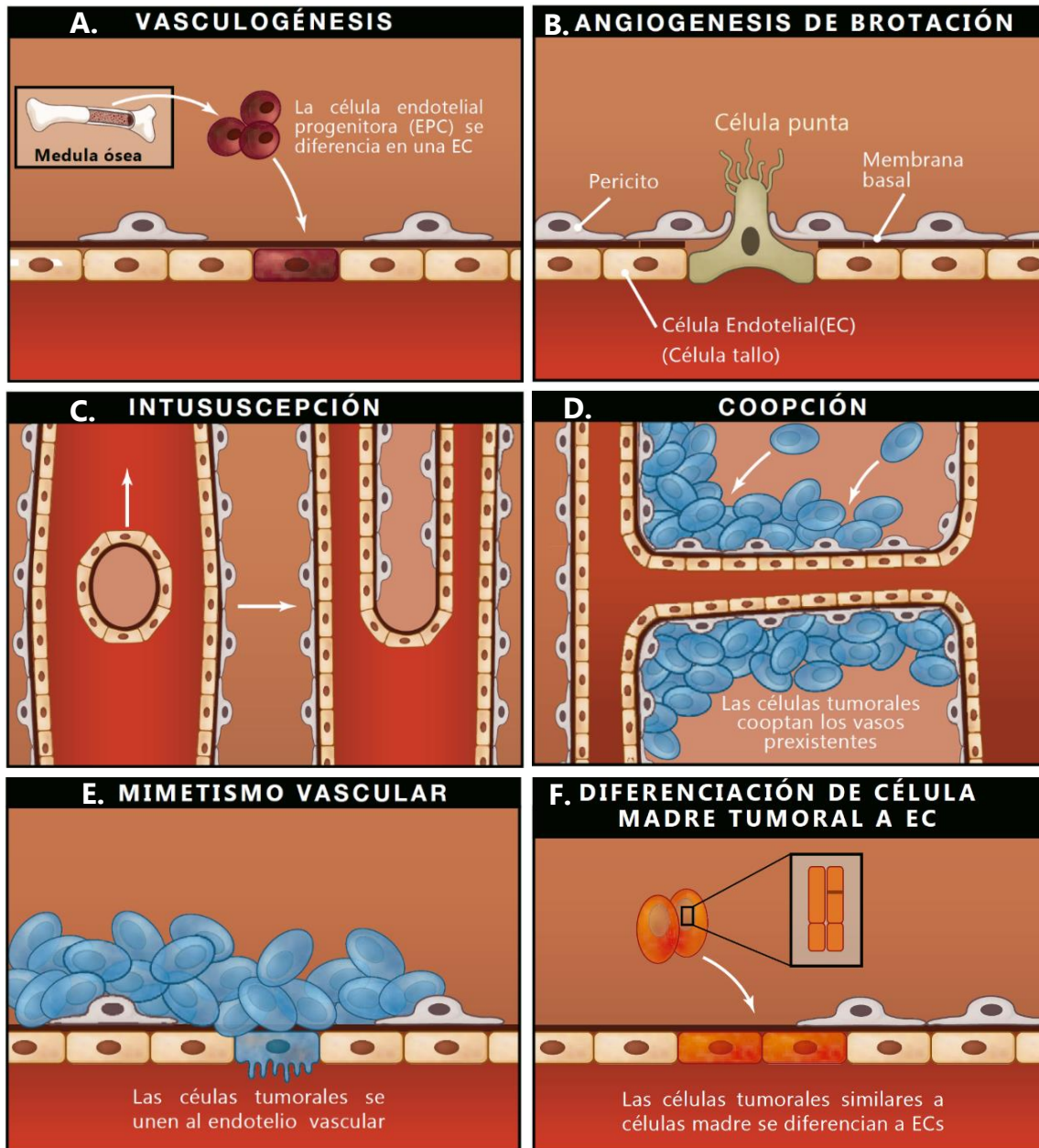


Figura 2. Tipos de angiogénesis tumoral. A. Vasculogénesis, es un mecanismo fetal que se ha encontrado en el desarrollo tumoral donde el tumor y células del estroma reclutan EPC para la formación de nuevos vasos sanguíneos. B. Angiogénesis de brotación, el tipo más común de formación de vasos donde los brotes vasculares surgen a partir de las células que conforman el vaso preexistente. C. Intususcepción, es una remodelación del lecho vascular, de donde a partir de un vaso grande se generan capilares D. Coopción, las células tumorales secuestran el lecho vascular preexistente del tejido donde se origina o en el que invade. E. Mimetismo vascular F. Diferenciación de célula madre tumoral a EC, en estos dos tipos de angiogénesis, la vasculatura surge a partir de la transdiferenciación de las células tumorales a células endoteliales diferenciadas o con algunas de sus características.

ANGIOGÉNESIS EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Debido a que la tasa de proliferación de las células tumorales es superior a la de las células endoteliales, llega un momento en que la masa tumoral entra en un estado de estrés hipóxico. Esto provoca la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) y la consecuente expresión de genes proangiogénicos controlados por este factor, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina 2 (Ang2), sintasa del óxido nítrico (NOS) y la sub-unidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B) (Carmeliet, 2000).

Cuando la condición hipóxica no es resuelta, se produce un estado de necrosis celular e infiltración de neutrófilos, monocitos y macrófagos asociados al tumor. Estas especies celulares pueden inducir angiogénesis de manera independiente del VEGF, mediante la secreción de moléculas proangiogénicas como el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) y metaloproteinasas (Botta, 2013; Folkman, 2003).

FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF)

HIF es una proteína heterodimérica formada por la subunidad HIF-1 β que es estable y expresada constitutivamente y una de las tres subunidades HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α o HIF-3 α) reguladas de manera dependiente de la presión parcial de oxígeno. La activación de HIF es un proceso de múltiples pasos que incluyen: estabilización de HIF- α , translocación nuclear, heterodimerización, activación transcripcional e interacción con otras proteínas (Pouysségur, 2006). La regulación de la activación de HIF se lleva a cabo mediante el control de la vida media de la subunidad HIF- 1 α (< 5min en normoxia) a través de dos sensores de oxígeno:

- El primer sensor lo constituyen las proteínas con dominio prolina hidroxilasa (PHDs). Estas enzimas actúan en dos residuos de prolina (P402 y/o P564) del HIF-1 α , región conocida como dominio de degradación dependiente de oxígeno. Esta modificación induce una rápida interacción con la proteína supresora de tumor Von Hippel-Lindau (VHL), un componente del complejo ubiquitina ligasa E3 que lleva, consecuentemente, al factor de transcripción a su destrucción en el proteasoma.

- El segundo sensor es una asparagina hidroxilasa referida como factor inhibitorio de HIF-1 α (FIH). Esta enzima actúa en el residuo de asparagina N803 contenido en el dominio principal de activación transcripcional, en la región carboxilo terminal de la subunidad HIF-1 α . Esta alteración covalente modifica la interacción con los co-activadores transcripcionales como p300 y su parálogo la proteína de unión a CREB (Pouysségur, 2006).

La actividad de ambos sensores es estrictamente dependiente de la presión parcial de O₂ celular, por lo que estas moléculas sensores de oxígeno permiten el control en la respuesta hipóxica. La actividad de estas enzimas disminuye en condiciones de hipoxia, lo que permite la activación de HIF. Este factor ha sido reconocido como un factor de transcripción maestro controlador del estrés nutricional ya que induce productos génicos que regulan el metabolismo, la neovascularización, la supervivencia y migración celular. Por esta razón HIF ha sido establecido como un fuerte promotor del crecimiento tumoral (Pouysségur, 2006)

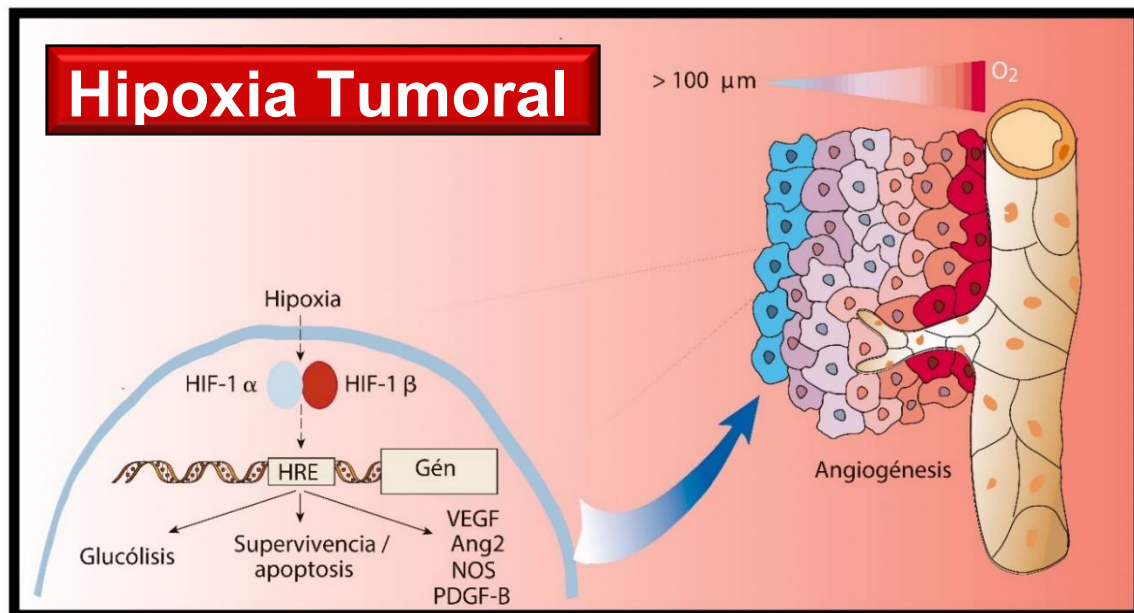


Figura 3. Hipoxia tumoral. En la masa tumoral, conforme las células se van a alejando de los vasos sanguíneos su abastecimiento de oxígeno y nutrientes es menor. Las células en las regiones más alejadas entran en un estado de hipoxia. En este estado, el factor de transcripción HIF se estabiliza dentro de los núcleos celulares donde induce la expresión de genes de control metabólico, supervivencia o apoptosis y de angiogénesis. Dentro de estos últimos, destaca el VEGF al que se le ha atribuido la alta capacidad angiogénica.

PROMOTORES ANGIOGÉNICOS

FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR A (VEGF-A)

El VEGF-A es expresado en la mayoría de los tejidos y por la mayoría de los tumores. Es una proteína homodimérica de 40 a 45 kDa existe en distintas isoformas conteniendo 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. La isoforma predominante contiene 165 aminoácidos y es conocida como VEGF₁₆₅. Este factor de crecimiento es mitogénico e inductor de motilidad de las células endoteliales (un factor pro-angiogénico). Se ha observado que en la masa tumoral, el VEGF-A atrae y guía a los brotes de neovascularización a regiones deficientes de oxígeno.

Existen dos receptores para el VEGF-A que se expresan principalmente en el endotelio vascular. Uno de ellos es el receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR)1 de 180 kDa, cuya funcionalidad no se ha esclarecido del todo, pero se ha observado que inhibe la actividad del VEGF-A al ser antagonista de su otro receptor, el VEGFR2 de 200 kDa. A este último receptor se le atribuye la mediación de las funciones del VEGF-A en la célula endotelial, tales como: migración, proliferación y diferenciación (Folkman, 2007).

La unión del VEGF-A al VEGFR2 desencadena rutas de señalización que modulan la fosforilación, estabilidad y/o actividad de una variedad de moléculas río abajo, incluyéndose a sí misma y al HIF. Hemos mencionado que este factor de transcripción (HIF) estimula la producción de moléculas angiogénicas, entre las que se encuentra el VEGF-A. Por lo que la intensidad de señalización de este ciclo de retro-alimentación positiva es reconocida como un aspecto clave en la angiogénesis tumoral (Mésange, 2014).

A pesar de que la unión de HIF al promotor del gen *VEGFA* es clave para la expresión del VEGF-A, existen otros dos controles transcripcionales principales mediados a través de las vías Ras-ERK y PI3K-AKT (Pouysségur, 2006).

La observación de la co-expresión del VEGF-A y sus receptores (en particular el VEGFR1) en distintos tipos de células de tumorales, incluyendo tumores hematológicos,

sustenta la propuesta de que el VEGF-A podría estar actuando como un factor de crecimiento autócrino para las células tumorales (Kerbel, 2008).

OTROS PROMOTORES

Existen otros promotores angiogénicos como:

- **Los miembros de la familia del factor de crecimiento para fibroblastos (FGF).** Estas moléculas han sido implicadas en el mantenimiento de la angiogénesis tumoral cuando su expresión es sobrerregulada crónicamente. La familia de FGF incluye un total de 22 diferentes tipos de FGFs. De estos, dos tienen actividad angiogénica *in vivo*, el factor de crecimiento para fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1) y el básico (bFGF o FGF-2). Estos factores además de su actividad mitótica en el endotelio vascular, tienen múltiples blancos celulares como fibroblastos, células del músculo liso y neuronas (Hanahan, 2011; Bafico, 2003; Folkman, 2003).
- **Bv8 (Prokineticina 2).** Es una proteína con actividad mitogénica en células endoteliales que promueve la angiogénesis tumoral de manera independiente del VEGF-A. Esta molécula es producida por células mieloides CD11b⁺ Gr1⁺ (Ly6C; Lymphocyte antigen 6C) del estroma tumoral (Chung, 2010). Esta molécula actúa a través de la activación de la vía de señalización PKR1/MAPK/Akt, favoreciendo la proliferación, migración y angiogénesis por células endoteliales (Guilini, 2009).
- **El factor de crecimiento placentario (PLGF).** Este factor de crecimiento, pese a no tener actividad mitogénica en células endoteliales, actúa sinérgicamente con el VEGF-A para promover angiogénesis. Se ha propuesto que el PLGF logra esta actividad al desplazar al VEGF-A del VEGFR1, ya que el receptor presenta mayor afinidad para interactuar con PLGF (Staker, 2013). Además, la neutralización con el anticuerpo específico para PLGF inhibe la angiogénesis en tumores resistentes a la terapia anti-angiogénica con anti-VEGFR2 (Chung 2010).

LECHO VASCULAR

En el embrión, el sistema cardiovascular es el primero en desarrollarse y en alcanzar un estado funcional, dada la importancia del abastecimiento de nutrientes y oxígeno y de la eliminación de productos catabólicos de los tejidos. Su formación se da durante la embriogénesis, donde por medio del ensamblaje de precursores derivados de

mesodermo (angioblastos) se diferencia un laberinto vascular primitivo de vasos formados *de novo* (vasculogénesis). El subsecuente brote de vasos (angiogénesis) crea una red que se remodela en arterias y venas (Potente, 2011).

En la etapa adulta, los vasos son quiescentes y raramente forman nuevas ramas. Sin embargo, las células endoteliales mantienen una alta plasticidad para detectar y responder a las señales angiogénicas dadas en los eventos de: cicatrización de heridas, inflamación, crecimiento del endometrio en el ciclo menstrual, isquemia e hipoxia (Chung, 2010; Potente, 2011).

RECUBRIMIENTO PERICÍTICO

Los pericitos son células multipotentes, perivasculares, relativamente indiferenciadas, que están yuxtapuestas a la pared abluminal de células endoteliales en los vasos pequeños, como son: los capilares, pre-capilares, arteriolas, vénulas post-capilares y vénulas colectoras. Los pericitos son considerados como reguladores dinámicos de la fisiología microvascular por las funciones que desempeñan como son: la regulación del flujo sanguíneo, sensores de estímulos angiogénicos, etc. Además, muestran gran heterogeneidad en fenotipo, distribución y origen (Birbrair, 2015; Schrimpf, 2011; Armulik, 2011; Dulmovits, 2012).

Su descubrimiento se atribuye al francés Charles-Marie Benjamin Rouget, quien describe una población de células contráctiles rodeando las células endoteliales de los vasos sanguíneos pequeños nombrándolas “células Rouget”. Cincuenta años después Zimmerman las renombra como “Pericitos” (Armulik, 2011).

ONTOGENIA DE LOS PERICITOS

Los pericitos son considerados del mismo linaje y categoría que las células del músculo liso vascular (vSMC) (Armulik, 2011) derivándose del tejido local, específicamente mesotelial, en la mayoría de los tejidos (Schrimpf, 2011). En cambio, los pericitos de la región cefálica y del timo derivan de la cresta neural (Birbrair, 2015; Armulik, 2011).

FUNCIÓN DE LOS PERICITOS

En adición a que los pericitos físicamente estabilizan los vasos y regulan el flujo sanguíneo, también participan en el desarrollo, maduración, remodelación, arquitectura y

permeabilidad vascular. Asimismo, colaboran con los astrocitos en mantener la integridad funcional de la barrera hematoencefálica, promueven la coagulación sanguínea y la respuesta inmune al regular la activación de los linfocitos. Se ha reportado que presentan propiedades fagocíticas. Además, se les ha identificado como células madre que participan en la formación y regeneración de tejidos, teniendo potencial condrogénico, adipogénico y fibrogénico. En el sistema nervioso central, los pericitos pueden ser reprogramados como células neuronales (Birbrair, 2015; Schrimpf, 2011).

En general, su presencia y comunicación con otras células favorece la supervivencia del tejido, ya que acelera la cicatrización de heridas y contribuyen a la formación de tejido fibroso. Ejemplo de esto es que su presencia y reclutamiento en tejido cardiaco mejora su función después de que se ha sufrido un infarto al miocardio (Birbrair, 2015).

La participación de los pericitos como fuente de miofibroblastos ha sido demostrada en piel, mediante la inducción con Interleucina-33, y en riñón a través de un mecanismo dependiente de PDGF. Como miofibroblastos, forman parte del componente celular del tejido conectivo, siendo cruciales en el mantenimiento de la matriz extracelular. Además, secretan numerosos factores de crecimiento entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), bFGF, TGF- β , PDGF-BB y VEGF (Dulmovits, 2012).

Los pericitos son potenciales blancos en la terapia contra el cáncer por tener potencial de células madres o progenitoras mesenquimales, que dan origen a células que conforman el estroma del tumor. Además, se ha propuesto que los pericitos protegen a los vasos sanguíneos de sufrir un proceso de regresión y destrucción ante terapias anti-angiogénicas (Schrimpf, 2011; Armulik, 2011).

DISTRIBUCIÓN DE LOS PERICITOS

En casi todos los tejidos, los pericitos se extienden a lo largo de la superficie abluminal del tubo endotelial, uniendo ocasionalmente las ramas de los capilares. Solo en condiciones de desarrollo anormal o en situaciones patológicas, los capilares linfáticos parecen atraer pericitos ectópicos (Armulik, 2011).

La densidad de pericitos varía en cada órgano y en sus secciones vasculares, al igual que la proporción de endotelio que es recubierto. La relación pericito-célula endotelial en

sistema nervioso central y en retina es de 1:1, en riñón es de 1:2.5, en el pulmón y piel de 1:10 y sólo de 1:100 en el músculo esquelético (Birbrair, 2015; Schrimp, 2011). El porcentaje de área superficial endotelial abluminal recubierta con pericitos varia en todo el cuerpo en un rango de 70% a 10% (Armulik, 2011).

Con base a la observación de estas diferencias, en parte específicas de cada órgano, se ha propuesto que: a mayor número de pericitos, más alta es la presión sanguínea en un órgano y mayor es el control de los vasos sanguíneos. Por lo que se observa que la densidad pericítica y su recubrimiento correlaciona positivamente con las propiedades de la barrera endotelial y de renovación endotelial (mayor recubrimiento = menor renovación de EC) y además con la presión ortoestática sanguínea (mayor recubrimiento en partes más bajas del cuerpo). Estas observaciones son consistentes con el rol de los pericitos en regular las barreras capilares, la proliferación endotelial y el diámetro capilar en cada órgano. (Armulik, 2011).

COMUNICACIÓN PERICITO-CÉLULA ENDOTELIAL

Los pericitos se comunican con las células endoteliales a lo largo de la longitud de los vasos por contacto físico y por señalización paracrina, regulando la extensión de la neovascularización (Birbrair, 2015; Dulmovits, 2012).

La interface pericito-célula endotelial es separada por la membrana basal, aun así, existen orificios discretos en ésta, donde los dos tipos celulares mantienen contacto permitiendo su comunicación. El número y la longitud de los contactos pericito-célula endotelial es variable, pero más de 1000 contactos han sido descritos para una sola célula endotelial (Armulik, 2011).

Dentro de los contactos entre las células, se han descrito varios tipos: i) los contactos de tipo clavija/enchufe (peg/socket), en los cuales los dedos citoplásmicos del pericito (pegs) son insertados en las invaginaciones endoteliales (sockets); ii) los de contacto cercano (close occluding contatcs) que son sitios donde las membranas de ambas células se acercan; iii) las placas de adhesión donde se muestran manojos de microfilamento unidos a la membrana plasmática del pericito y un material electro-denso en el citoplasma endotelial opuesto; y iv) las estructuras de uniones tipo Gap (Armulik, 2011).

Se conoce que las células endoteliales secretan PDGF-BB, el cual se une a su receptor PDGFR- β localizado en el pericito. La unión ligando-receptor inicia una cascada de señalización para inducir la proliferación pericítica y su migración a los brotes vasculares recientemente formados. Otra vía involucrada en la señalización célula endotelial-pericito es la vía angiopoyetina/receptor cinasa de tirosina 2 (Tie-2). La angiopoyetina-1 (ang-1) es expresada por células mesenquimales perivasculares, dentro de las que se encuentran los pericitos, mientras que su receptor principal Tie-2 es expresado predominantemente en las células endoteliales. La unión ligando receptor Ang-1/Tie-2 media la estabilidad y maduración del endotelio, además de reducir la permeabilidad vascular (Armulik, 2011).

También existe la vía de señalización de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF). Dentro de esta familia se encuentra el TGF- β que a través de sus dos receptores con actividad de cinasa, similar al receptor de activina (Alk)-1 y Alk-5, median diferentes y a veces efectos celulares opuestos. Por un lado, el Alk-1 promueve la proliferación y migración celular y por el otro Alk-5 su quiescencia migratoria y mitótica. Tanto el TGF- β como sus receptores son expresados por ambas especies celulares (pericitos y células endoteliales). Es a través de estas vías de señalización que durante la vasculogénesis, los pericitos fomentan la diferenciación de las EPC mientras estabilizan la formación neovascular (Armulik, 2011).

Además, el estímulo físico de los pericitos a las células endoteliales es otro tipo de comunicación, ya que la perturbación de la contractibilidad pericítica sirve como un switch angiogénico para las células endoteliales durante la cicatrización de las heridas (Dulmovits, 2012).

IDENTIFICACIÓN DE PERICITOS

Los pericitos son consideradas células murales que se encuentran embebidas en la membrana basal de los microvasos; a diferencia, las células de músculo liso de los vasos (VSMCs) se encuentran separadas de las células endoteliales por una lámina elástica interna (Schrimpf, 2011). Por no existir marcador específico y estable que pueda ser usado inequívocamente para identificar a los pericitos y distinguirlos de las VSMCs u otras células mesenquimales, la identificación precisa de los pericitos es difícil.

Los pericitos, por su localización, son comúnmente confundidos con las VSMCs, fibroblastos, macrófagos y hasta células epiteliales, especialmente en tejidos donde la angiogénesis es activa y la membrana basal está en un estado de síntesis o remodelación. Como resultado, el término “*pericito*” es frecuentemente usado en la literatura para denotar cualquier célula mesenquimal en el periendothelio microvascular. Debido a lo anterior, su función fisiológica se limitó por mucho tiempo sólo al soporte y estabilidad de los microvasos y a la regulación del flujo sanguíneo en éstos (Armulik, 2011; Birbrair, 2015).

La expresión de marcadores de pericitos, junto con la identificación de su localización y morfología permite la distinción de los pericitos de los fibroblastos vasculares y de las VSMCs (Schimpf, 2011). Por lo que la estrategia más precisa para identificar a los pericitos combina su localización anatómica (teniendo una estrecha relación abluminal con los vasos sanguíneos) y el marcaje de algunas moléculas distintivas como lo son el α -SMA, PDGFR- β , aminopeptidasa N (CD13), proteoglicano neuro/glial 2 (NG2), entre otras (Birbrair, 2015).

El principal problema en la distinción de los pericitos consiste en que no todos expresan todos los marcadores, ni todos los marcadores son exclusivos de los pericitos. Además, las moléculas empleadas como marcadores son dinámicas y su expresión puede ser sobrerregulada o desregulada en conjunto con el estado de desarrollo, reacciones patológicas, condiciones de cultivo *in vitro*, etc.

ACTINA DE MÚSCULO LISO

Las actinas son proteínas altamente conservadas y expresadas en todas las células eucariontes. Estas proteínas forman parte del citoesqueleto y juegan un papel esencial regulando la forma y movimiento de las células. Se han identificado 6 distintas isoformas en las células de mamíferos, cada una codificada por un gen individual y su expresión es tejido-específica.

La α -SMA es una de las moléculas cuya expresión es relativamente restringida a las células de músculo liso vasculares o células murales, entre ellas, los pericitos. La expresión de esta molécula en pericitos quiescentes es baja, encontrándose

principalmente en los localizados en vénulas. No obstante, se ha encontrado que esta molécula es sobreexpresada por pericitos localizados en vasos sanguíneos del tumor y en tejidos en condiciones inflamatorias (Armulik, 2011; Birbriair, 2015).

Aunque los pericitos y VSMC poseen fibras de estrés enriquecidas por actina muscular, el marcaje con anticuerpos anti-actina- α de músculo liso ha identificado diferencias cualitativas entre los citoesqueletos del pericito y de las VSMC, ya que sólo los pericitos exhiben una malla granular de actina muscular en segmentos motiles citoplasmáticos (Dulmovits, 2012).

La expresión de actina- α sirve además como un marcador de funcionalidad, ya que de esta molécula depende la característica de contractilidad. La contractibilidad de los pericitos por su parte ha mostrado regular la proliferación endotelial (Dulmovits, 2012).

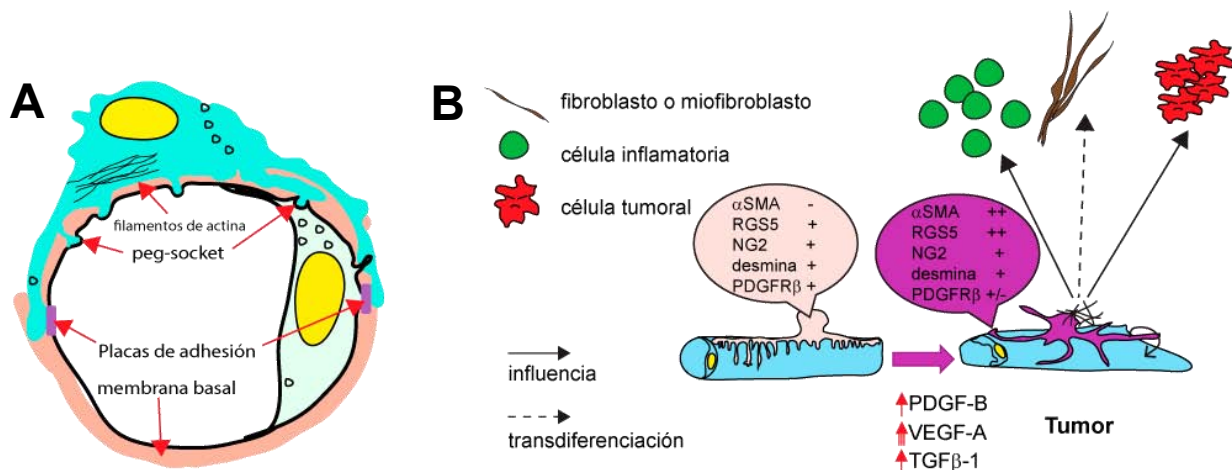


Figura 4. Pericitos. A. Los pericitos son células que embebidas en la membrana basal, recubren la parte abluminal de los vasos sanguíneos pequeños (capilares). Estas regulan la estabilidad de los vasos y su flujo sanguíneo a través de diferentes tipos comunicación que han sido descritos. Uno de estos es mediante la contractibilidad que, además de cuidar la estructura de los vasos, también mantiene en quiescencia a las células endoteliales. Además, en puntos de contactos discretos entre las células (como los de tipo clavija/enchufe y placas de adhesión) existe comunicación mediante la secreción de moléculas. B. En el tumor los pericitos tienen una asociación laxa a los vasos, debido a la persistente expresión de moléculas angiogénicas. Los pericitos además, contribuyen al crecimiento tumoral al transdiferenciarse en miofibroblasto y producir factores de crecimiento. En tumores, los pericitos pueden identificarse debido a que sobreexpresan actina- α de músculo liso.

LECHO VASCULAR TUMORAL

En cáncer, la angiogénesis es dirigida por los mismos procesos que la angiogénesis fisiológica que originan los vasos sanguíneos formados durante la embriogénesis y la cicatrización de heridas, como son condiciones isquémicas y de hipoxia. Sin embargo, los vasos sanguíneos tumorales son heterogéneos respecto a su organización, función y estructura, además están distribuidos desigualmente. Esto se puede explicar, por la presencia de una cascada angiogénica persistente e irresoluble, alimentada por los factores de crecimiento producidos por el tumor en un ambiente hipóxico.

En el lecho vascular tumoral se pueden encontrar regiones de alta densidad vascular vecindadas con regiones de poca vascularización. En el tumor, la densidad vascular es más abundante en la periferia que en la parte central y tiende a disminuir conforme el tumor crece. Esto lleva a la formación de zonas isquémicas -posteriormente necróticas- cuando el crecimiento tumoral supera su abastecimiento sanguíneo (Nagy, 2009; Potente, 2011).

Los vasos muestran lúmenes de distintos diámetros, desde grandes hasta pequeños, incluso comprimidos. Los vasos que se encuentran abiertos, no están perfundidos continuamente, su flujo se haya comprometido por derivación sanguínea pudiendo en algunos minutos cambiar de dirección. Estos vasos tienen un curso irregular y tortuoso, su ramaje es irregular y forman derivaciones arterio-venosas (Nagy, 2009; Potente, 2011).

La membrana basal de estos vasos es irregular en grosor y composición y se encuentran embebidas una menor cantidad de células murales hipocontráctiles que están ligeramente unidas. En la parte luminal de los vasos, las células endoteliales del vaso carecen de la forma peculiar de mosaico, están pobremente interconectadas y ocasionalmente forman múltiples capas (Nagy, 2009; Potente, 2011).

Al interior de la masa tumoral se pueden distinguir varios tipos de vasos:

- **Los vasos madre.** Son grandes vasos que provienen de una vénula o capilar preexistente. El vaso preexistente al recibir un estímulo pro-angiogénico (VEGF) degrada su membrana basal y se desliga de su recubrimiento pericítico, embebido

en esta, ocasionando su extenso alargamiento. La permanencia de estos vasos depende del estímulo angiogénico, propiamente del VEGF. Sus delgadas paredes, carentes de pericitos y de membrana basal, hacen a esta estructura susceptible de trombosis y colapso, por lo que son estructuras efímeras. Estos vasos evolucionan en cualquiera de las formas de vasos hijos descritas a continuación (Nagy, 2009).

- **Capilares.** La transformación de los vasos madre a capilares requiere de un proceso llamado puenteo intraluminal, que consiste en el alargamiento del citoplasma de las células endoteliales dentro y a través del lumen de los vasos madre, formando puentes transluminales que dividen el flujo sanguíneo en múltiples pequeños canales. Son normales en estructura e hiperpermeables (Nagy, 2009).
- **Proliferaciones microvasculares de tipo glomeruloide (GMPs).** Estas se desarrollan de células endoteliales CD31/VEGFR2 positivas que comienzan a proliferar y dividen el lumen del vaso madre en pequeños canales, los que adquieren pericitos y muchas capas de una membrana basal anormal. Las GMPs requieren del VEGF exógeno para su formación y permanencia (Nagy, 2009).
- **Malformaciones vasculares.** Son los vasos madre que adquieren un recubrimiento de células musculares, reteniendo su tamaño. Las malformaciones vasculares son impermeables a las proteínas plasmáticas y son dependientes del VEGF exógeno (Nagy, 2009).

Además, en el estroma de la masa tumoral podemos encontrar especies celulares como fibroblastos activados a su fenotipo de miofibroblastos, monocitos que expresan Tie-2 y macrófagos polarizados al fenotipo M2 o macrófagos asociados a tumor (TAMs), células cebadas y células mieloides CD14+Gr+, como neutrófilos en su fenotipo protumoral N2, que mantienen las señales pro-angiogénicas en el tumor (Chung, 2010).

El incremento de neutrófilos en tumores (resultado de su reclutamiento de sangre periférica) es de gran importancia en la angiogénesis tumoral, ya que éstos son capaces de liberar factores pro-angiogénicos como VEGF, IL-8, Bv8 y la proteasa MMP-9 (Botta, 2013).

Los monocitos atraídos por moléculas quimiotácticas como quimiocina ligando (CCL)-2 y CCL-5 producidas por las células tumorales, una vez que llegan al tumor se diferencian rápidamente en macrófagos asociados a tumor (TAMs). Estos al polarizarse al fenotipo M2 promovido por el tumor expresan la molécula pro-angiogénica Tie-2 y secretan factores pro-angiogénicos tales como VEGF, IL-8, FGF y MMP-9 (Botta, 2013).

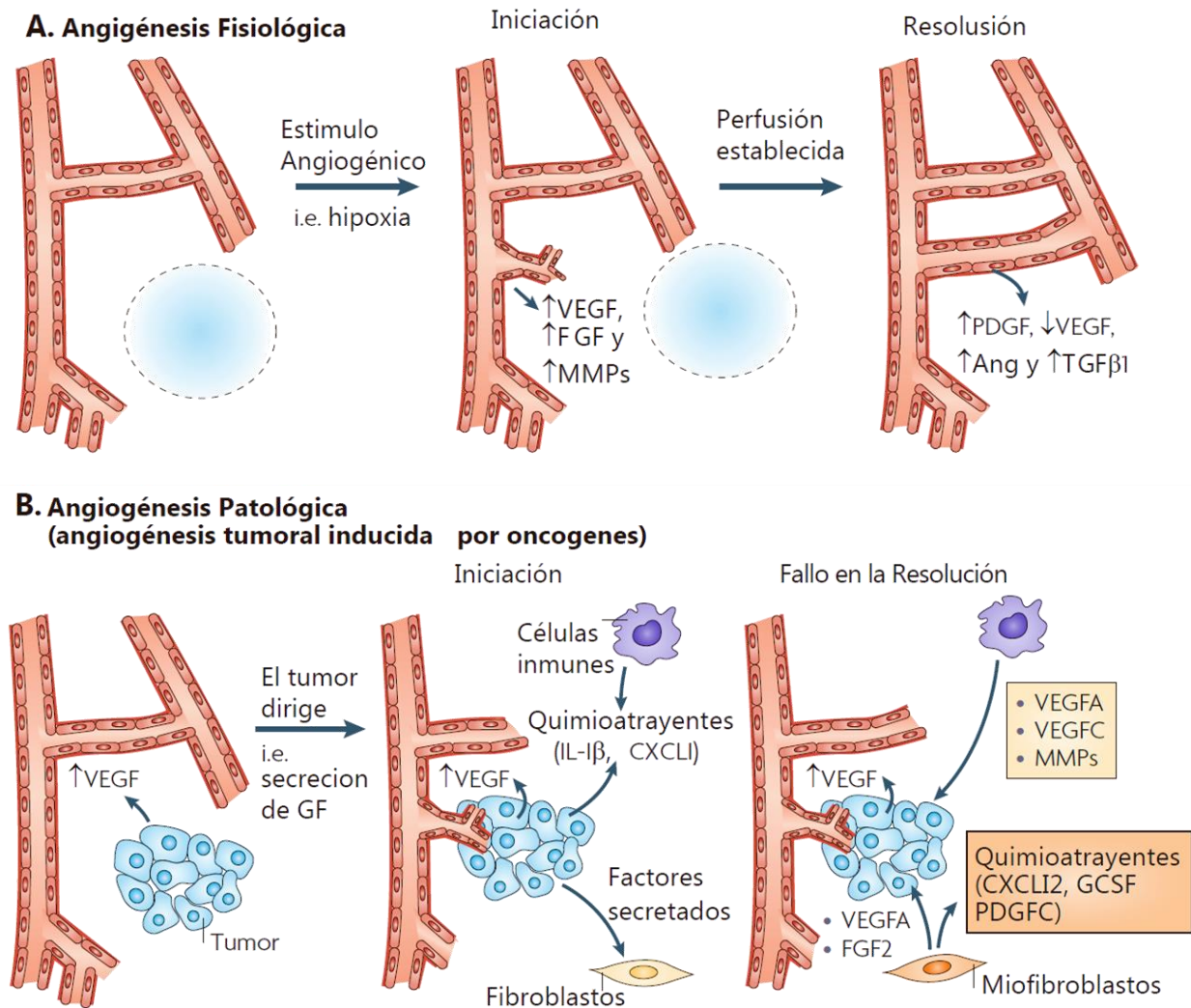


Figura 5. Angiogenesis fisiológica y tumoral. A. En el lecho vascular la generación de nuevos vasos se da por medio del proceso de angiogenesis fisiológica. Los vasos brotan siguiendo el gradiente de moléculas proangiogénicas dadas en respuesta a un estímulo de isquemia o hipoxia. Cuando el abastecimiento sanguíneo alcanza la zona isquémica o hipóxica, la condición de quiescencia es restablecida en los vasos. B. El tumor dirige el proceso de angiogenesis secretando moléculas proangiogénicas. A pesar de que se establecen vasos en el interior del tumor, el proceso se ve irresoluto debido a la constante secreción de estas moléculas por las células tumorales y por las del estroma (células inflamatorias y miofibroblastos).

EVALUACIÓN DEL LECHO VASCULAR

Debido a que la angiogénesis es un proceso dinámico, su evaluación es complicada. Por esta razón muchos estudios se centran en el producto de la angiogénesis para evaluarla, es decir, los vasos formados y propiamente la densidad microvascular (Hasan, 2002).

La densidad microvascular (MVD) es el estándar de oro para evaluar la microvasculatura de los diferentes tumores. Este parámetro se define como el número de microvasos por unidad de área. Un gran número de trabajos han empleado esta medida como indicador pronóstico de los pacientes con cáncer, bajo la premisa de que a mayor densidad microvascular el pronóstico de los pacientes es peor (Li, 2003). Sin embargo, en la práctica, muchos autores han encontrado variaciones debidas principalmente a la porción de la molécula contra la que va dirigida y la clona de los anticuerpos empleados en el marcaje vascular; los diversos métodos empleados en el conteo de los vasos, y a los distintos procedimientos de inmunotinción, en particular asociados al método de recuperación de antígeno (Li, 2003, Baeten 2002).

MOLÉCULAS UTILIZADAS COMO MARCADORES DE VASOS SANGUÍNEOS

Para identificar los vasos pueden emplearse diferentes moléculas pan-endoteliales en la técnica de inmunohistoquímica. Entre ellas se encuentran las moléculas: CD31, CD34 y el factor von Willebrand (vWF). Los anticuerpos más frecuentemente usados son: anti-CD31 (clona JC70), anti-CD34 (clona QBEND/10) y anti-FVIIIIRAg (distintos anticuerpos policlonales).

El factor de von Willebrand es una glicoproteína multimérica de gran peso molecular (~20,000 kDa) encontrada en el plasma sanguíneo, en los gránulos- α de las plaquetas y en el tejido conectivo subendotelial. Es secretado principalmente por las células endoteliales y por los megacariocitos. Aunque las células endoteliales lo secretan en cerca del 95%, una parte se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade, que son pequeños orgánulos en forma de barra de 0.1 a 0.2 μm de ancho por 4 μm de largo. Este factor tiene un papel importante en la adhesión y agregación de plaquetas en sitios de daño vascular, esta función es regulada por mecanismos alostéricos y por cambios en las fuerzas hidrodinámicas del flujo sanguíneo (Sadler, 1998).

La molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial 1 (PECAM-1) o CD31 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas: contiene 6 dominios tipo inmunoglobulina; además, presenta motivos inhibitorios de inmunoreceptores basados en tirosina (ITIMs), por lo que es subclasificada en la superfamilia de Ig-ITIM. Se ha asociado con una gran cantidad de procesos biológicos como lo son modulación de la adhesión celular mediada por integrinas, migración transendotelial, angiogénesis, apoptosis, migración celular, regulación negativa de la señalización de las células del sistema inmune, autoinmunidad y fagocitosis por macrófagos (Jackson, 2003; Martin, 1997, Meert, 2002).

La molécula CD34 es una glicoproteína que consiste de un dominio extracelular tipo mucina amino terminal, seguido por un dominio globular, un tallo con una región transmembranal de pase simple y una cola citoplásmica. En vertebrados es expresada en todo el endotelio vascular durante la etapa adulta, mientras que en el desarrollo embrionario se expresa en vasos pequeños y en los *filopodia* de los brotes angiogénicos. La molécula CD34 ha sido también usada para identificar células progenitoras hematopoyéticas y mesenquimales. Se ha encontrado que la molécula funciona como un factor de adhesión célula-célula, célula madre-medula ósea o células estromales (Furnees, 2006). En modelos tumorales de ratón, la expresión de CD34 en células endoteliales está relacionada con la integridad y organización de los vasos, ya que ratones CD34 knock out presentan mayor permeabilidad vascular que los wild type (Maltby, 2011). Aunque el anticuerpo anti-CD34 marca células del endotelio linfático, este marcaje es poco frecuente debido a su baja expresión en el endotelio linfático. Por otra parte, se ha encontrado que marca el lecho vascular de un mayor porcentaje de casos de angiosarcoma (92.6%) con respecto a los otros marcadores (CD31-77.8% y vWF-66.7%) (Miettinen, 1994).

Diversos autores consideran que el uso de estos marcadores es insuficiente para evaluar angiogénesis, debido a que marcan todos los vasos sin distinción de los activos, que se encuentran en proceso angiogénico (Eberhard, 2000). Por esta razón se ha propuesto como marcador de vasos en angiogénesis a la molécula CD105 (endogлина), receptor accesorio del TGF- β , que se expresa en células endoteliales en proliferación. Se ha encontrado que esta molécula permite distinguir entre los vasos que fueron atrapados en

la masa tumoral, de los que están formándose y están asociados al tumor. Este marcador permite evaluar de una manera más efectiva la angiogénesis de la red vascular del tumor (Li, 2003; Nassiri, 2011).

MÉTODO DE CONTAJE

El método usado para contar los vasos ha variado considerablemente. Los métodos primeramente buscan secciones histológicas relevantes a una baja magnificación (X4 y X10), para ubicar áreas de alta densidad microvascular, llamadas “hot spots”. Posteriormente, en estas zonas se cuentan los microvasos individualmente delineados por la célula endotelial en alta magnificación (X20 o X40) (Martin, 1997). El hot spot representa hipotéticamente el resultado de la mayor actividad angiogénica en un área, donde cada vaso presente representa una oportunidad para las células tumorales de entrar al torrente sanguíneo y diseminarse, por lo que ha sido establecido como un indicador de metástasis. La identificación del hot spot, sin embargo, es una fuente de variabilidad inter- e intra-observador, lo que ha complicado el uso de este método que requiere un amplio entrenamiento previo (Schor, 1998).

Además, la determinación de la MVD depende, en gran medida, de la selección del bloque de tejido tumoral, solíéndose elegir la zona correspondiente a la periferia del tumor.

OTRAS EVALUACIONES

Algunos autores, atendiendo al problema de los marcadores antes descritos, han propuesto el análisis funcional del lecho vascular del tumor para lograr una correcta evaluación de la angiogénesis. Esto implica el uso de marcadores de proliferación y de reclutamiento de pericitos, con lo que se logra cuantificar la angiogénesis y el estado de madurez del lecho microvascular del tumor, respectivamente (Eberhard, 2000).

Dentro de estos estudios, el anticuerpo contra la proteína Ki-67 es ampliamente usado, ya que la expresión nuclear de esta proteína durante la interfase del ciclo celular se ha asociado estrechamente con la proliferación celular. En este tipo de estudio se evalúa la proliferación tanto de las células endoteliales como de las tumorales. Aunque la función de Ki-67 no se ha esclarecido del todo, se ha observado que tiene relación con la

transcripción del RNA ribosomal. Con la técnica inmunohistoquímica, este antígeno se puede encontrar en todas las fases del ciclo celular a excepción de G₀, donde se piensa que los epítopes de Ki-67 se encuentran enmascarados dentro de complejos formados con otras macromoléculas (Bullwinkel, 2006).

Se ha estudiado la correlación entre las células tumorales en proliferación y la distribución de los microvasos, encontrándose una relación positiva entre el número de microvasos sanguíneos con la proliferación de las células tumorales (Weidner, 2008).

Algunas técnicas de apoyo clínico pueden proveer información serial del estado angiogénico como: imágenes de resonancia magnética (MRI) con contraste aumentado y la tomografía de emisión de positrones. Sin embargo, estas técnicas no proveen información de los vasos más pequeños, encontrados a nivel microscópico que son necesarios para la correcta evaluación angiogénica (Hasan, 2002).

TERAPIAS ANTI-ANGIOGÉNICAS

El desarrollo de terapias anti-angiogénicas está fundamentado en que el crecimiento tumoral es dependiente de la actividad angiogénica. Además, esta terapia es teóricamente aplicable por las razones siguientes:

- **Es un mecanismo oncofetal:** es poco expresado en el adulto sano, por lo que flanquearlo tendría un mínimo de efectos secundarios, incluso a largo plazo.
- **Es un mecanismo fisiológico del hospedero:** su inhibición farmacológica, por lo tanto, no debería de desarrollar resistencia.
- **Se limita el potencial de abastecimiento:** cada capilar del tumor abastece a cientos de células tumorales. El efecto al destruir la red capilar puede inhibir el crecimiento tumoral y causar regresión a un tejido sano, por la muerte del excedente de células tumorales.

En la actualidad se han aprobado pocos fármacos que inhiban la angiogénesis perpetua del tumor, destacándose el bevacizumab (aprobado por la FDA en el 2003) que es un anticuerpo humanizado anti-VEGF. Otros fármacos previamente aceptados por su actividad antitumoral se les ha identificado una actividad anti-angiogénica adicional; tal es caso de bortezomib, erlotinib, cetuximab y vandetanib (Folkman, 2007).

Bevacizumab es usado en el tratamiento del cáncer colorrectal y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas no epidermoide, particularmente adenocarcinoma. El tratamiento con este anticuerpo monoclonal se acompaña siempre de la quimioterapia convencional a base de cisplatino. Esta terapia ha incrementado de manera modesta la sobrevida libre de progresión de los pacientes (Folkman, 2007).

Se ha observado que los agentes anti-angiogénicos no solo inhiben la proliferación de las células endoteliales y previenen su crecimiento, sino que también inducen regresión de los vasos existentes al incrementar la muerte de las células endoteliales. Además, el tratamiento anti-VEGF al normalizar el patrón caótico y la arquitectura anormal de los vasos tumorales y al reducir la permeabilidad vascular y la presión del fluido intersticial, mejora la entrega de los fármacos citotóxicos al torrente sanguíneo (Folkman, 2007).

Sin embargo, la monoterapia con este tipo de agentes no ha mostrados los resultados esperados en humanos, mientras que los pacientes que reciben la combinación con quimioterapia convencional sólo tienen beneficios modestos en su supervivencia, su tratamiento resulta costoso y con efectos secundarios tóxicos (Kerbel, 2008).

EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER PULMONAR

En todo el mundo incluyendo México, el carcinoma pulmonar es la principal causa de muerte relacionada con cáncer. Esto se debe a que es diagnosticado en estadios tardíos lo que enfatiza a esta patología como letal y con una pobre sobrevida general. Los datos estadísticos de esta enfermedad indican que solo el 15% de los pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar tienen una esperanza de vida de 5 años después de ser diagnosticado. Además, el 70% de los pacientes diagnosticado en estadios avanzados no son candidatos a una terapia curativa, y los pacientes diagnosticados en etapas tempranas presentan un alto índice de recurrencia tumoral (Gibbons, 2011).

A mediados del siglo pasado se estableció el hecho de que el tabaquismo es una de las causas principales del cáncer pulmonar. Actualmente, el consumo de tabaco declinó considerablemente en países desarrollados de América y Europa; sin embargo, en países en vías de desarrollo el consumo de tabaco aumentó, al igual que la incidencia de cáncer

pulmonar. Cabe mencionar que más del 25% de los casos de cáncer pulmonar ocurre en no fumadores o exfumadores (Horn, 2012; Nason, 2014).

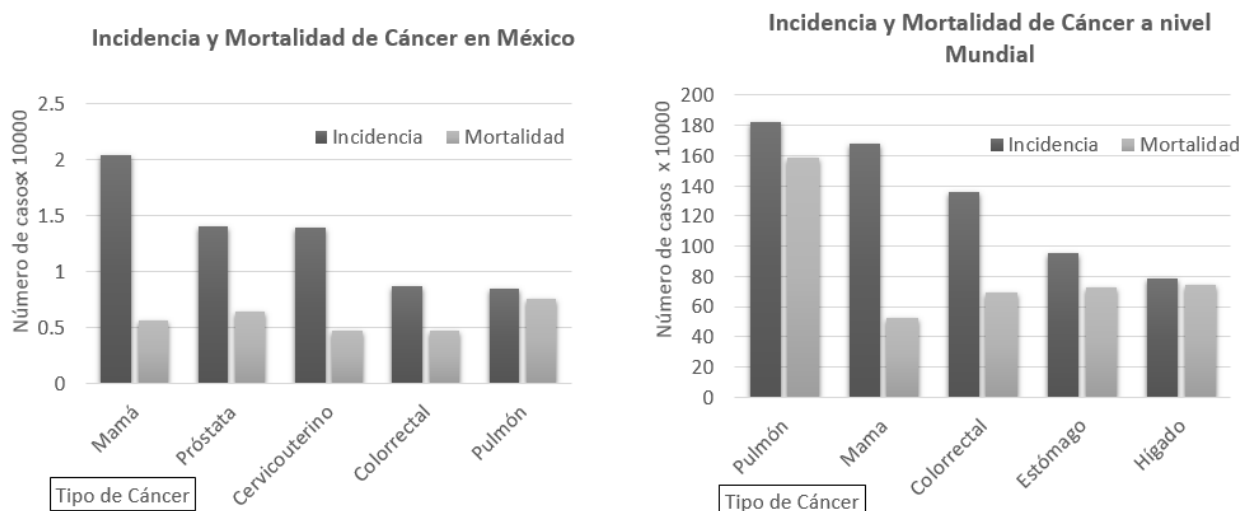


Figura 6. Estadísticas del cáncer. El cáncer pulmonar en el mundo y también en México es un problema de salud pública, ya que presenta los índices más altos en mortalidad e incidencia dentro de esta patología. Su alta mortalidad se haya íntimamente asociada a su diagnóstico tardío que hace más difícil su tratamiento.

CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER PULMONAR

El término cáncer pulmonar es usado para los tumores formados en las vías bajas del sistema respiratorio incluyendo mesoteliomas, linfomas, sarcomas y carcinomas. El cáncer pulmonar epitelial o carcinoma pulmonar se forma por las células malignas provenientes del epitelio respiratorio (bronquio, bronquiolo y alvéolo) (Horn, 2012). De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud se reconocen dos grupos principales de cáncer pulmonar epitelial: el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) (Travis, 2004). En el grupo de NSCLC se reconocen tres tipos histológicos que son: carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma (Hollguins, 2001).

GARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES

Este tipo histológico se caracteriza por la presencia de células tumorales poco diferenciadas con diámetro de 30 a 50µm, siendo localizado en la parte central o en la periferia del pulmón. Es el subtipo menos común de NSCLC, representando el 8% de todos los casos de NSCLC (Nason, 2014; Horn, 2012).

CARCINOMA EPIDERMOIDE

El carcinoma epidermoide se presenta en el 34% de casos de NSCLC siendo el segundo tipo histológico más frecuente y el más frecuente en varones. Las células desarrollan un patrón de racimos celulares con conexiones intracelulares y perlas de queratina. Debido a que su localización suele ser central, las células que tienden a exfoliar son halladas frecuentemente en la examinación citológica de esputo (Horn, 2012).

ADENOCARCINOMA

Debido a la disminución en el consumo de tabaco, en las últimas décadas el adenocarcinoma pulmonar ha desplazado en incidencia al carcinoma epidermoide (el cual está altamente asociado al hábito tabáquico), llegando a ser el tipo histológico de carcinoma pulmonar más común. Este tipo se presenta en el 30% de los casos en hombres fumadores y en el 40% de las mujeres fumadoras, mientras que en los no fumadores se presenta en el 80% y 60% para hombres y mujeres, respectivamente. Este tipo histológico se suele desarrollar en la zona periférica del pulmón y es frecuentemente descubierto incidentalmente en radiografías del tórax (Nason, 2014; Horn, 2012).

En la clasificación antes citada, los adenocarcinomas se subdividían por sus características morfológicas y patológicas en: adenocarcinoma mezclado (mixed subtype), adenocarcinoma acinar, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma bronquioloalveolar (BAC) (en el que se encontraban las variedades: mucinoso, no mucinosos y mezclado) y adenocarcinoma sólido (en el que se agrupaban las variedades: coloidal, fetal, adenoide quístico, carcinomas con células en anillo de sello y carcinomas de células claras).

Sin embargo, en el año 2011 la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer Pulmonar, la Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Respiratoria Europea (IASLC/ATS/ERS) consideraron que esta clasificación hecha por patólogos y para patólogos, no tomaba en cuenta otros aspectos biológicos relacionados al desarrollo tumoral, por lo que propusieron modificaciones que dieron origen al sistema de clasificación actual que se encuentra basado en criterios moleculares, clínicos, radiológicos, quirúrgicos e histopatológicos (Travis, 2011). Los cambios principales consisten en lo siguiente: Discontinuación del término BAC; discontinuación del subtipo

mezclado; subtipificación de los tumores en incrementos de 5% y clasificación de acuerdo al subtipo predominante (clasificando como focal, menor que 5%; moderado del 5 al 30% o extensivo mayor del 30%); la introducción del término adenocarcinoma *in situ* (AIS) y adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) como nuevas entidades; introducción de los subtipos micropapilar y lepidico predominante como nuevas terminologías; exclusión de los adenocarcinomas de células claras y en anillo de sello.

Como puede observarse, la clasificación de las asociaciones IASLC/ATS/ERS delimita la progresión del desarrollo tumoral de manera escalonada, desde la lesión pre-invasiva hasta el adenocarcinoma invasivo. Dentro de las lesiones se encuentran las lesiones pre-invasivas; adenocarcinomas mínimamente invasivos (MIA); variantes de adenocarcinomas invasivo y adenocarcinomas invasivos. Cada uno de estos tipos se describe a continuación.

LESIONES PREINVASIVAS

Hiperplasia adenomatosa atípica (AAH): proliferación localizada y pequeña (<0.5cm) de neumocitos tipo II o células de clara moderadamente atípicas que crece espaciadamente a lo largo de la pared alveolar y algunas veces del bronquiolo respiratorio (Travis, 2011).

Adenocarcinoma *in situ* (AIS): tumor pequeño (<3cm) tipo adenocarcinoma con crecimiento únicamente a lo largo de los vasos alveolares preexistentes (crecimiento lepidico), sin crecimiento intra-alveolar y sin invasión vascular, del estroma o la pleura (Travis, 2011).

Distinciones celulares y atípicas entre estos tipos de lesiones resultan imposibles histológica y citológicamente (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMA MÍNIMAMENTE INVASIVO (MIA)

Los pacientes que presentan este tipo de adenocarcinoma tienen un 100% de supervivencia total. Este tumor se presenta con un tamaño menor de 3cm con crecimiento lepidico predominante (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMAS INVASIVOS

Los adenocarcinomas invasivos representan del 70% al 90% de los tumores extirpados quirúrgicamente del tipo histológico adenocarcinoma, son una mezcla compleja de subtipos histológicos, por lo que se clasifican de acuerdo a su patrón de crecimiento predominante (Travis, 2011). Los patrones se indican a continuación:

ADENOCARCINOMA LEPÍDICO PREDOMINANTE

El adenocarcinoma lepidico predominante consiste de células tipo neumocito creciendo a lo largo de la superficie de las paredes alveolares. Muchos estudios han demostrado que este patrón de crecimiento predominante está asociado con una mayor supervivencia del paciente (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMA ACINAR PREDOMINANTE

El subtipo histológico acinar muestra una estructura tipo glandular, generalmente de forma ovalada y con un espacio luminal central que puede contener o no mucina. Este tipo también puede consistir de agregados circulares de células tumorales con una polarización nuclear periférica con citoplasma central y sin un lumen claro (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMA PAPILAR PREDOMINANTE

El subtipo histológico papilar se caracteriza por el crecimiento de células glandulares a lo largo de ejes centrales fibrovasculares. Son tumores con crecimiento lepidico cuyos espacios alveolares están llenos de estructuras papilares, el tumor debe ser clasificado como adenocarcinoma papilar (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMA MICROPAPILAR PREDOMINANTE

El crecimiento micropapilar se asocia con la formación de pequeños cúmulos de células papilares que carecen de ejes fibrovasculares y que pueden estar o no asociadas a las paredes alveolares. Las células tumorales son pequeñas con poca atipia nuclear (Travis, 2011).

ADENOCARCINOMA SÓLIDO PREDOMINANTE

Este patrón de crecimiento presenta células poligonales que forman capas, carece de los patrones de crecimiento reconocibles anteriormente mencionados. Junto con el

Adenocarcinoma Micropapilar predominante, estos tipos histológicos son los que tienen el pronóstico más pobre (Travis, 2011).

Cabe mencionar que en este trabajo, la muestra estudiada está integrada por los cinco subtipos de adenocarcinomas invasivos.

A N T E C E D E N T E S

ESTUDIOS DEL LECHO VASCULAR EN CÁNCER

Una de las características propias de la célula tumoral, indispensable para la invasión y metástasis, es la angiogénesis sostenida (Hanahan, 2000). Históricamente, en la práctica clínica, la respuesta a las terapias antiangiogénicas ha sido evaluada midiendo los incrementos o decrementos en el tamaño del tumor. Sin embargo, la necesidad de obtener información más precisa sobre la evolución del tumor ha llevado al desarrollo de otras técnicas tales como: tomografía de emisión por positrón (PET), imagen por resonancia magnética (MRI) y la tomografía computarizada (CT). Su aplicación clínica está limitada, entre otras cosas, debido al largo tiempo de escaneo y a la necesidad de medios de contraste; por lo tanto, la biopsia y su evaluación histopatológica son aceptadas como el estándar de oro para evaluar los cambios en la vasculatura tumoral (Fakhrejahani, 2012).

La tinción inmunohistoquímica es una herramienta fundamental para el estudio histopatológico de la vasculatura tumoral. Para este efecto, en NSCLC se han empleado anticuerpos dirigidos a las moléculas CD34 (Yano, 2000) y CD31 (Han, 2001) presentes en las células endoteliales. Así como anticuerpos anti-CD105 para marcar células endoteliales activas (Medetoglu, 2010). Estos trabajos han sido dirigidos a establecer la relación entre la MVD con el pronóstico del paciente. En este aspecto, se han reportado la existencia de una relación inversa, es decir, a mayor densidad microvascular menor esperanza de vida (Yano, 2000, Han, 2001, Medetoglu, 2010). Con base en 23 trabajos reportados, Meert y cols. realizaron un meta-análisis confirmando la relación inversa entre la MVD y el pronóstico de los pacientes (Meert, 2002).

La MVD, en NSCLC y otros tumores, ha sido correlacionada positivamente con el factor proangiogénico VEGF-A evaluado empleando inmunohistoquímica en biopsias tumorales (Han, 2001; Inoshima, 2002; Stefanou, 2004; Masuya 2008) o por ELISA en plasmas (Tamura, 2001) o sueros de pacientes (Shimanuki, 2005). Otros factores proangiogénicos como el PLGF (Zhang, 2005), la Angiopoyetina-2 (Takanami, 2004) y la Interleucina-8 (Masuya, 2008), así como la presencia en el estroma tumoral de células cebadas (Carlini,

2010) y macrófagos infiltrantes de tumor (TIM) (Jeremy, 2005), cuantificados por inmunohistoquímica, también se han asociado con el proceso de neovascularización. Adicionalmente, la MVD se ha relacionado positivamente con la cantidad de EPC's circulantes cuantificadas por citometría de flujo.

PATRONES DE VASCULARIZACIÓN DE LOS NSCLC

En 1997 Pezzella y su grupo de investigadores estudiaron en una serie de 500 casos de NSCLC en estadio I, empleando inmunohistoquímica, reportando cuatro patrones distintos de vascularización que se indican a continuación:

Patrón Basal. Este patron reproduce la estructura de una mucosa en el que las células tumorales forman nidos epiteliales rodeados por tejido conectivo. La mayoría de los vasos se encuentran en el tejido conectivo por debajo del epitelio neoplásico.

Patrón Papilar: En este patrón, los vasos forman parte de un tallo fibro-vascular en el cual se encuentran adosadas células neoplásicas monoestratificadas. En algunos casos es posible reconocer el patrón alveolar normal, pero invariablemente acontece la remodelación de las estructuras alveolares, la destrucción de la estructura normal del pulmón y el crecimiento papilar.

Patrón Difuso: En este patrón, la arquitectura normal del pulmón se encuentra difusamente reemplazada. Los vasos recién formados y el estroma se producen íntimamente ligados con las células neoplásicas, lo que no permite reconocer la arquitectura tisular.

Patrón Alveolar: En este último patrón, observado en el 16% de los casos, los vasos presentes corresponden a los vasos del septo alveolar, por lo que el autor deduce que, si ya existe un lecho vascular apropiado y disponible, el tumor puede explotarlo y crecer sin necesidad de inducir el proceso angiogénico.

Ya que los tres primeros patrones vasculares antes descritos tienen en común la presencia de vasos recién formados, Pezzella agrupó a estos tumores bajo el nombre de "Tumores Angiogénicos". En contraste, los tumores que presentaron el patrón alveolar los consideró como no angiogénicos y consecuencia de un proceso de coopción vascular (Pezzella, 1997).

Otros autores han estudiado los tumores pulmonares no angiogénicos y han encontrado que el fenotipo de los vasos es LH39+ (molécula presente en la membrana basal madura) (Passalidou, 2002, Sardari Nia 2004). El estudio realizado por Sardari Nia, *et al.* (2008) evaluó la interfase o frente de crecimiento del tumor, reportando una reducción de la fracción de células endoteliales en proliferación (9.5%), mientras que la proliferación de las células tumorales fue alta (45%) al igual que la densidad microvascular debido a que se conserva la alta vascularización propia del pulmón. En tumores que muestran este mismo patrón de crecimiento no angiogénico se ha identificado una baja expresión de VEGF, lo que se ha asociado directamente con la reducida actividad angiogénica (Offersen, 2001). El pronóstico asociado a los tumores que muestran el patrón no angiogénico es controversial, ya que mientras algunos estudios lo relacionan con un pronóstico pobre (Sardari Nia, 2004; Sardari Nia, 2010), otros lo asocian con un pronóstico favorable (Offersen, 2001). Estas discrepancias pueden deberse a la zona tumoral seleccionada y observada, así como a los criterios empleados para la evaluación del patrón vascular.

ESTUDIOS DEL LECHO VASCULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR

Eberhard (2008) analizó, en glioblastomas, carcinomas de células renales, de colon, mamarios, de próstata y pulmonares, la angiogénesis y el estado funcional de la vasculatura tumoral. Cuantificó la proliferación de las células endoteliales, el reclutamiento de pericitos y el índice de recubrimiento pericítico de los microvasos, denominado también índice de madurez microvascular (VMI), reportando en estos tumores un índice de madurez microvascular de $40.84 \pm 14.5\%$.

El estudio de Offersen (2001) estimó la angiogénesis tumoral y la concentración del VEGF concluyendo que, debido a que las neoplasias con patrón alveolar explotan por coopción el lecho vascular preexistente, estos tumores pueden progresar sin la inducción de angiogénesis, por lo que la evaluación de este parámetro en este tipo de tumores no tiene valor pronóstico.

Passalidou, por su parte, ha caracterizado el fenotipo de los vasos presentes en los tumores angiogénico y en los no angiogénicos. Los vasos fueron identificados por la expresión de CD31; de ellos los vasos maduros expresaron el epítipo LH39, mientras

que vasos recién formados expresaron la integrina $\alpha V\beta 3$. En nueve de los tumores no angiogénicos, los vasos fueron LH39 positivos y $\alpha V\beta 3$ variable o negativo, mismo fenotipo que expresaron los vasos alveolares normales. En cambio, en los tumores angiogénicos el 13.1% de los vasos expresaron LH39 mientras que $\alpha V\beta 3$ se expresó en el 55.5%. El autor concluye que con base en estos marcadores es posible identificar tumores no angiogénicos (Passalidou, 2002).

Otro autor que ha estudiado NSCLC angiogénicos y no angiogénicos ha sido Jubb. Determinó la expresión de VEGF, hipoxia, proliferación y fenotipo vascular en una serie de tumores pareando metástasis a cerebro con el tumor pulmonar primario. Concluyendo que la proporción de vasos maduros en las metástasis cerebrales es significativamente mayor que en los tumores primario, sugiriendo que dichas metástasis pueden ser refractarios a la terapia anti-VEGF (Jubb, 2011).

Los tres estudios antes citados agrupan a los tipos histológicos adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma de células grandes en el rubro “tumores angiogénicos”, así como a estos mismos tipos histológicos como “tumores no angiogénicos”.

Inoshima en el año 2002 y Ushijima en el 2001 realizaron estudios relacionados con la densidad microvascular en tumores tipo adenocarcinoma y no adenocarcinoma. Inoshima, *et al.* (2002) analizó, mediante tinción inmunohistoquímica, la relación de la expresión de VEGF con la densidad microvascular e infiltración de célula dendríticas. Se evaluó además la influencia de estos parámetros en el pronóstico de los pacientes con carcinomas de células no pequeñas. Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas en la densidad microvascular de los tumores tipo adenocarcinomas y no adenocarcinomas

Ushijima, *et al* (2001) determinó si el grado de angiogénesis puede servir como factor pronóstico en el caso de tumores resecaados en pacientes diagnosticados con NSCLC. Estudió la densidad microvascular en el centro y la periferia del tejido tumoral, concluyendo que la densidad microvascular de la periferia del tumor es mayor y está asociada con el avance de la enfermedad.

Con relación a los estudios sobre la densidad microvascular, otros reportes sólo analizan esta variable en tumores del tipo adenocarcinoma y carcinoma epidermoide.

Schor, *et al* (1998) analizó distintas secciones del tumor para determinar si existe o no variabilidad en la densidad microvascular. Concluyendo que valores altos de la densidad microvascular detectados sólo en la periferia tumoral no necesariamente representan la existencia de un proceso angiogénico y que la probabilidad de obtener una estimación segura de la vascularidad puede ser menor al 68% al analizar la zona tumoral total presente en la muestra obtenida.

Por otro lado, Kakolyris, *et al* (1999) examinó la relación entre vasos maduros y vasos inmaduros empleando los marcadores descrito por Passalidou y correlacionó el índice de madurez microvascular (VMI) con el proceso angiogénico y otras variables. Los vasos identificados como CD31 positivos fueron considerados maduros por la expresión de la molécula LH39, mientras que los vasos inmaduros fueron definidos como LH39 negativos. El VMI fue definido como la fracción porcentual de vasos maduros con respecto al número total de vasos. El estudio concluye que existe una amplia variación en el grado de diferenciación de la vasculatura tumoral y que el VMI puede ser interpretado como el grado de la actividad remodeladora del tumor, independientemente de la cuantificación de la densidad microvascular.

Yazdani, *et al.* (2013) en 104 pacientes (50 diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar, 43 con carcinoma epidermoide y 11 de otros tipos de carcinoma pulmonar) evaluó la angiogénesis y la maduración de los vasos intratumorales empleando anticuerpos a vasohibin-1, endoglina, CD31 y nestina, demostrando que existe menor desarrollo de los vasos intratumorales en los carcinomas epidermoides en comparación con los adenocarcinomas.

Con la finalidad de estudiar el valor pronóstico de la densidad microvascular asociada con el factor de crecimiento del endotelio vascular, Yano *et al*, (2000) concluyó que los pacientes con alta expresión de este factor y alta densidad microvascular podrían ser buenos candidatos para terapias antiangiogénicas.

Maeda, *et al.* (2012) emplea la clasificación de los adenocarcinomas pulmonares del 2004 propuesta por la Organización Mundial de la Salud como: carcinoma bronco-alveolar (BAC), acinar, papilar y sólido. En este estudio se encuentra que los tumores con patrón sólido tienen una mayor MVD, una mayor cantidad de EPC circulantes (medida por citometría de flujo) y una mayor expresión de VEGF-A (medida por RT-PCR) que los tumores no sólidos. Estos hallazgos asocian a los tumores sólidos con una mayor actividad angiogénica.

Debido al nuevo sistema de clasificación propuesto por la IASLC/ATS/ERS en el 2011 para los adenocarcinomas, es necesario realizar estudios de la microvasculatura sólo en los distintos subtipos de este tipo histopatológico.

Durante la revisión bibliográfica para documentar el presente trabajo se encontró únicamente un estudio en el que la muestra es estratificada de acuerdo a la nueva clasificación propuesta por las asociaciones IASLC/ATS/ERS 2011. Mlika, *et al.* (2014) empleando 46 biopsias de tumores pulmonares tipo adenocarcinoma estratificadas como: acinares (19), papilares (7), lepidicos (1) y sólidos (19), estudia la densidad microvascular, la expresión del factor de transcripción tiroideo (TTF1) y las metaloproteinasas 2 y 9. Se empleó la técnica de inmunohistoquímica simple y los siguientes anticuerpos CD34, TTF1, MMP2, y MMP9. Reportando que los subtipos más vascularizados son el acinar y el papilar con una densidad promedio de 50 y 51.6, respectivamente; seguidos del subtipo sólido con 33.3 y el subtipo lepidico con 0 vasos por campo de X20. La autora no estudia el índice de maduración vascular, y su trabajo no incluye al subtipo micropapilar. Asimismo, no se reporta la medida de dispersión de los datos obtenidos.

En la literatura revisada para documentar este trabajo se observan algunos aspectos de carácter técnico que devienen obstáculos para que la densidad e índice de maduración vascular puedan emplearse como características diacríticas en la selección de pacientes candidatos a terapias antiangiogénicas. Una de ellas, de capital importancia, es la cantidad de material biológico estudiado, así como la gran variabilidad de tipos tumorales incorporados. Aunado a esto, algunos reportes estudian a la densidad microvascular de manera cualitativa (alta o baja) o cuantitativa. En relación a este último punto, el número

de vasos no siempre es referido a una unidad de área. En algunos casos el área de referencia es el campo del microscopio que puede variar de 10X a 20X. En relación a las medidas de resumen, la mediana es comúnmente empleada para reportar la densidad microvascular, en otros casos se reporta la media y la desviación estándar. Lo anterior dificulta la comparación de los resultados entre los estudios realizados.

Para unificar criterios es necesario ceñirse a un sistema de clasificación que defina, de la manera más precisamente posible, cada una de las neoplasias bajo estudio. En este aspecto, es necesario realizar estudios conforme la clasificación propuesta por las asociaciones IASLC/ATS/ERS 2011. Así como establecer un criterio común de medición de la densidad microvascular que evite el sesgo debido a sólo indicar el aumento en que se realizó la observación de la microvasculatura.

P L A N T E A M I E N T O D E L P R O B L E M A

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los adenocarcinomas se clasifican según los criterios establecidos por la IASLC/ATS/ERS en el 2011. Estas asociaciones reconocen cinco subtipos de adenocarcinoma, cada uno con características histológicas, moleculares, clínicas, radiológicas y quirúrgicas propias. A la fecha no se ha determinado en estos subtipos la MVD y el VMI, aun cuando ambos parámetros son de capital importancia para la selección de pacientes candidatos a terapia antiangiogénica.

Por lo anterior se justifica la realización del presente estudio concerniente a determinar la densidad microvascular de los vasos potencialmente funcionales (maduros) en adenocarcinomas pulmonares. Los resultados de este estudio pueden impactar en la práctica clínica respecto a la selección de pacientes que presenten mejor respuesta a la terapia antiangiogénica.

HIPÓTESIS

Los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar de acuerdo a su grado de invasividad presentarán una distinta densidad microvascular e índice de madurez microvascular.

OBJETIVO

Investigar si existen diferencias cuantitativas en la densidad e índice de madurez de la microvasculatura tumoral en los distintos subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar y asociarlo con su grado de invasividad.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr este objetivo:

1. Se recolectaron biopsias de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar.
2. La muestra fue categorizada como acinar, papilar, lepidico, sólido o micropapilar de acuerdo a los parámetros histológicos que rigen la actual clasificación de los adenocarcinomas,
3. Empleando la doble tinción inmunohistoquímica se identificó al endotelio vascular empleando el anticuerpo anti-CD34 y a los pericitos con el anticuerpo anti- α -SMA. Las áreas observadas fueron las zonas hipervasculares (hot spots) realizando observaciones en un aumento de 100X.
4. Se fotodocumentaron de 5 a 10 campos por muestra estudiada a un aumento de 20X.
5. El estado de madurez de los vasos sanguíneos se definió como inmaduros (CD34+) y maduros (CD34+, α -SMA+),
6. Se determinó la densidad microvascular (MVD) y de esta se determinó el índice de madurez microvascular (VMI) acorde a los microvasos inmaduros (MVDi) y microvasos maduros (MVDm).

M A T E R I A L E S Y M É T O D O S

MATERIAL BIOLÓGICO

En el estudio se incluyeron 32 muestras de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar. De ellas, fueron siete biopsias conteniendo tejido pulmonar maligno obtenidas entre los años de 2008-2009 y 27 autopsias realizadas entre los años 1988-2005. Las muestras fueron proporcionadas por el servicio de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las muestras se encontraban fijadas y embebidas en bloques de parafina. Posteriormente se hicieron cortes seriados de la muestra con un espesor de 3µm cada uno. Las muestras fueron clasificadas de acuerdo a su patrón histológico acorde a la nueva clasificación propuesta por la IASLC/ATS/ERS.

De los 32 casos estudiados, nueve casos correspondieron al subtipo histológico acinar, siete al papilar, cuatro al lepidico, diez al sólido y dos al micropapilar.

PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

DESPARAFINACIÓN, REHIDRATACIÓN Y BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA.

Los cortes fueron desparafinados utilizando tres baños en xilol. Posteriormente, el tejido se rehidrató bañándolo durante 3 min en soluciones con diferentes grados de alcohol, que en orden fueron 100%, 90%, 80%, 70%, 50% y 30%. Al terminar, los cortes se mantuvieron en agua desionizada hasta proseguir con su tratamiento. La peroxidasa endógena fue bloqueada empleando 10% de peróxido de hidrógeno en metanol durante 10 min.

RECUPERACIÓN DE ANTÍGENO Y BLOQUEO DE UNIÓN INESPECÍFICA

La reactivación de antígeno se realizó utilizando un método por inducción de calor, empleando un horno de microondas convencional (Sharp). Las laminillas inmersas en buffer de citratos (0.01M, pH = 6) se incubaron a temperatura de ebullición durante 20 min. Una vez terminada la incubación, las laminillas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se enjuagaron utilizando el mismo buffer de recuperación.

La unión inespecífica de los anticuerpos a los tejidos, así como la unión a los receptores Fc se bloqueó utilizando suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (V/V) en PBS. En esta solución se sumergieron los cortes durante 30 min a temperatura ambiente.

DOBLE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

REACCIÓN EMPLEANDO EL ANTICUERPO PRIMARIO

Los tejidos tratados se incubaron con 70µL del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 humano, clona QBEnd-10, listo para usarse obtenido de Dako Corporation (Carpintería, CA, USA). El portaobjetos se cubrió con un cubreobjetos y se incubó a 32° C durante 1.5 h y a 4° C toda la noche. Los bordes del portaobjetos se sellaron con un lápiz hidrofóbico para evitar la pérdida de líquido durante la incubación.

Posterior a la incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 2 min inmersos en una solución de PBS con tween 20 al 1% (V/V) y otras 3 veces por 2 min con PBS. Los cortes se trataron con 70µL del anticuerpo biotinilado de conejo anti-inmunoglobulina de ratón, obtenido de Dako Corporation, empleando una dilución 1:200 (previamente estandarizada), se colocó un cubreobjetos sobre este, se incubó a 32° C durante 1 h y las laminillas fueron lavadas como se ha indicado anteriormente. Posteriormente, las laminillas fueron cubiertas con 70µL del complejo Streptoavidina-Biotina-peroxidasa (ABC) dilución 1:200 obtenido de Dako Corporation y se incubó durante 30 min a 32°C.

Al terminar la incubación, los cortes se lavaron como ya ha sido mencionado y se procedió a su revelado usando una solución de 3, 3' diaminobencidina (DAB) (Dako) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %, desarrollando un producto insoluble de color café tras una incubación de 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo empleando agua desionizada.

REACCIÓN EMPLEANDO EL SEGUNDO ANTICUERPO

Antes de realizar la doble tinción, los cortes se sometieron a un proceso de calentamiento en microondas usando buffer de citratos (0.01M, pH = 6) por dos ciclos de 5 min cada uno, cambiando el buffer en cada ciclo y dando 5 min de reposo entre ciclo y ciclo. Este proceso revierte la unión de los anticuerpos antes indicados sin afectar el precipitado colorido desarrollado.

Posteriormente, el procedimiento incluyó el bloqueo de la unión inespecífica, incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -SMA humana, clona [alpha sm-1], obtenido de Abcam Corp. (Cambridge, UK) a una dilución 1:50, lavado e incubación con el anticuerpo secundario, incubación con el complejo ABC. Lo anterior en las condiciones antes indicadas. En este caso, el revelado empleó el Kit VIP (VIP substrate Kit for Peroxidase SK-4600; Vector Lab. Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit desarrolla un color violeta.



Figura 7. Doble tinción inmunohistoquímica. Después de realizar el desparafinado, la rehidratación, el bloqueo de la peroxidasa endógena y la recuperación de antígeno; en una primera fase se incuba el anticuerpo primario (anti-CD34), después el anticuerpo secundario biotinilado, seguido del complejo streptoavidina-biotina-peroxidasa, por último, el cromógeno (DAB) y el sustrato (H_2O_2) que genera un precipitado café que marca los sitios donde se encuentra la molécula (CD34). Pevio a la doble tinción inmunohistoquímica se debe realizar una incubación con buffer de citratos a temperatura de ebullición para desprender el complejo formado durante la primera fase. Posteriormente se repite el procedimiento variando en anticuerpo primario (anti- α -SMA) y el cromógeno el cual genera una coloración violeta.

MONTADO, DESHIDRATACIÓN Y CONTRATINCIÓN

Para finalizar el proceso, los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina de Gill y deshidratados con soluciones alcohólicas al 100% y al 96% y posteriormente con xilol. Las laminillas se montaron utilizando resina sintética comercial (Neo-Entellan; Merck).

CONTROLES DE REACTIVIDAD EMPLEADOS

Ya que la placenta contiene tanto vasos maduros como inmaduros, este material se empleó como control para la detección de estos tipos de vasos. La especificidad de la reacción fue determinada en los cortes histológicos estudiados al omitir los anticuerpos primarios en el procedimiento de tinción.

SELECCIÓN DE CAMPOS

Utilizando un microscopio óptico marca Leica, modelo CME (Leica microsystems Inc., Buffalo New Cork, USA) se observaron los cortes a una magnificación de 10X, para identificar las áreas de mayor vascularización en la zona tumoral. Se fotodocumentaron de 5 a 10 campos por corte histológico a una magnificación de 20X, considerando las áreas de alta vascularización (hot spots) encontradas.

CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD MICROVASCULAR

En las zonas seleccionadas, se contaron los microvasos sanguíneos (CD34+). De estos últimos se definió su grado de madurez, por la presencia (vasos maduros) o ausencia (vasos inmaduros) del recubrimiento de células murales marcadas con anti- α -SMA. Las observaciones y cuantificaciones fueron realizadas por 2 observadores diferentes.

La Densidad Microvascular (MVD) fue determinada y se segregó en densidad de microvasos inmaduros (MVDi) y densidad de microvasos maduros (MVDm). A partir de estos datos, se obtuvo el índice de madurez microvascular (VMI). Además, se analizó estas variables de acuerdo al grado de invasividad que presentan los subgrupos de adenocarcinoma; de acuerdo a lo anterior se han clasificado a los adenocarcinomas acinar, papilar, lepidico como medianamente invasivos y a los subtipos sólido y micropapilar como altamente invasivos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las variables estudiadas se emplearon como medidas de resumen la mediana y los percentiles. Con los datos obtenidos se realizó un análisis comparativo entre los distintos subtipos de adenocarcinomas (acinar, papilar, lepidico, sólido y micropapilar). La prueba estadística que se empleó fue Kruskal-Wallis con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Además, para analizar los subtipos agrupados de acuerdo a su invasividad se utilizó la prueba de Mann-Whitney con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

R E S U L T A D O S

FRECUENCIAS DE LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

Como ya se indicó, se estudiaron 32 casos de adenocarcinoma pulmonar, en los cuales se encontraron representados los cinco subtipos histológicos de acuerdo a la ASLC/ATS/ERS. La frecuencia de cada uno de los diferentes subtipos se muestra en la tabla 1. En dicha tabla se compara la frecuencia de los subtipos histológicos de nuestro estudio con los reportados en la literatura por otros autores empleando estudios genéticos (Yangawa, 2014; Nakamura, 2014; Tsuta, 2013), o histopatológicos (Ito, 2014).

En la tabla antes citada puede observarse que los subtipos acinar y papilar son los que se presentan en mayor frecuencia, tanto en los reportes por los autores como en nuestro estudio. Cabe mencionar que, aun cuando en nuestro estudio el tamaño (n) de nuestra muestra es mucho menor que cualquiera reportada por los autores citados, las frecuencias son muy similares y esta similitud proporcional abona a la representatividad de la muestra analizada en nuestro estudio.

	SUBTIPOS*					n
	ACINAR	LEPÍDICO	PAPILAR	SOLIDO	MICRO PAPILAR	
INER	28.1	12.5	21.9	31.3	6.3	32
NAKAMURA, 2014	34.1	15.2	40.6	8.3	1.9	276
YANAGAWA, 2014	25.6	23.1	35.2	13.2	2.8	386
ITO, 2014	7.5	22.6	64.5	5.4	0	93
TSUTA, 2013	12.9	18	44.6	16.4	8.1	757

*Porcentaje

Los distintos autores emplearon el nuevo sistema de clasificación histopatológica de la muestra.

CÉLULAS ENDOTELIALES (CD34⁺) Y PERICITOS (α -SMA⁺) EN VASOS SANGUÍNEOS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR DE ACUERDO AL SUBTIPO HISTOLÓGICO

SUBTIPO ACINAR

Este subtipo, de acuerdo al criterio morfológico, presenta glándulas redondas u ovals con un espacio luminal rodeado por células tumorales (Fig. 8A). En este subtipo, las zonas de vascularización fueron observadas principalmente en la periferia del tumor (Fig. 8B). En este subtipo histológico, la mediana de la densidad microvascular fue de 86 vasos /mm² (Tabla 2). La densidad de vasos maduros fue de 80 vasos/mm² y el índice de madurez microvascular fue de 86%.

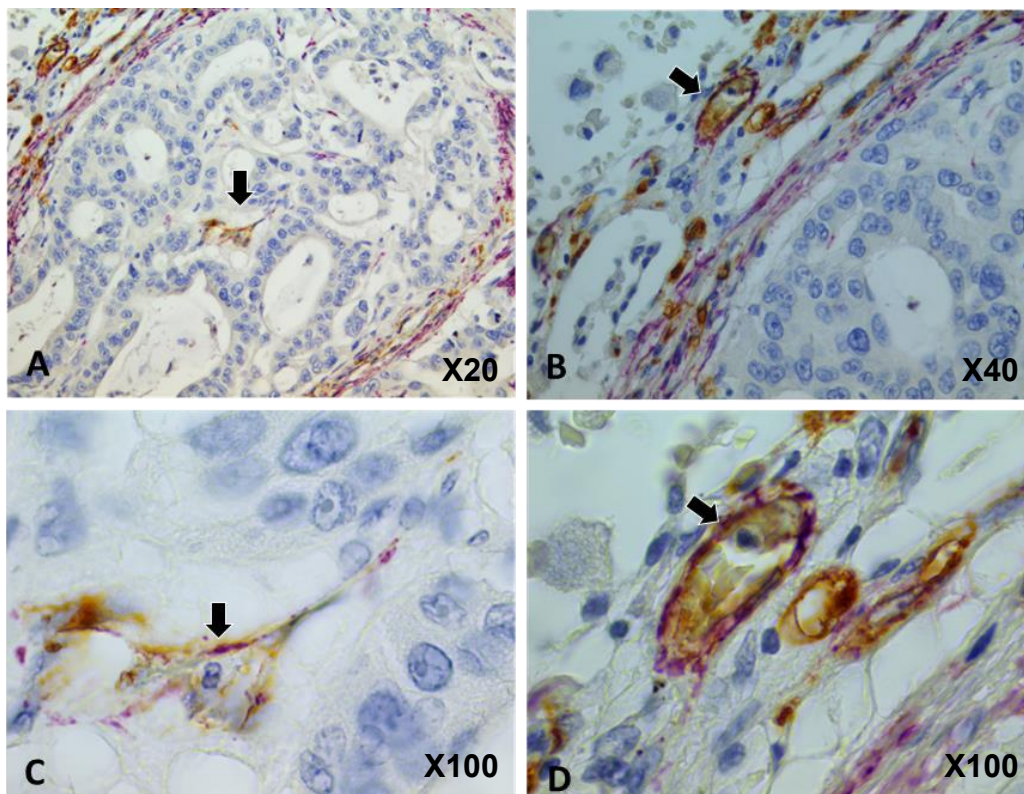


Figura 8. Detección de células endoteliales CD34⁺ (café) y pericitos α -SMA⁺ (violeta) en el subtipo acinar de adenocarcinoma

A, arquitectura tisular típica. La flecha señala un vaso intratumoral maduro. B vaso peritumoral maduro (flecha). C y D vasos intratumoral y peritumoral, respectivamente, con células endoteliales CD34⁺ (café) y pericitos α -SMA⁺ (violeta).

SUBTIPO LEPÍDICO

Este subtipo presenta células neoplásicas creciendo a lo largo de estructuras alveolares preexistentes (Fig. 9A, cabeza de flecha), engrosamiento septal (Fig. 9A flecha) y células tumorales intra-alveolares. Resultados de nuestro estudio indican que los vasos de mayor calibre presentan recubrimiento pericítico comparados con los capilares alveolares que presentan ausencia de ellos (Fig. 9B y 9D).

Los resultados de nuestro estudio muestran una mediana de la densidad microvascular total de 83 vasos/mm²; la densidad de vasos maduros fue de 31 vasos/mm² y el índice de madurez microvascular de 46%. Además, se observó que las células tumorales que crecían adosadas a los capilares alveolares, así como las que lo hacen en los vasos de mayor calibre son positivas al marcador de proliferación Ki67⁺ (resultado no mostrado), lo anterior sugiere que la ausencia de pericitos no es condición necesaria para la proliferación de las células tumorales.

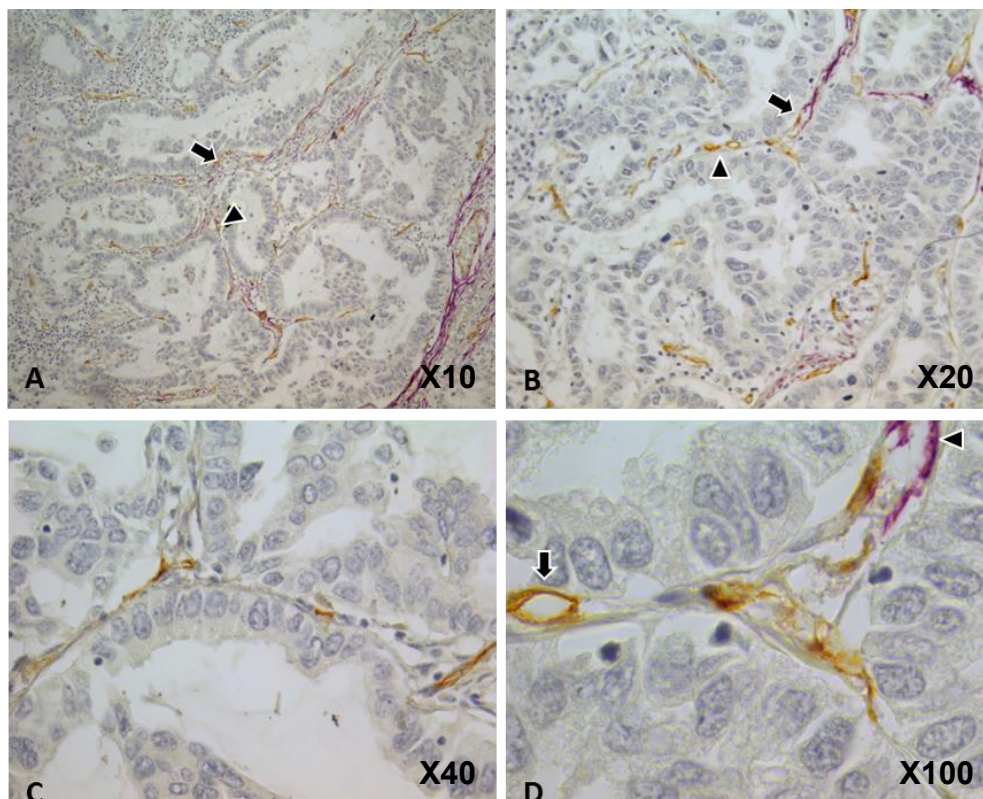


Figura 9. Detección de células endoteliales CD34⁺ (café) y pericitos α -SMA⁺ (violeta) en el adenocarcinoma Lepídico.

A, arquitectura tisular típica. B, vasos de diferente calibre α -SMA⁺ (flecha) y α -SMA⁻ (cabeza de flecha). C, vaso capilar sin pericitos (CD34⁺ α -SMA⁻). D, vasos maduros (flecha) e inmaduro (cabeza de flecha). Doble tinción por Inmunoperoxidasa; método ABC.

SUBTIPO PAPILAR

En estos carcinomas se forman estructuras papilares en los espacios alveolares donde se observan células columnares creciendo a lo largo de ejes fibro-vasculares (Fig. 10A). En estas estructuras, los vasos sustentan nutrientes y oxígeno a una gran cantidad de células tumorales (Fig. 10B). Nuestras observaciones muestran que algunos vasos presentaron pericitos, mientras que otros no. La ausencia de pericitos en los capilares alveolares es normal, ya que los capilares alveolares muestran una barrera alveolo-capilar delgada para facilitar el intercambio de gases.

La mediana de la densidad microvascular total fue de 74 vasos/mm² y la mediana de la densidad de vasos maduros fue de 39 vasos/mm², con un índice de madurez de 54%.

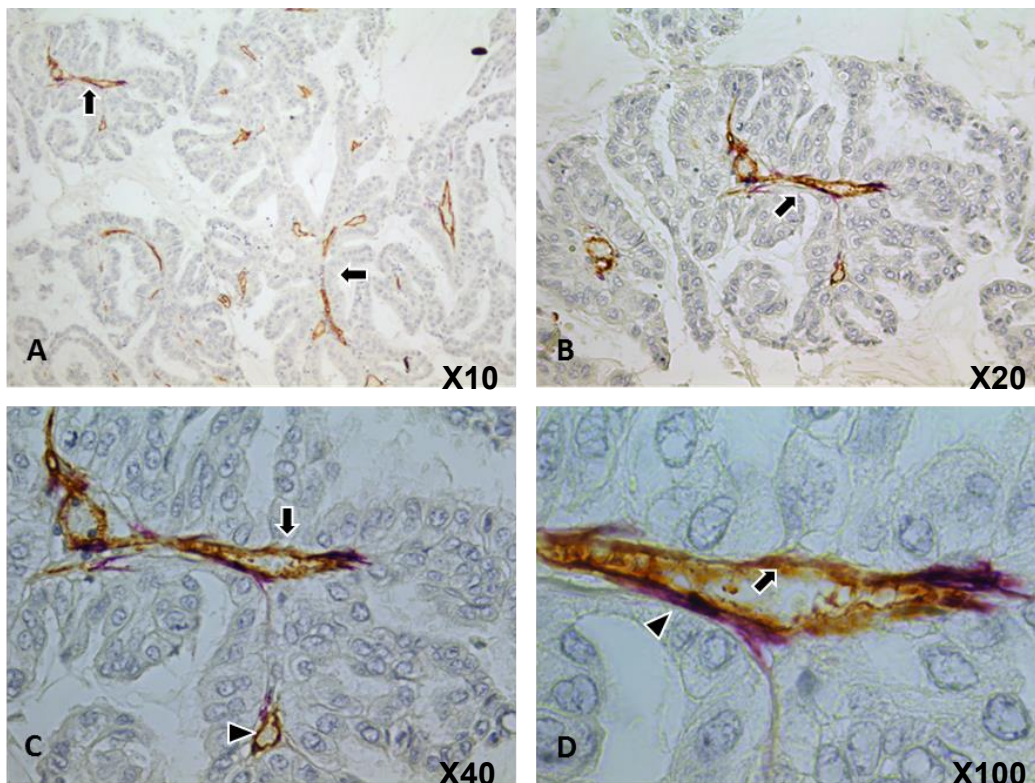


Figura 10. Detección de células endoteliales CD34+ (café) y pericitos α -SMA+ (violeta) en el adenocarcinoma Papilar.

A, arquitectura tisular típica B, eje fibrovascular (flecha). C, vaso maduro (flecha) y vaso inmaduro (cabeza de flecha). D, células endoteliales CD34+ (flecha) y pericitos α -SMA+ en un vaso maduro. Doble tinción por Inmunoperoxidasa; método de ABC.

SUBTIPO SÓLIDO

Estos carcinomas presentan mantos de células tumorales poligonales. Nuestros resultados muestran que las células tumorales se encuentran en estrecho contacto con vasos de pequeño calibre conteniendo (CD34⁺, α-SMA⁺) o no (CD34⁺, α-SMA⁻) pericitos, mientras que en la periferia del tumor se detectaron vasos de mayor calibre αSMA⁺ (Fig. 11A y 11B).

La mediana de la densidad microvascular total fue de 88 vasos/mm², mientras que la mediana de la densidad de vasos maduros tuvo un valor de 46 vasos/mm². El índice de madurez microvascular que se obtuvo fue de 51%.

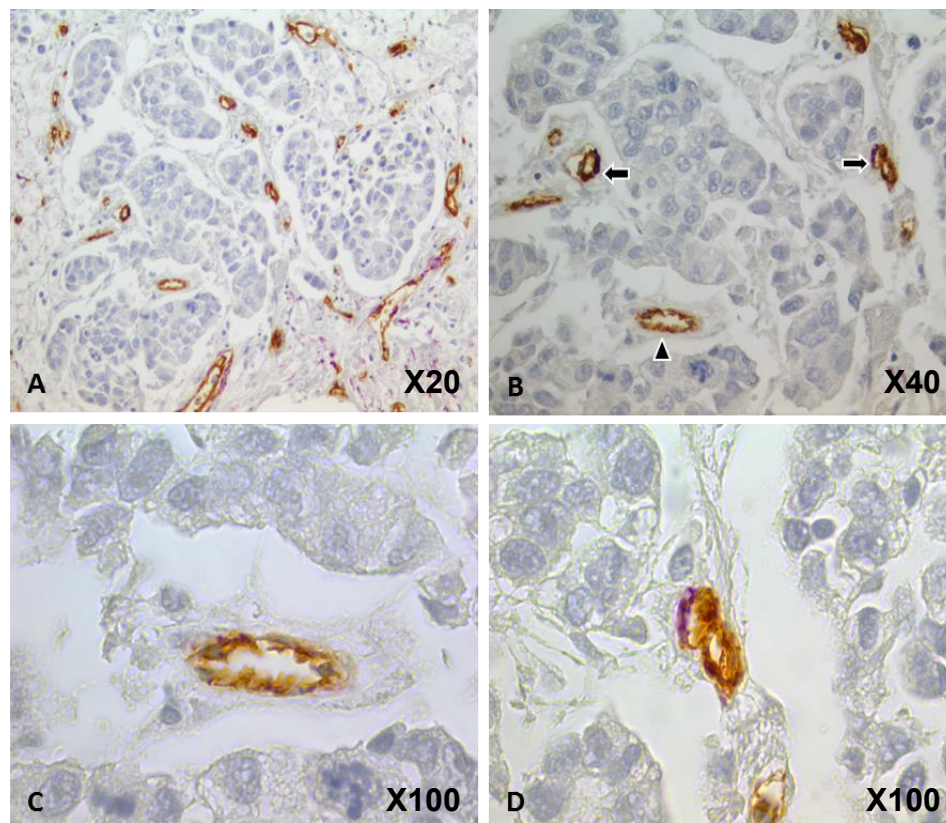


Figura 11. Detección de células endoteliales CD34⁺ (café) y pericitos α-SMA⁺ (violeta) en el adenocarcinoma Sólido.

A, arquitectura tisular típica de este subtipo B, vasos intratumorales maduros (flechas) e inmaduros (cabeza de flecha). C, vaso inmaduro (CD34⁺, α-SMA⁻). D, vaso maduro (CD34⁺ α-SMA⁺). Doble tinción por Inmunoperoxidasa; método de ABC.

SUBTIPO MICROPAPILAR

En este subtipo, las células tumorales se encuentran creciendo en penachos micropapilares con apariencia de anillos glandulares los cuales, a diferencia de los papilares, carecen de ejes fibrovasculares. Nuestras observaciones indican que estas estructuras se encuentran libres y no asociadas (Fig. 12A), pero en estrecha cercanía a vasos de grueso calibre (mayor que 50 μm) o flotando libres en los espacios alveolares. Debido a la baja frecuencia con que se observa este subtipo de adenocarcinoma pulmonar, y al escaso número de casos incluidos en nuestro estudio (sólo se analizaron dos muestras), creemos conveniente no indicar los valores de su densidad microvascular, densidad de vasos maduros ni el índice de madurez microvascular, ya que cualquier resultado estaría sesgado debido al tamaño de la muestra. Sin embargo, este subtipo se analizará en la sección siguiente.

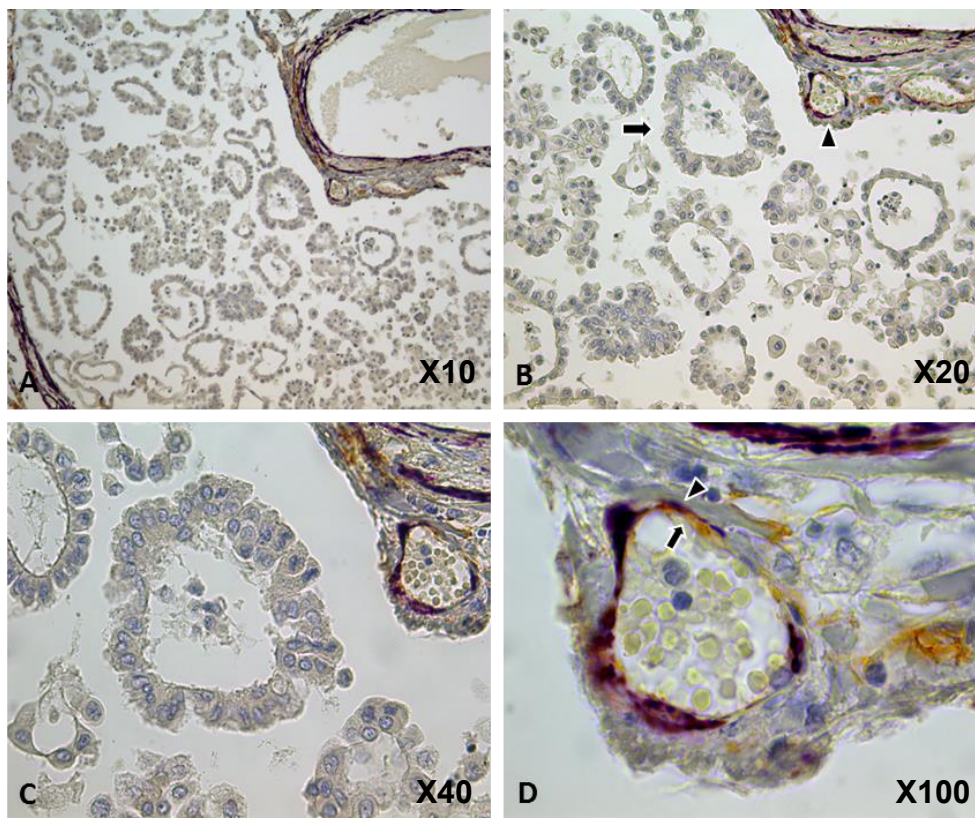


Figura 12. Detección de células endoteliales CD34+ (café) y pericitos α -SMA+ (violeta) en el adenocarcinoma Micropapilar.

A, arquitectura tisular típica. B, anillo de células tumorales (flecha) cercano a un vaso (cabeza de flecha). C, micropapilas anulares de células tumorales. D, células endoteliales (flecha) Y pericitos (cabeza de flecha) en vaso maduro (CD34+, α -SMA+). Doble tinción por Inmunoperoxidasa; método de ABC.

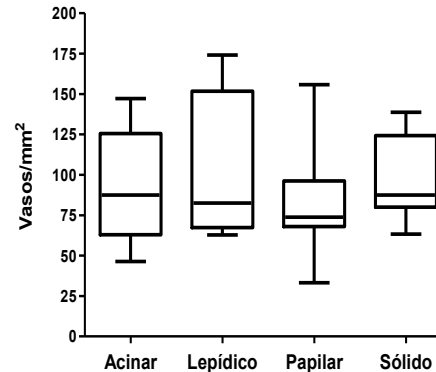
COMPARACIÓN DE LA VARIABLES ESTUDIADAS DE ACUERDO AL SUBTIPO DE ADENOCARCINOMA PULMONAR

En esta sección se comparan los resultados obtenidos de la densidad microvascular, densidad de vasos maduros e inmaduros y del índice de madurez microvascular de los distintos subtipos de adenocarcinoma pulmonar:

Tabla 2. DENSIDAD MICROVASCULAR TOTAL

	SUBTIPOS*			
	ACINAR	LEPÍDICO	PAPILAR	SOLIDO
n	9	4	7	10
Mediana	86	83	74	88
Rango	101	111	123	76
Q1	61	67	68	80
Q3	119	152	96	124

* vasos/mm²

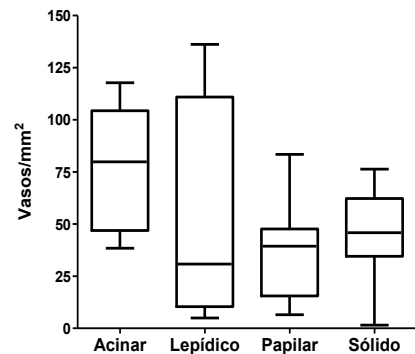


En los subtipos histológicos estudiados la mediana de la MVD fueron similares, no encontrado diferencia significativa entre los subtipos analizados.

Tabla 3 DENSIDAD DE VASOS MADUROS

	SUBTIPOS*			
	ACINAR	LEPÍDICO	PAPILAR	SOLIDO
n	9	4	7	10
Mediana	80	31	39	46
Rango	80	131	76	74
Q1	47	10	16	35
Q3	104	111	48	62

* vasos/mm²

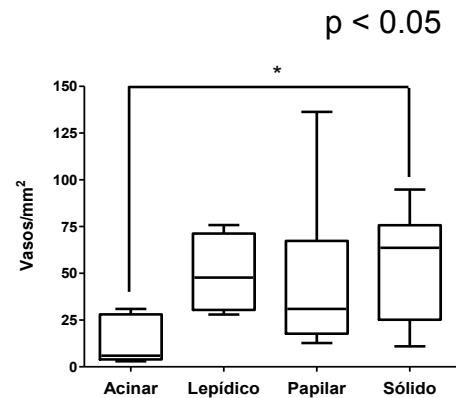


La mediana de la densidad de los vasos maduros fue similar entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar mostrando una amplia dispersión. La densidad de vasos inmaduros tiende a ser más elevada en el subtipo acinar (p=0.071).

Tabla 4 DENSIDAD DE VASOS INMADUROS

	SUBTIPOS*			
	ACINAR	LEPÍDICO	PAPILAR	SOLIDO
n	9	4	7	10
Mediana	6	48	31	64
Rango	28	48	123	84
Q1	3.9	30	18	25
Q3	28	71	67	76

* vasos/mm²



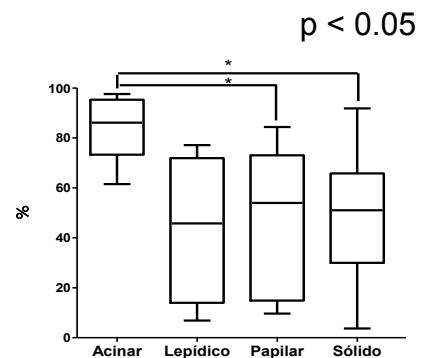
La densidad de microvasos inmaduros mostró ser similar entre los subtipos histológicos lepidico, papilar y sólido. Mientras que el subtipo histológico acinar mostró la menor MVDi. La MVDi fue significativamente diferente entre el subgrupo acinar con respecto al subtipo histológico sólido.

ÍNDICE DE MADUREZ MICROVASCULAR EN SUBTIPOS DE ADENOCARCINOMAS PULMONARES

Tabla 5 ÍNDICE DE MADUREZ μ VASCULAR

	SUBTIPOS*			
	ACINAR	LEPÍDICO	PAPILAR	SOLIDO
n	9	4	7	10
Mediana	86	46	54	51
Rango	36	70	74	88
Q1	73	14	15	30
Q3	95	72	73	66

* porcentaje



Con relación a este parámetro, el subtipo acinar mostró el índice de madurez microvascular vas alto y fue diferente significativamente con respecto a los subtipos papilar y sólido.

DENSIDAD MICROVASCULAR EN ADENOCARCINOMAS PULMONARES MEDIANA Y ALTAMENTE INVASIVOS

De acuerdo con la nueva clasificación, los subtipos acinar, lepidico y papilar son considerados como adenocarcinomas con un grado medio de invasividad, mientras que los subtipos sólido y micropapilar están considerados como adenocarcinomas altamente invasivos. Debido a que en el análisis por subtipo, los adenocarcinomas acinares (de mediana invasividad) y sólidos (alta invasividad) presentaron diferencias, se decidió continuar el análisis con el fin de investigar si existe alguna relación entre la densidad microvascular y el grado de invasividad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 en la que puede observarse que no existe diferencia en la densidad microvascular total ($p = 0.029$) ni en la densidad de vasos maduros ($p = 0.840$). Sin embargo, la densidad de vasos inmaduros es mayor en los adenocarcinomas de alto grado de invasividad, con respecto a los de bajo grado ($p = 0.023$). En cuanto al índice de madurez microvascular sólo se observó una tendencia a ser mayor en el grupo de mediana invasividad ($p = 0.076$). Este resultado, aunque no mostró diferencia significativa, biológicamente puede ser relevante, como se discutirá en la sección correspondiente.

PARÁMETRO	VASOS TOTALES		VASOS MADUROS		VASOS INMADUROS		ÍNDICE DE MADUREZ	
	MEDIA	ALTA	MEDIA	ALTA	MEDIA	ALTA	MEDIA	ALTA
Mediana	85	88	45	46	27	61	70	51
Q1	66	82	29	29	8	30	47	32
Q3	110	129	84	65	39	72	86	70
Rango	141	152	131	153	133	84	91	88
n	20	12	20	12	20	12	20	12
p	0.209		0.840		0.023		0.076	

D I S C U S I Ó N

Evidencias experimentales sustentan que la angiogénesis es una condición indispensable para la invasión y metástasis tumoral (Hanahan, 2000). A pesar de que se han desarrollado varias técnicas para evaluar la densidad microvascular, el análisis en material biopsiado sigue siendo el “estándar de oro”.

En la literatura revisada para documentar las condiciones experimentales que se requieren en la identificación de vasos sanguíneos y pericitos, los grupos, además de emplear distintas condiciones metodológicas (recuperación o no de antígeno, tiempo de incubación con los anticuerpos, tinción directa o indirecta, etc.), utilizan diversos marcadores para las células, así como distintas clonas de anticuerpos. Además, de que las publicaciones previas a este trabajo no categorizan los tumores tipo adenocarcinoma de pulmón de acuerdo a la clasificación actual, su enfoque se ha relacionado a aspectos como la predicción del desarrollo de la enfermedad (Ushijima, 2001; Yano, 2000) o su relación como factores pronósticos, cuando se asocia con la expresión del VEGF (Inoshima, 2002).

La variedad de aspectos antes mencionados no permite la obtención de resultados comparables y por lo tanto un conocimiento concluyente de la participación de la microvasculatura en los tumores pulmonares. Este trabajo de investigación se realizó como un primer acercamiento a investigar las características de la microvasculatura en relación a su densidad e índice de maduración vascular en los distintos subtipos de adenocarcinoma pulmonar catalogados de acuerdo a la clasificación actual.

En el presente estudio se utilizó el anticuerpo anti-CD34 por ser el que ha demostrado identificar el mayor número de vasos sanguíneos y mostrar una mejor correlación con el pronóstico de la enfermedad (Meert, 2002). A diferencia de la molécula CD105 que identifica selectivamente los vasos angiogénicos (no cubiertos con pericitos), el anticuerpo anti-CD34 permite identificar todo el lecho vascular dentro del tumor. El empleo conjunto (en el mismo corte histológico) empleando doble inmunohistoquímica y el anticuerpo anti- α -SMA, que reconoce los pericitos que recubren el vaso, nos permite caracterizar los vasos como maduros o no maduros (angiogénicos).

La cuantificación de los vasos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Weidner, quien indica que es preferible observar zonas de alta vascularización a baja magnificación (X5 y X10) para localizar los “hot spots” y, posteriormente contar los vasos en alta magnificación (X20 o mayor). La distinción de un vaso de otro se observará como una interrupción de la continuidad de la marca. (Weidner, 2008).

En este trabajo, se utilizaron todas las observaciones realizadas y no solo la de mayor densidad vascular con la finalidad de obtener una representatividad general de los vasos sanguíneos y lograr mayor información del patrón microvascular en cada subtipo histológico analizado, de acuerdo al objetivo del estudio.

Como ya se mencionó, el recubrimiento pericítico de los vasos sanguíneos fue identificado por la expresión de la α -SMA, reportado por distintos grupos en células tumorales (Armulik, 2011; Eberhard, 2000; Damianovich, 2013). En NSCLC se ha reportado que esta molécula también se expresa en miofibroblastos (Cheng, 2014) y células tumorales (Lee, 2013). En nuestro estudio, estos tipos celulares pudieron ser diferenciados de los pericitos tanto por su morfología como por la localización relativa a los vasos identificados por la molécula CD34. El empleo de la doble inmunohistoquímica nos permitió tener esta prerrogativa sobre otros estudios que utilizan la tinción simple.

Es necesario indicar que, para la correcta identificación y localización de ambas estirpes celulares, que como se observa en resultados están en íntimo contacto, se requirió la estandarización de las diluciones empleadas de los anticuerpos primarios, así como del anticuerpo secundario. Asimismo, se determinó el tiempo de reacción que permitiera la formación de un producto colorido (violeta) que no fuera opacado por la primera tinción que desarrolla un color café oscuro. Por lo tanto, las variables estudiadas requirieron de contar con un procedimiento metodológico preciso con el fin de obtener resultados rigurosos.

En relación al tamaño de la muestra analizada en este trabajo sabemos que es pequeño; sin embargo, la frecuencia con la que encontramos los subtipos histológicos de adenocarcinoma es muy similar a las reportadas en estudios que emplean un tamaño de muestra mucho mayor y en los que han usado la actual clasificación de la IASLC/ATS/ERS. Este aspecto abona a la representatividad de la muestra analizada por nosotros.

Bajo la premisa de que los vasos inmaduros podrían ser vasos de formación reciente, el VMI ha sido empleado como un indicador de angiogénesis (Eberhard, 2000). Por lo anterior, puede considerarse que el grado de angiogénesis en los subtipos papilar (VMI=54%), sólido (VMI=51%) y lepidico (VMI=46%) es mayor que en el subtipo acinar (VMI=86%), en el que el 86 por ciento de los vasos presentaron el fenotipo CD34+ α SMA+. Desde este punto de vista, los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma lepidico, papilar o sólido, serán los mejores candidatos a la aplicación de las terapias angiogénicas.

El análisis comparativo de adenocarcinomas altamente invasivos (micropapilares y sólidos) y medianamente invasivos (acinares, lepidicos y papilares) indica que los primeros presentan mayor densidad de vasos inmaduros, lo que podría interpretarse como un indicio de mayor capacidad angiogénica. Este resultado mostró significancia estadística y biológicamente es relevante, por ser un indicio de que la capacidad angiogénica en los subtipos altamente invasivos es mayor. De ser así, los pacientes diagnosticados con adenocarcinomas altamente invasivos (sólido o micropapilar) podrían responder mejor a terapias antiangiogénicas.

C O N C L U S I O N E S

De acuerdo con el índice de madurez microvascular, los pacientes con adenocarcinoma sólido y papilar podrían ser los mejores candidatos a recibir terapia antiangiogénica a diferencia de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma acinar.

Este trabajo pretende poner de manifiesto la necesidad de unificar criterios para el estudio de la MVD para así lograr establecer la MVD y el VMI como características diacríticas para la selección de pacientes susceptibles de recibir terapias antiangiogénicas.

R E F E R E N C I A S

1. Anisimov V. N. (2009). Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon. *Mech Ageing Dev*, 130: 105-121.
2. Armulik A., Genove G., Betsholtz C. (2011). Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21:193-215.
3. Bafico A, Aaronson S. A. (2003). Classification of growth factors and their receptors. En: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editores. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (EN): BC Decker; 2003. Consultado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12423/>
4. Barrett J.C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspec*, 100: 9-20.
5. Baeten C. I., Wagstaff J., Verhoeven I. C., Hillen H. F., Griffioen A.W. (2002) Flow cytometric quantification of tumour endothelial cells; an objective alternative for microvessel density assessment. *Br J Cancer*, 87: 344 – 347.
6. Bergers G., Song S., Meyer-Morse N., Bergsland E., Hanahan D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 111: 1287-1295.
7. Birau A., Ceausu R. A., Cimpean A. M., Gaje P., Raica M., Olariu T. (2012). Assesment of angiogenesis reveals blood vessel heterogeneity in lung carcinoma. *Oncol Letters*, 4: 1183–1186.
8. Birbrair A., Zhang T., Wang Z.-M., Messi M. L., Mintz A., Delbono O. (2015). Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. *Clin Science*, 128: 81–93.
9. Botta C, Barbieri V, Ciliberto D. (2013). Systemic inflammatory status at baseline predicts bevacizumab benefit in advanced Non-Small Cell Lung Cancer patients. *Cancer Biol Ther*, 14: 469-475.
10. Bouck N., Stellmach V., Hsu S.C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*, 69: 135–174.

11. Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol*, 206: 624–635.
12. Carmeliet P., Rakesh K. J. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249-257.
13. Carlini M.J., Dalurzo M.C., Lastiri J.M., Smith D.E., Vasallo B.C., Puricelli L.I., Lauría de Cidre L.S. (2010). Mast cell phenotypes and microvessels in Non-Small Cell Lung Cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol*, 41: 697-705
14. Chen J. J. W., Lin Y. C., Yao P. L., Yuan A., Chen H. Y., Shun C. T., Tsai M. F., Chen C. H., Yang P. C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol*, 1023: 953-964.
15. Chen Y., Zou L., Zhang Y., Chen Y., Xing P., Yang W., Li F., Ji X., Liu F., Lu X. (2014). Transforming growth factor- β 1 and α -smooth muscle actin in stromal fibroblasts are associated with a poor prognosis in patients with clinical stage I–IIIA Non Small Cell Lung Cancer after curative resection. *Tumor Biol*, 35: 6707–6713
16. Chen Z., Liu X., Zhao J., Yang H., Teng X. (2014). Correlation of EGFR mutation and histological subtype according to the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 8039-8045
17. Chung A. S., Lee J., Ferrara N. (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Rev Can*, 10: 505-514.
18. Damianovich M., Hout Siloni G., Barshack I., Simansky D. A., Kidron D., Dar E., Avivi C., Onn A. (2013). Structural basis for hyperpermeability of tumor vessels in advanced lung adenocarcinoma complicated by pleural effusion. *Clin Lung Cancer*, 14: 688-698.
19. Donnem T., Hu J., Ferguson M., Adighibe O., Snell C., Harris A. L., Gatter K.C., Pezzella F. (2013). Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med*, 2: 427–436.
20. Dulmovits B. M., Herman I. M. (2012). Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 1800–1812

21. Eberhard A., Kahlert S., Goede V. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, 60: 1388-1393.
22. Fakhrejehani E., Masakazu T. (2012). Tumor angiogenesis: pericytes and maturation are not to be ignored. *J Oncol*, 2012: 10 pages
23. Folkman J. (1989). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4–6.
24. Folkman J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6: 273-86.
25. Folkman J, Kalluri R. Beginning of angiogenesis research. En: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton BC Decker; 2003. Consultado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13877/>
26. Furness S., McNagny K. (2006). Beyond mere markers functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res*, 34: 13–32.
27. Gianni-Barrera R., Trani M., Reginato S., Banfi A. (2011). To sprout or to split? VEGF, notch and vascular morphogenesis. *Biochem Soc Trans*, 39: 1644–1648.
28. Gibbons D, Pisters K.M., Johnson F, Eapen G.A. (2011). Chapter 15. Non–Small Cell Lung Cancer. En Kantarjian H.M., Wolff R.A., Koller C.A. (Eds), *The MD Anderson Manual of Medical Oncology, 2e*. Consultado en Enero 09, 2015 de <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=379&Sectionid=39902039>.
29. Guilini C., Urayama K., Turkeri G., Dedeoglu D. B., Kurose H., Messaddeq N., Nebigil C. G. (2009). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298: H844–H852.
30. Han H., Silverman J.F., Santucci T. S., Macherey R. S., d'Amato T. A., Tung M. Y., Weyant R. J., Landreneau R. J. (2001). Vascular endothelial growth factor expression in stage I Non-Small Cell Lung Cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol*, 8: 72-9.

31. Hanahan D., Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353–364.
32. Hanahan D., Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
33. Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, 144: 646-674.
34. Hasan J., Byers R., Jayson G. C. (2002). Intra-tumoural microvessel density in human solid tumors. *Br J Cancer*, 86: 1566 – 1577.
35. Hollings N., Shaw P. (2001). Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur Respir Mon*, 17: 120-50.
36. Horn L, Pao W., Johnson D.H. (2012). Chapter 89. Neoplasms of the Lung. En Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Jameson J, Loscalzo J (Eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e*. Consultado Enero 09, 2015 de <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=331&Sectionid=40726825>.
37. Hu H, Pan Y, Li Y, Wang L, Wang R, Zhang Y, Li H, Ye T, Zhang Y, Luo X, Shao L, Sun Z, Cai D, Xu J, Lu Q, Deng Y, Shen L, Ji H, Sun Y, Chen H. (2014). Oncogenic mutations are associated with histological subtypes but do not have an independent prognostic value in lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther*, 7: 1423-1437.
38. Inoshima N., Nakanishi Y., Minami T., Izumi M., Takayama K., Yoshino I., Hara N. (2002). The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 3480-6.
39. Ito M., Miyata Y., Kushitani K., Yoshiya T., Mimae T., Ibuki Y., Misumi K., Takeshima Y., Okada M. (2014). Prediction for prognosis of resected pT1a-1bN0M0 adenocarcinoma based on tumor size and histological status: Relationship of TNM and IASLC/ATS/ERS classifications. *Lung Can*, 85: 270–27
40. Jubb, A. M., Cesario, A., Ferguson, M., Congedo, M. T., Gatter, K. C., Lococo, F., Mule A., Pezzella, F. (2011). Vascular phenotypes in primary Non-Small Cell Lung Carcinomas and matched brain metastases. *Br J Cancer*, 104: 1877-1881.

41. Kadota K., Colovos C., Suzuki K., Rizk N. P., Dunphy M. P., Zabor E. C., Sima C. S., Yoshizawa A., Travis W. D., Rusch V. W., Adusumilli P. S. (2012). FDG-PET SUVmax combined with IASLC/ATS/ERS histologic classification improves the prognostic stratification of patients with stage I lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 19: 3598–3605
42. Kakolyris, S., Giatromanolaki, A., Koukourakis, M., Leigh, I. M., Georgoulas, V., Kanavaros, P., Sivridis E., Gatter K. C., Harris, A. L. (1999). Assessment of vascular maturation in Non-Small Cell Lung Cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression. *Cancer Res*, 59: 5602-5607.
43. Kato, Y., Nakamura, H., Tojo, H., Nomura, M., Nagao, T., Kawamura, T., Kodama, T., Ohira, T., Ikeda, N., Fehniger, T., Marko-Varga, G., Nishimura, T., Kato, H. (2015). A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-types. *Clin Trans Med*, 4: 1-13.
44. Kerbel R. S. (2008). Tumor Angiogenesis, *N Engl J Med* 358: 2039-2049.
45. Lee H. W. (2013). Alpha-smooth muscle actin (ACTA2) is required for metastatic potential of human lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 19: 5879–89.
46. Li C., Gardy R, Seon B.K. (2003). Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer*, 88: 1424-1431.
47. Maeda R, Ishii G, Ito M, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Haga H, Nagai K, Ochiai A. (2012). Number of circulating endothelial progenitor cells and intratumoral microvessel density in Non-Small Cell Lung Cancer patients: differences in angiogenic status between adenocarcinoma histologic subtypes. *J Thorac Oncol*, 7, 503-511.
48. Maltby S., Freeman S., Gold M. (2011). Opposing roles for CD34 in B16 melanoma tumor growth alter early stage vasculature and late stage immune cell infiltration. *PLoS ONE*, 6: e18160.

49. Martin L., Green B., Renshaw C., Lowe D., Rudland P., Leinsterl S. J., Winstanley J. (1997). Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer*, 76: 1046-1054.
50. Masuya D., Huang C., Liu D., Kameyama K., Hayashi E., Yamauchi A., Kobayashi S., Haba R., Yokomise H. (2001). The intratumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 associated with angiogenesis in Non-Small Cell Lung Carcinoma patients. *Cancer*, 10, 2628-38
51. Medetoglu B., Gunluoglu M.Z., Demir A., Melek H., Buyukpinarbasili N., Fener N., Dincer S.I. (2010). Tumor angiogenesis in predicting the survival of patients with stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 140: 996-1000.
52. Meert A. P., Paesmans M., Martin B., Delmotte P, Berghmans T, Verdebout J-M, Lafitte J. J., Mascaux C, Sculier J. P. (2002). The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*, 87: 694 – 701.
53. Mésange, P., Poindessous, V., Sabbah, M., Escargueil, A. E., de Gramont, A., & Larsen, A. K. (2014). Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. *Oncotarget*, 5: 4709–4721.
54. Miettinen M., Lindenmayer A. E., Chaubal A. (1994). Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens-evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol*, 7: 82-90.
55. Mlika M., Makhlof C., Boudaya M. S., Haddouchi C., Tritar F., Mezni F. (2014). Evaluation of the microvessel density and the expression of metalloproteases 2 and 9 and TTF1 in the different subtypes of lung adenocarcinoma in Tunisia: a retrospective study of 46 cases. *J Immunoassay Immunochem*, 36: 111–118.
56. Moschetta M., Mishimaa Y., Sahina I., Maniera S., Glaveya S., Vaccab A., Roccaroa A. M., Ghobrial I. M. (2014). Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, 1846: 26–39.

57. Nagy J A, Chang S.H., Dvorak A. M., Dvorak H. F. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer*, 100: 865–869.
58. Nakamura H, Saji H, Shinmyo T, Tagaya R, Kurimoto N, Koizumi H,. (2015). Association of IASLC/ATS/ERS histologic subtypes of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor mutations in 320 resected cases. *Clin Lung Cancer*, 16: 209-215.
59. Nassiri F., Cusimano M. D., Scheithauer B. W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G. M., Syro L. V., Kovacs K., Lloyd R. V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*, 31: 2283-90.
60. Nason K.S., Maddaus M.A., Luketich J.D. (2014). Chest Wall, Lung, Mediastinum, and Pleura. En Brunnicardi F, Andersen D.K., Billiar T.R., Dunn D.L., Hunter J.G., Matthews J.B., Pollock R.E. (Eds), *Schwartz's Principles of Surgery, 10e*. Consultado: Enero 12, 2015 de <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=980&Sectionid=59610861>
61. Nitadori, J.-i., Bograd, A. J., Kadota, K., Sima, C. S., Rizk, N. P., Morales, E. A., Rusch, V. W., Travis, W. D., Adusumilli, P. S (2013). Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2 cm or smaller. *J Natl Cancer Inst* 105: 1212–1220.
62. O'Byrne K.J., Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Cox G., Turley H., Steward W.P., Gatter K., Harris A.L. (2000). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Br J Cancer*, 8: 1427-1432.
63. Offersen B. V., Pfeiffer P., Hamilton-Dutoit S., Overgaard J. (2001). Patterns of angiogenesis in NonSmall-Cell Lung Carcinoma. *Cancer*, 91: 1500-1509.
64. Ozbudak I.H., Ozbilim G., Kucukosmanoglu I., Dertsiz L., Demircan A. (2009). Vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Inatl J Surg Path*, 17: 390-395.

65. Passalidou, E., Trivella, M., Singh, N., Ferguson, M., Hu, J., Cesario, A., Pezzella, F. (2002). Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer*, 86: 244–249.
66. Pezzella, F., Pastorino, U., Tagliabue, E., Andreola, S., Sozzi, G., Gasparini, G., Rilke, F. (1997). Non-Small-Cell Lung Carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*, 151, 1417–1423.
67. Pitot H. C., Dragan Y. P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J*, 5: 2280-2286.
68. Ponder B. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411: 336-377
69. Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146: 873-887.
70. Pouysségur J., Dayan F., Mazure N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 25: 437-443.
71. Sadler J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67: 395-424.
72. Sardari Nia P., Colpaert, C., Blyweert, B., Kui, B., Vermeulen, P., Ferguson, M., Schil, P. V. (2004). Prognostic value of nonangiogenic and angiogenic growth patterns in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Br J Cancer*, 91: 1293–1300.
73. Sardari Nia P., Van Marck E, Weyler J, Van Schil P. (2010). Prognostic value of a biologic classification of Non-Small-Cell Lung Cancer into the growth patterns along with other clinical, pathological and immunohistochemical factors. *Eur J Cardiothorac Surg*, 38: 628-636.
74. Schor A. M., Pazoukil S., Morris J., Smither R. L., Chandrachud L. M., Pendleton N. (1998). Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus. *Br J Cancer*, 77: 946-951
75. Schimpf C., Duffield J. S. (2011). Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 20:297–305
76. Shibusu T., Shijubo N., Abe S. (1998). Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 4: 1483-1487.

77. Shimanuki Y., Takahashi K., Cui R., Hori S., Takahashi F., Miyamoto H., Fukurchi Y. (2005). Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*, 183: 29-42.
78. Stacker S. A., Achen M. G., (2013). The VEGF signaling pathway in cancer: the road ahead. *Chin J Cancer*, 32: 297–302.
79. Stefanou D., Batistatou A., Arkoumani E., Ntzani E., Agnantis N. J. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Histol Histopathol*, 19: 37-42.
80. Seftor R. E. B., Hess A. R., Seftor E. A., Kirschmann D. A. (2012). Tumor cell vasculogenic mimicry from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathology*, 181: 1115-1125.
81. Takanami I., Takeuchi K., Naruke M. (2000). Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 15: 88: 2686-2692.
82. Takanami I. (2004). Overexpression of Ang-2 mRNA in Non-Small Cell Lung Cancer: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncol Rep*, 12: 849-53.
83. Tamura M., Ohta Y., Kajita T., Kimura K., Go T., Oda M., Nakamura H., Watanabe G. (2001). Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol Rep*, 8: 1097-1102.
84. Travis W. D., Brambilla E., Noguchi M., Nicholson A. G., Geisinger K. R., Yatabe Y., Beer D. G., Powell C. A., Riely G. J., Van Schil P. E., Garg K., Austin J. H. M., Asamura H., Rusch V. W., Hirsch F. R., Scagliotti G., Mitsudomi T., Huber R. M., Ishikawa Y., Jett J., Sanchez-Cespedes M., Sculier J., Takahashi T., Tsuboi M., Vansteenkiste J., Wistuba I., Yang P., Aberle D., Brambilla C., Flieder D., Franklin W., Gazdar A., Gould M., Hasleton P., Henderson D., Johnson B., Johnson D., Kerr K., Kuriyama K., Soo Lee J. ., Miller V. A., Petersen I., Roggli V., Rosell R., Saijo N., Thunnissen E., Tsao M., Yankelewitz D., (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory

- Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol*, 6: 244 – 285.
85. Tsuta K, Kawagoe M., Inoue E., Yoshida A., Takahashi F., Sakurai H., Watanabe S., Takeuchi M., Furuta K., Asamura H., Tsuda H. (2013). The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer*, 81: 371– 376.
 86. Ushijima, C., Tsukamoto S, Yamazaki K., Yoshino I., Sugio K., Sugimachi K. (2001). High vascularity in the peripheral region of Non-Small Cell Lung Cancer tissue is associated with tumor progression. *Lung Cancer*, 34: 233–241.
 87. Vermeulen P. B., Gasparini G., Fox S. B., Colpaert C., Marson L. P., Gion M. (2002). Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*, 38: 1564–1579.
 88. Wang T., Zhang T., Han X., Liu X., Zhou N., Liu Y. (2015). Impact of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of stage IA adenocarcinoma of the lung: Correlation between computed tomography images and EGFR and KRAS gene mutations. *Exp therp medicine*, 9: 2095-2103.
 89. Wang W.-Q., Liu L., Xu H.-X., Luo G.-P., Chen T., Wu C.-T., Xu Y.-F., Xu J., Liu C., Zhang B., Long J., Tang Z.-Y., Yu X.-J. (2013). Intratumoral α -SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer. *PLoS ONE*, 8: e71189.
 90. Weidner N. (2008). Chapter 14 Measuring intratumoral microvessel density, En: David A. Cheresh. Editor(s) *Methods in Enzymology*, Academic Press, 444: 305-323.
 91. Weinberg R. A. (1996). How cancer arises. *Science Am*, 275: 62-70.
 92. Xian X., Hakansson J., Stahlberg A., Lindblom P., Betsholtz C., Gerhardt H., Semb H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clinical Invest*, 116: 642–651.
 93. Yanagawa N., Shiono S., Abiko M., Ogata S.-y., Sato T., Tamura G. (2014). The correlation of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)/American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)

- classification with prognosis and EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*, 98: 453-458.
94. Yano ,T., Tanikawa S., Fujie T., Masutani M., Horie T. (2000). Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Eur J Cancer*, 36: 601–609.
95. Yazdani, S., Miki Y., Tamaki K., Ono K., Iwabuchi E., Abe K., Suzuki T., Sato Y., Kondo T., Sasano H. (2013). Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in Non–Small Cell Lung Cáncer. *Hum Pathol*, 44: 1586-1596.
96. Yonenaga Y., Mori A., Onodera H., Yasuda S. (2005). Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology*, 69: 159-166.
97. Yuan A., Yang P. C., Yu C. J., Lee Y. C., Yao Y. T., Chen C. L., Luh K. T. (1995). Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Am J Resp Critical Care Med*, 152: 2157-2162.
98. Zhang L., Chen J., Ke Y., Mansel R. E., Jiang W. G., expression of placenta growth factor (PIGF) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncology*, 3.