



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

***DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD MICROVASCULAR SANGUÍNEA Y LINFÁTICA
EN LOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR.***

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN DERMATOPATOLOGÍA

PRESENTA:

DRA. ISABELA PÉREZ PRIETO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA MERCADILLO PÉREZ

PROFESORA TITULAR DEL CURSO:

DRA. PATRICIA MERCADILLO PÉREZ

CIUDAD..DE.MÉXICO, JULIO 2017





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.

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

DR. LINO EDUARDO CARDIEL MARMOLEJO

Director de Enseñanza

Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

DRA. PATRICIA MERCADILLO PÉREZ

Directora de Tesis

Jefa del Servicio de Dermatopatología

Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Profesora titular del Curso de Especialización en Dermatopatología

DRA. ISABELA PÉREZ PRIETO

Autora de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis la dedico a todas las personas que formaron parte en su elaboración, así como a todas aquellas personas involucradas en mi formación.

A la Dra. Patricia Mercadillo Pérez, gracias desde un inicio por confiar en mí y permitirme formar parte de este hermoso servicio que usted lidera con tanta pasión y entrega desde hace muchos años. Gracias por su interés en mi desarrollo tanto personal como profesional. Ha sido un orgullo el haberla tenido como profesora. Siempre estaré agradecida con usted, por tenderme su mano y mostrarme su apoyo en cada momento, que Dios la bendiga siempre. Muchísimas gracias por todas sus enseñanzas, apoyo académico y por fomentar en nosotros el interés por la investigación médica.

Al Dr. Luis Miguel Moreno, gracias por su apoyo académico durante estos dos años de sub-especialidad; así como por ayudarme en cada paso de la realización de esta tesis.

A mis papás, los dos grandes amores de mi vida. Han sido mis ángeles guardianes, los mejores maestros y mi modelo a seguir. Gracias por su amor y apoyo incondicional en cada momento.

A mis hermanas, cuñados y sus bebés ...gracias por ser la mejor familia que pude tener...no hay mejores porras como las tuyas!.

A la familia Rodríguez Sánchez, gracias por estar al pendiente de mí, quererme, apoyarme y celebrar mis logros como si fuera una más de su familia.

A Froy, gracias por darme tu amor y apoyo a cada momento desde que nos conocimos; gracias por ser mi compañero de sueños y estar a mi lado durante este camino que hemos soñado y seguiremos soñando juntos.

ÍNDICE

Resumen estructurado/Summary	1
PARTE I Marco teórico	4
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Objetivos del estudio	18
Hipótesis del trabajo	19
PARTE II Material y método	19
Diseño y duración	19
Definición del universo de estudio	19
Tamaño de la muestra y método de muestreo.	20
Criterios de inclusión para los casos	20
Criterios de no inclusión para los casos	20
Definición operativa de variables y unidades de medida	21
Procedimiento	22
Análisis estadístico	25
Aspectos éticos	26
Relevancia y expectativas	26
Recursos: humanos, materiales y financieros	26
PARTE III Resultados	27
PARTE IV Discusión	44
PARTE V Conclusiones	48
PARTE VI. Referencias	51
PARTE VII Anexos	56

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD MICROVASCULAR SANGUÍNEA Y LINFÁTICA EN LOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR.

RESUMEN ESTRUCTURADO

ANTECEDENTES.

El carcinoma basocelular (CBC) representa el 75% de todas las neoplasias de piel. Se considera en términos generales como un tumor de crecimiento lento y comportamiento no agresivo, que responde bien a los diferentes tipos de tratamientos locales. Sin embargo, algunos casos de CBC presentan crecimiento agresivo, infiltran rápidamente estructuras profundas, tienden a recurrir posterior al tratamiento local y ocasionalmente metastatizan.

La angiogénesis es un proceso en el que la neovascularización se desarrolla a partir del endotelio de la vasculatura preexistente. La capacidad de un tumor sólido de inducir angiogénesis se considera un factor importante que influye en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Por su parte, la linfangiogénesis es un área poco estudiada que bajo la misma premisa pudiera afectar la evolución y pronóstico de una neoplasia.

OBJETIVO. Medir la expresión del índice proliferativo ki67 y determinar la densidad de la microvasculatura sanguínea (mediante la positividad de CD34) y linfática (mediante la positividad de podoplanina, (D2-40)) en los casos de carcinoma basocelular.

DISEÑO Y DURACIÓN. Se realizará un estudio observacional, descriptivo y transversal. La duración del estudio comprenderá el tiempo requerido para analizar 30 laminillas, con diagnóstico histopatológico de carcinoma basocelular, que fueron recibidas y revisadas en el periodo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017.

PROCEDIMIENTO. Se realizó la medición semicuantitativa de la expresión del índice proliferativo ki67; así mismo se determinó la densidad microvascular sanguínea y linfática a través de la positividad de CD34 y D2-40 respectivamente, tanto de forma intratumoral como peritumoral, en las diferentes variedades histopatológicas de carcinoma basocelular; así como la expresión de D2-40 en la células tumorales de los casos revisados.

ANÁLISIS DE RESULTADOS: Se evaluaron 30 laminillas con diagnóstico de carcinoma basocelular. La variedad histológica más reportada fue la infiltrante. El índice de proliferación celular Ki67 fue variable reportando porcentajes entre 40% y 70%. La media de vasos positivos para CD34 intratumoral fue de 16.67 ± 6.905 vasos y peritumoral de 28 ± 8.408 vasos; siendo la variedad histológica metatípica la que presentó mayor cantidad de vasos de forma intratumoral como peritumoral. Se demostró una densidad microvascular sanguínea (DMVS) alta hasta en el 70% de los casos, la cual se asoció a un tamaño tumoral mayor de 2 cm ($p=.018$) y a las variedades histológicas infiltrante y metatípica ($p<.05$). La media de vasos positivos para D2-40 intratumoral fue de 4.73 ± 4.556 vasos y peritumoral de 5.03 ± 4.056 vasos; siendo la variedad histológica adenoide la que presentó mayor cantidad de vasos de forma intratumoral como peritumoral. D2-40 se consideró altamente positiva dentro de las células tumorales en el 40% de los casos con un patrón predominantemente focal en el 46.7% y se correlacionó con la presencia de ulceración ($p=0.25$).

CONCLUSIONES: La densidad microvascular sanguínea y linfática pudiera proveer de información útil para distinguir subgrupos de pacientes en quienes la recurrencia y/o posible riesgo de metástasis pudiera existir de forma más frecuente. Este estudio servirá como piloto para el estudio del carcinoma basocelular, en todas sus variedades clínico-

patológicas, tomando en cuenta determinaciones inmunohistoquímicas. Es necesaria la integración de una clínica multidisciplinaria para el estudio, diagnóstico, tratamiento y prevención del carcinoma basocelular.

Palabras clave: carcinoma basocelular, densidad microvascular sanguínea, densidad microvascular linfática, CD34, podoplanina, D2-40.

I. MARCO TEÓRICO

DEFINICIÓN E HISTORIA

El carcinoma basocelular (CBC) es un tumor maligno de estirpe epitelial. Esta neoplasia se comunica frecuentemente con la capa inferior de la epidermis, sin embargo puede ser frecuente el hallazgo de células tumorales que se originan del folículo piloso¹. Aún cuando el origen del carcinoma basocelular se encuentra en disputa, se considera actualmente que se origina de las células germinativas foliculares. Ackerman et al, consideran al carcinoma basocelular como un “carcinoma tricoblástico”; sugiriendo que las células basaloides del carcinoma son análogos anormales de las células germinativas en un embrión que dan lugar a todos los componentes de la unidad folículo-sebácea-apócrina. Se considera un tumor con grado variable de infiltración, agresividad y destrucción local².

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de piel en México ocupa el segundo lugar de las neoplasias malignas, con una frecuencia de 13.6%^{3,4}. El CBC representa el tumor maligno cutáneo más frecuente, representando el 75% de todas las neoplasias de piel. Predomina en adultos mayores de 50 años (80.9% de los casos), con la mayor incidencia reportada entre la sexta y octava década de la vida. Predomina en el género masculino, en una relación 2:1 con respecto al género femenino^{5,6}.

Se han identificado factores de riesgo para su desarrollo, entre los que se encuentran: radiación ultravioleta B (290-320nm), radiación ionizante, exposición a agentes químicos (arsénico, hidrocarburos y uso tópico en genitales de mostaza nitrogenada), alteraciones inmunológicas, defectos genéticos, factores regionales, y topografías con mayor

concentración de unidades pilosebáceas.^{6,7,8}

Predomina en áreas pilosas, siendo su topografía más común hasta en el 70% de los casos, la región de cabeza y cuello; dentro de ésta topografía predomina en cara (93.8% de los casos), en especial en ala nasal (35%), párpado inferior (23%) y mejilla (15%). En ésta localización se ha demostrado que los carcinomas basocelulares se comportan de una forma más agresiva con invasión más profunda, recurrencia y metástasis regionales y distales. Su desarrollo en otras topografías, como lo es el tronco (15% de los casos), se ha vinculado a la exposición de agentes como, arsénico (variedades de CBC superficiales y múltiples) y mostaza nitrogenada tópica en genitales^{9,10}.

PATOGÉNESIS

La exposición solar y el sitio anatómico tienen un papel importante en la etiología del CBC. La exposición solar, recreacional e intermitente, es considerada un factor de riesgo significativo para el desarrollo de este tipo de tumor. Así mismo, el desarrollo de CBC, se restringe a áreas de piel con unidades pilosebáceas. El que la topografía más común del CBC sea la cara, particularmente la nariz, sugiere que ciertos sitios anatómicos contienen un número elevado de células progenitoras, que desarrollan un rol importante en la patogénesis del desarrollo de este tipo de tumores^{6,9,10}. Al igual que otras neoplasias, el CBC exhibe un potencial de crecimiento infinito sin posibilidad de regresión espontánea⁶.

PRECURSORES

El CBC se desarrolla a lo largo de muchos años, en el contexto de una exposición constante a radiación ultravioleta (UV) mutagénica, sin embargo, su comportamiento permanece indolente, siendo considerada una neoplasia que virtualmente nunca desarrolla metástasis. Las formas no agresivas de CBC, como lo son la variedad

superficial y nodular, se desarrollan de *novo* y continúan creciendo sin progresar a formas más agresivas. Las formas agresivas de CBC, como lo son la variedad morfeiforme, muestran una estabilidad genómica inusual, con un patrón persistente de crecimiento invasivo local y destrucción tisular sin progresión a enfermedad metastásica^{7,11}.

CANCER

Como se ha comentado anteriormente, el CBC es una neoplasia con características de crecimiento únicas. Su crecimiento continuo, depende del tejido conectivo específico que constituye el estroma en el que se desarrolla; siendo considerada un hipótesis que explicaría la inhabilidad del CBC para transformarse en una neoplasia metastatizante, la dependencia incondicional a un estroma producido por fibroblastos dérmicos^{7,11}.

El tejido conectivo del estroma que rodea los nidos de células de un CBC, se encuentra compuesto por fibroblastos dérmicos y fibras de colágena delgadas. La relación entre las células tumorales y las mesenquimales del estroma, semeja a la interacción entre epitelio-estroma en el desarrollo y ciclo normal del folículo piloso^{12,13}. Los receptores del factor crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se encuentran sobre-expresados en el estroma del CBC, mientras que el ligando, PDFG, se expresa primariamente en las células tumorales¹⁴. En las variedades morfeiformes o infiltrativas, el estroma exhibe abundante miofibroblastos, en contraste con las variedades nodulares; los miofibroblastos secretan factor de crecimiento de hepatocitos, lo cual promueve la invasión de las células epiteliales, a través de su unión con un receptor de tirosina quinasa (c-Met), expresado en el epitelio de las variedades morfeiformes^{13,14,15}.

La naturaleza invasiva del CBC se explica en parte, por la actividad proteolítica de este tipo de neoplasia; lo anterior se explica con la elevada expresión de enzimas (metaloproteinasas y colagenasas) en las células tumorales y estromales, las cuales

degradan el tejido dérmico pre-existente y facilitan la diseminación del tumor¹⁶.

El CBC se identifica microscópicamente, como un tumor multicéntrico, y la amplificación y secuenciación de genes demuestra que se desarrolla como una proliferación monoclonal de origen unicelular. Sin embargo, frecuentemente el CBC se encuentra constituido por subclonas^{16,17}.

La mutación más común vinculada al desarrollo de CBC, es la del gen supresor Patched1 (PTCH1), el cual se localiza en el cromosoma 9q y es parte de la vía de señalización de Hedgehog (Hh)^{17,18}. En las neoplasias en donde este gen no se encuentra alterado, se han identificado mutaciones en el receptor Smoothened (SMO), hasta en el 20% de los casos¹⁹. La sobre-expresión del gen Gli en las células, ya sea por la inactivación de PTCH o por la activación de SMO, es necesaria y suficiente para desencadenar el desarrollo de un CBC. La señalización del receptor sonic hedgehog (SHH), proteína generada por el gen PTCH, es necesaria para el crecimiento del CBC ya establecido^{19,20}.

La segunda mutación más común es la del gen supresor p53, la cual se identifica en al menos el 50% de los casos de CBC; estas mutaciones se presentan en un estadio temprano durante la carcinogénesis y se vinculan con la radiación UV^{16,18}.

En un número pequeño de CBC esporádicos, se identifican mutaciones en el locus CDKN2A y hasta en 0-30% de los casos se han identificado mutaciones en el gen *ras*^{16,18}.

ANGIOGÉNESIS

En 1992, Folkman y Shing, definieron angiogénesis como el proceso en el que la neovascularización se desarrolla a partir del endotelio de la vasculatura preexistente y es considerado un proceso indispensable para el crecimiento de tumores sólidos²¹. La neovascularización inducida por el tumor es importante para el desarrollo neoplásico y su

progresión, ya que tanto el crecimiento tumoral como la diseminación metastásica de las células tumorales depende del soporte vascular. Múltiples estudios han reportado que el número de microvasos en las áreas más intensas de neovascularización asociada al tumor, representan un indicador útil del pronóstico clínico en pacientes con tumores sólidos como mama, cabeza y cuello, próstata, ovario, estómago, pulmón y tumores melanocíticos cutáneos^{22,23,24}. En la ausencia de neovascularización los tumores sufren necrosis y/o apoptosis²⁵.

La neovascularización promueve el crecimiento tumoral al mejorar el intercambio de nutrientes, oxígeno y productos de desecho. Las células endoteliales se encuentran normalmente en un estado quiescente, con tasas de proliferación bajas y las mitosis son raramente observadas (excepto en áreas de cicatrización). La angiogénesis se inicia por dos clases de inductores: factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, FGF-2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); ambos son mediadores de importancia, que actúan de forma paracrina y estimulan la proliferación endotelial local. Las células tumorales expresan niveles elevados de FGF y VEGF. Los inhibidores de angiogénesis, como endostatina y trombospondina-1 (TSP-1), se han identificado en el plasma y matriz extracelular. Debido a que la trombospondina es activada por p53, la inactivación de éste último facilita la angiogénesis. Se concluye que el cambio hacia un fenotipo angiogénico depende del balance entre los inductores e inhibidores de angiogénesis, liberados por el tumor^{21,24,25}.

Existe evidencia de que aunado al efecto de perfusión, las células endoteliales secretan factores de crecimiento paracrinos importantes para las células tumorales y enzimas de degradación de matriz que facilitan la diseminación de las células tumorales hacia el tejido conectivo. Lo anterior en combinación con la producción de proteasas, sugiere que el endotelio activado contribuye de manera significativa en el crecimiento, invasión y

metástasis de un tumor. El grado de neovascularización requerido debe de abarcar más de 1mm y puede ser medido mediante la densidad microvascular (DMV), un incremento éste se asocia con un estadio tumoral avanzado, metástasis y peor pronóstico^{23,24,25}.

Comparado con los vasos sanguíneos, el sistema linfático se ha estudiado pobremente debido a la falta de anticuerpos específicos. Recientemente con el estudio linfangiogénesis tumoral y la aparición de nuevos marcadores marcadores, se ha sugerido que la linfangiogénesis tumoral juega un papel importante en la metástasis a ganglios linfáticos²⁶.

CLASIFICACIÓN

Las formas clínicas del CBC son¹¹:

- Exofíticas: Comprende la variedad nodular (26.7%), pseudoquística (4.6%) y vegetante (0.9%).
- Planas: Comprende la variedad superficial o pagetoide (4.1%), planocicatrizal o escleroatrófica (23%) y morfeiforme o esclerodermiforme (0.6%).
- Ulceradas (22%): Comprende la variedad ulcerada o *ulcus rodens* y la nódulo ulcerada (variedad más frecuente, representa >60% de los casos).
- Pigmentada: En un 15% las variedades nodular, superficial y plano cicatrizal pueden ser pigmentadas.
- Otras variedades: CBC gigante, CBC lineal, CBC polipide y fibroepitelioma de Pinkus.

INVASIÓN PERINEURAL.

La invasión perineural del CBC, ocurre en el 0.1-1% de los casos y se asocia con las siguientes características: antecedente de tumor recurrente o tratamiento previo con radioterapia, y topografía como la región preauricular o mejilla. Los factores de riesgo reconocidos son: género masculino, mayor diámetro horizontal y variantes histopatológicas agresivas como: variedad infiltrativa y micronodular²⁸.

METÁSTASIS

Como se mencionó previamente, se considera que virtualmente el CBC, nunca metastatiza, sin embargo, se han reportado casos en la literatura, estimando una incidencia de 1:1000 a 1:35,000 de metástasis; lo anterior se ha explicado como producto de la diseminación perineural y vascular que presentan algunos tumores agresivos^{1,6,7}. La progresión más común identificada, en la metástasis a los ganglios linfáticos, seguido por su diseminación al pulmón y huesos^{6,7,10}.

HISTOPATOLOGÍA

La histopatología de un CBC se caracteriza por la presencia de masas, cordones y/o islotes de células basaloides. El núcleo de estas células se caracterizan por ser grandes, ovalados o elongados, similares a los de las células basales de la epidermis, sin embargo, difieren en que la relación núcleo-citoplasma es mayor y carecen de puentes intercelulares^{2,11}. El citoplasma se caracteriza por ser escaso e impreciso. La proliferación muestra disposición en empalizada hacia la periferia. Las células de dicha proliferación pueden mostrar atipia y mitosis variables. Se identifica retracción del estroma circundante, formando lagunas peritumorales, que se caracterizan por disminución en las fibras de anclaje y de colágena, y un aumento en el depósito de mucopolisacáridos. El estroma que

circunda a dicha proliferación, puede tener aspecto mucinoso, edematoso o fibroso; así mismo se identifican grados variables de reacción inflamatoria²⁷.

La clasificación histopatológica ideal del CBC debería basarse en subtipos que correlacionaran con el comportamiento clínico y el tratamiento requerido para su manejo. Existen 2 abordajes de clasificación para el estudio de CBC; uno basado en el patrón de crecimiento histopatológico, y el otro en base a su diferenciación histológica^{2,27}.

La clasificación por patrón de crecimiento, guarda una mayor significancia biológica y contribuye al concepto de subtipos histológicos de bajo y alto riesgo. Este último se caracteriza por un incremento en la posibilidad de extensión subclínica y/o excisión incompleta y/o comportamiento local agresivo y/o recurrencia local. Dentro de esta clasificación se identifican las variedades^{11,27}:

- Nodular: Subtipo de menor riesgo. Incorpora otras variantes histológicas como la noduloquística, en la cual se forman espacios debido a la acumulación de mucina; así como las variantes con diferenciación folicular y formación de quistes de queratina. En raras ocasiones, el fibroepitelioma de Pinkus se reconoce como un subtipo de bajo riesgo con patrón de crecimiento diferente.
- Superficial: Previamente se denominaba erróneamente como multicéntrico o multifocal. Subtipo de alto riesgo. Se asocia con riesgo elevado de recurrencia debido a una elevada tendencia de excisión primaria incompleta.
- Infiltrante/morfeiforme: Subtipo de alto riesgo. Se asocia con un comportamiento de invasión local agresivo. Ambos se caracterizan por grupos de células tumorales con apariencia puntiaguda. La variedad morfeiforme de un CBC infiltrante se caracteriza por la presencia de un estroma fibroso.

- Micronodular: Subtipo de alto riesgo. Se caracteriza por islas de células tumorales de apariencia redonda y que miden menos de 0.15mm. Esta variedad presenta mayor riesgo de extensión subclínica.

Los subtipos por patrón de crecimiento deben reportarse si cualquier subtipo constituye 50% o más de la lesión y/o cuando el subtipo de alto riesgo constituye el componente de invasión o se encuentra en proximidad con el margen de resección^{2,11,27}.

La clasificación del CBC en base a su diferenciación histológica, se ha vuelto menos útil. Se han identificado hasta 20 subtipos²⁹.

- Indiferenciados: comprende la variedad sólida, ya sea circunscrita (69.5% de los casos) o infiltrante; así como las variedades morfeiformes, fibroepitelial, y superficial.
- Diferenciados: Presentan cierto grado de diferenciación hacia los anexos cutáneos: elementos capilares o glandulares (sebáceos, apócrinos o ecrinos); pudiendo haber diferenciación hacia más de un tipo diferente de anexo. Comprende la variedad queratósica (pelo), quística (glándula sebácea) y adenoide (glándula sudorípara).
- Variante inusual: comprende la variedad adamantoide, de células claras, granular y con diferenciación hacia la matriz.

El carcinoma basoescamoso es un término en controversia, que se emplea para describir:

1. un tumor de colisión, constituido por carcinoma basocelular y carcinoma escamoso; 2. CBC queratósico y folicular; 3. CBC metatípico. A pesar, de dicha controversia, existe evidencia de que el CBC asociado con atipia escamosa moderada/severa o malignidad escamosa, se asocia a mayor incidencia de recurrencia y diseminación metastásica. La presencia de atipia escamosa en menor cantidad, es inusual en el CBC que muestra diferenciación folicular, y no representa ninguna significancia biológica^{11,27}.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHQ) constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología. Se trata de un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos utilizando anticuerpos marcados^{30,31}. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a los correspondientes antígenos, y la reacción se hace visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración^{30,31,32}.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y los sustratos más comunes son la diaminobenzidina (color marrón), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario, o indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A^{30,32}.

- Descripción del índice proliferativo Ki67

Es una proteína nuclear implicada en la regulación de la proliferación celular, que únicamente se expresa en las células que están en fase de proliferación o de mitosis, principalmente es células epiteliales y en mucha menor medida en las células inflamatorias. Se identifica durante todas las fases del ciclo celular, excepto en el G0 e inicialmente en el G1. Se expresa más concretamente en las fases proliferativas G1 tardía, S, G2 y M^{33,34}.

La primer descripción de esta proteína fue realizada por Gedes et al, (1983) quienes

describieron un anticuerpo monoclonal de ratón, el Ki-67, que reaccionaba con un antígeno nuclear de células en proliferación activa. Sus estudios experimentales en células estimuladas con mitógenos demostraron que el anticuerpo reconocía un antígeno presente en todas las fases del ciclo de división celular (G1, S, G2, M)^{33,34}.

La inmunotinción con Ki-67 revelaba una actividad nuclear en varios linajes de células humanas en división celular activa (células corticales del timo, células germinales del centro de folículos corticales, células de la región del cuello de la mucosa gástrica, espermatogonias indiferenciadas) y por el contrario, carecía de efecto en las células bien diferenciadas (linfocitos, monocitos, hepatocitos, células renales, células parietales de la mucosa gástrica y células cerebrales)^{35,36,37}. La expresión del antígeno reaparecía en linfocitos tras ser estimulados con un mitógeno (fitohematoglutina) y desaparecía en las células HL-60 inducidas a diferenciarse a macrófagos maduros por exposición a ésteres de forbol. Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de utilizar el antígeno Ki-67 para valorar la fracción de crecimiento, es decir, la proporción de células que se están dividiendo en un tumor³⁵.

Estudios con doble inmunofluorescencia han confirmado que durante la mayoría de la interfase el antígeno Ki-67 se localiza dentro del nucléolo. En la fase G1 precoz se sitúa en un gran número de focos repartidos en el nucleoplasma que se extienden hasta la envoltura nuclear. Durante la mitad de la fase G1 precoz, el antígeno se encuentra asociado con el nucléolo en unas regiones distintas a los dominios que contienen los mayores antígenos nucleolares (fibrilarina y RNA polimerasa I)³³⁻³⁷. En el nucléolo ya maduro el Ki-67, se localiza en los dominios que contienen fibrilarina o B23/nucleofosmina y está ausente en regiones que poseen RNA polimerasa I. Cuando se induce la ruptura del nucleólo se observa la translocación del antígeno a focos nucleoplásmicos carentes de fibrilarina o RNA polimerasa I. Así, aparentemente el Ki-67 se encuentra en regiones

del componente fibrilar denso del nucléolo deficientes en fibrilarina³³⁻³⁷.

- Descripción del anticuerpo CD34

El CD34 es una sialomucina cuya síntesis está codificada por un gen situado en el cromosoma 1q32. Se encuentra en las células endoteliales, en células precursoras del sistema hematopoyético y en fibroblastos dendríticos. Se emplea principalmente como marcador endotelial y en el diagnóstico diferencial de tumores de partes blandas. Se expresa en el 90% de las neoplasias endoteliales benignas o malignas, siendo un marcador muy sensible para identificar las células neoplásicas del sarcoma de Kaposi y diferenciarlo de lesiones de pseudokaposi en la acroangiodermatitis secundaria a insuficiencia venosa crónica de las extremidades inferiores^{30,38}. Sin embargo, la expresión de CD34 no es exclusiva de proliferaciones de células endoteliales, ya que también se observa positividad en las células neoplásicas del sarcoma epiteliode, el dermatofibrosarcoma protuberans (resultando de utilidad para el diagnóstico diferencial histopatológico con el dermatofibroma), en el fibroma dérmico en placa (previamente denominado hamartoma en medallón), el leiomiosarcoma, el lipoma de células fusiformes, el tumor fibroso solitario, la pápula fibrosa nasal, el neurofibroma, la fibromatosis extraabdominal y otras muchas proliferaciones de estirpe no endotelial. En dermatopatología se ha propuesto también su utilidad para diferenciar histopatológicamente un tricoblastoma de un carcinoma basocelular³⁹.

- Descripción del anticuerpo de podoplanina (D2-40)

La podoplanina es una glicoproteína transmembrana tipo mucina de 38kd descrita por primera vez en el endotelio linfático pero no en el de vasos sanguíneos, cuyo epítipo resistente a formalina es reconocido por el anticuerpo monoclonal D2-40. El anticuerpo monoclonal D2-40 se desarrolló inicialmente para reconocer el antígeno M2A, el cual es

una glicoproteína oncofetal expresada por las células germinales de neoplasias testiculares. Debido a que M2A tiene alta sensibilidad y especificidad para marcar células endoteliales linfáticas pero no las sanguíneas, se ha utilizado método histopatológico diagnóstico de rutina para evaluar la linfangiogénesis de forma separada y más objetiva que la angiogénesis y para determinar si el crecimiento de algún tumor involucra el sistema linfático^{30,40}. Aunque muchas de las funciones de la podoplanina no se conocen totalmente, se ha probado que interviene en la migración de células tumorales, invasión, metástasis, progresión maligna, agregación plaquetaria y formación y reparación de tejido. La podoplanina parece mediar la invasión tumoral mediante el remodelamiento de la actina en el citoesqueleto de las células tumorales. Este efecto puede deberse por el incremento en la fosforilación de la proteína ERM y/o por el incremento de la actividad Rho GTPasa. De tal forma que aunque la expresión de D2-40 se encuentra restringida a vasos linfáticos normales y asociados a tumores, la extensión de la linfangiogénesis es considerado actualmente un novedoso predictor de metástasis a ganglios linfáticos distantes y centinela en pacientes con melanoma cutáneo^{41,42}.

La podoplanina se ha expresado en células tumorales de varios cánceres como el carcinoma epidermoide (cavidad oral, esófago, laringe, pulmón, cervix y piel), neoplasia sebáceas, mesoteliomas, tumores de células germinales, tumores del sistema nervioso central y algunos tipos de tumores vasculares (hemangioblastomas, angiosarcomas, sarcoma de Kaposi, linfangiomas)^{40,41,42}.

Este marcador se ha expresado no sólo en las células endoteliales linfáticas, sino en células tumorales y en el epitelio hiperplásico o displásico adyacente a tumores, lo que hace manifiesto su rol en la progresión tumoral y sugiere un papel en el proceso de diferenciación de ciertas neoplasias epiteliales. Otras áreas que se han mostrado reactivas a este marcador son algunas células basales de la epidermis, de la vaina

radicular externa del folículo y de infundíbulo, así como en las células germinales periféricas de la glándulas sebáceas^{30,40-43}.

PRONÓSTICO

Los factores de riesgo que incrementan la incidencia de recurrencia de CBC son:

- Clínicos^{1,7}:
 - Sexo masculino
 - Edad de presentación: mayor de 60 años.
 - Fotosensibilidad
 - Inmunosupresión.
 - Topografía centrofacial: canto interno, nariz y área preauricular.
 - Tamaño tumoral: > 2cm. Tasas de recurrencia incrementan un 7% por cada milímetro de incremento en el diámetro del tumor.
 - Bordes poco definidos clínicamente.
- Histopatológicos^{27,28}:
 - Patrón de crecimiento agresivo: morfeiforme, infiltrante y micronodular.
 - Datos histopatológicos: invasión perineural y perivascular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CBC es considerado el tumor maligno cutáneo más frecuente, representando el 75% de todas las neoplasias de piel. La angiogénesis presente en dicha neoplasia, difiere entre las variedades no agresivas y agresivas; mientras que la linfangiogénesis ha sido pobremente estudiada. La relación entre la densidad microvascular sanguínea y linfática, y el grado de agresividad de las variantes histopatológicas, permitirán entender el

comportamiento biológico de este tipo de proliferación y prevenir la destrucción local de tejidos o la progresión a una enfermedad avanzada.

JUSTIFICACIÓN.

Se busca realizar el primer estudio en México, que evalúe la relación entre el perfil angiogénico (densidad microvascular sanguínea) y linfangiogénico (densidad microvascular linfática) presente en las diferentes variedades histopatológicas de CBC, con el fin de mejorar las especificaciones del abordaje quirúrgico y justificar la investigación de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en la inhibición de la vía de angiogénesis y linfangiogénesis.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

OBJETIVO GENERAL

Medir la expresión del índice proliferativo ki67 y determinar la densidad de la microvasculatura sanguínea (mediante la positividad de CD34) y linfática (mediante la positividad de podoplanina) en los casos de carcinoma basocelular, revisados en el Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" en el periodo de tiempo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar el género, edad, topografía, diagnóstico clínico y tiempo de evolución de la neoplasia al momento de la toma de biopsia.
- Identificar el subtipo histopatológico de cada uno de los casos.
- Determinar la expresión en porcentaje del Ki67 en cada una de las variables histopatológicas de carcinoma basocelular.
- Determinar la densidad microvascular sanguínea a través de la expresión positiva

de CD34 en los vasos sanguíneos intratumorales y peritumorales.

- Determinar la densidad microvascular linfática a través de la expresión positiva de podoplanina en los vasos sanguíneos intratumorales y peritumorales.
- Determinar la expresión de podoplanina por las células tumorales.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las variedades histopatológicas de CBC de alto riesgo expresan una mayor densidad microvascular sanguínea y linfática que las variedades de CBC de bajo riesgo.

II. MATERIAL Y MÉTODO

METODOLOGÍA

DISEÑO Y DURACIÓN.

Se realizará un estudio observacional, descriptivo y transversal. La duración del estudio comprenderá el tiempo requerido para analizar 30 laminillas, con diagnóstico histopatológico de carcinoma basocelular, que fueron recibidas y revisadas en el periodo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017.

DEFINICIÓN DEL UNIVERSO DE ESTUDIO

Laminillas con diagnóstico de carcinoma basocelular que fueron revisados en el servicio de Dermatología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

TAMAÑO DE LA MUESTRA Y MÉTODO DE MUESTREO

Pacientes con carcinoma basocelular diagnosticados en el Servicio de Dermatopatología de este hospital, en el periodo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017. En base a la estimación de que la proporción esperada de carcinoma basocelular en la población general es del 75% de todos los casos de cáncer de piel ($P1=0.75$) y considerando que se trata de un estudio que involucra la utilización de inmunohistoquímica, cuyo costo por unidad es elevado, se obtuvo un presupuesto limitado que permitió únicamente la evaluación de 30 laminillas ($OR=30$). Se llevará a cabo un método de muestreo no probabilístico, de casos consecutivos que cumplan con los criterios de selección, hasta alcanzar el tamaño de la muestra.

CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS CASOS

Inclusión

1. Pacientes cuyas laminillas, bloque y expediente se encuentre disponible para su revisión y realización de inmunohistoquímica.

No inclusión

1. Pacientes cuyo expediente no se encuentre disponible para su revisión.
2. Pacientes cuyo bloque tenga muestra insuficiente para la realización de inmunohistoquímica.
3. Pacientes que hayan solicitado su bloque para ser referidos a otra institución.

DEFINICIÓN OPERATIVA DE VARIABLES CLÍNICA Y UNIDADES DE MEDIDA .

VARIABLE	CATEGORÍA	ESCALA	UNIDAD DE MEDICIÓN	OPERACIONALIZACIÓN
Edad	Cualitativa	Nominal	1: 40-50 años 2: 51-60 años 3: 61-70 años 4: 71-80 años 5: >80 años	Años cumplidos al momento de la inclusión al estudio.
Género	Cualitativa	Nominal	1: Femenino 2: Masculino	Fenotipo sexual
Tiempo de evolución	Cualitativa	Nominal	1: ≤ 2 años 2: 3 a 4 años 3: ≥ 5 años	Tiempo transcurrido desde la aparición de la lesión hasta el momento del diagnóstico.
Topografía	Cualitativa	Nominal	1: frente 2: párpado inferior 3: nasal 4: mejilla 5: labio superior 6: tronco	Topografía de afección.
Subtipo clínico	Cualitativa	Nominal	1: Nodular 2: Superficial 3: Verrugoso 4: Nodular pigmentado 5: Nodular ulcerado 6. CEC 7. Sin diagnóstico	Variedad clínica de CBC que predomina.
Tamaño del tumor	Cuantitativa	Nominal	1: ≤ 2 cm 2: >2cm	Diámetro en centímetros de la lesión.

DEFINICIÓN OPERATIVA DE VARIABLES HISTOPATOLÓGICA Y UNIDADES DE MEDIDA .

VARIABLE	CATEGORÍA	ESCALA	UNIDAD DE MEDICIÓN	OPERACIONALIZACIÓN
Clasificación según patrón de crecimiento.	Cualitativa	Nominal	1: Nodular 2. Superficial 3. Infiltrante 4. Adenoide 5. Metatípico	Variedad histopatológica de CBC en función de su patrón de crecimiento.
Grado de invasión	Cualitativa	Nominal	1: sin invasión; 2: invasión perivascular; 3: invasión perineural; 4: ambas.	Datos que sugieren invasión perineural y/o perivascular.
Expresión de Ki67	Cualitativa	Nominal	1: 0-10% 2: 11-25% 3: 26-50% 4: >51%	Porcentaje de expresión de la proteína Ki-67 mediante la técnica de inmunoperoxidasa.

CD34 intratumoral (IT)	Cuantitativa	Numérica	Número de vasos positivos en área "hot spot"	Número de vasos positivos para CD34 dentro de la masa tumoral
CD34 peritumoral (PT)	Cuantitativa	Numérica	Número de vasos positivos en área "hot spot"	Número de vasos positivos para CD34 a un campo de alto poder desde el límite tumoral
Densidad microvascular sanguínea (DMVS)	Cuantitativa	Nominal	1: ≤ 33 microvasos 2: > 33 microvasos	DMVS baja (≤ 33 microvasos) o alta (> 33 microvasos).
D2-40 intratumoral (IT)	Cuantitativa	Numérica	Número de vasos en área "hot spot"	Número de vasos positivos para D2-40 dentro de la masa tumoral
D2-40 peritumoral (PT)	Cuantitativa	Numérica	Número de vasos en área "hot spot"	Número de vasos positivos para D2-40 a un campo de alto poder desde el límite tumoral
D2-40 en las células tumorales	Cuantitativa	Nominal	1: ≤ 7 2: > 7	D2-40 en las células tumorales baja (≤ 7) y alta (> 7).
Patrón de reactividad de D2-40 en las células tumorales.	Cualitativa	Nominal	1: difuso 2: Focal	Difuso (afección central de las células basaloides en $> 25\%$) o focal (afección periférica de las células basaloides sin afección central en 1-25%).

PROCEDIMIENTO

1. Se realizó una búsqueda exhaustiva de las laminillas y bloques de 30 casos registrados de carcinoma basocelular en el Servicio de Dermatopatología en el período comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017.
2. Los tejidos se fijaron en un buffer neutral de formol y se colocaron en un bloque de parafina para procesamiento histológico. Se realizaron cortes de 5 micras a los bloques y se realizó tinción con hematoxilina y eosina y tinción de inmunohistoquímica en un contenedor automático DAKO empleando la técnica estándar de complejo de peroxidasa avidin-biotin. Se realizó la recuperación del epítipo inducida por calor como pre-tratamiento para marcadores específicos. El

cromógeno, diaminobenzidina, se utilizó para localización del antígeno. El anticuerpo empleado fue la proteína D2-40 (dilución 1:200) y CD 34 (dilución 1:50). Se utilizaron como controles positivos: 1. linfangiomas para mostrar el endotelio linfático positivo para D2-40 y negatividad para CD34. 2. Hemangioma capilar para mostrar el endotelio vascular sanguíneo positivo para CD34 y negatividad para D2-40.

3. Se revisó el expediente clínico para recolectar ficha de identificación del paciente: edad y género de los pacientes.
4. Se revisó el expediente clínico para recolectar información clínica: tiempo de evolución, topografía, variedad clínica y tamaño del tumor.
5. Se describió la variedad histológica de cada uno de los carcinomas basocelulares y presencia o ausencia de datos de invasión perineural y perivascular.
6. Se determinó la expresión en porcentaje del Ki67 en cada una de las variables histopatológicas de carcinoma basocelular.
7. Detección microvascular y conteo.

7.1 La densidad microvascular sanguínea (DMVS) expresada por la positividad de CD34, se evaluó mediante la técnica de "hot spot", en la que cada muestra fue examinada a 10x para identificar la región con el mayor número de microvasos. Dentro de esta área a 200x se evaluó un campo por 2 observadores independientes. La positividad del anticuerpo CD34 se evaluó mediante su expresión en el citoplasma de las células endoteliales de vasos sanguíneos. Un vaso se definió como cualquier célula endotelial marcada separada de microvasos adyacentes, células tumorales y otros elementos del tejido conectivo; la presencia de lumen no se requirió para identificar los vasos. Los eritrocitos no se emplearon para definir los vasos sanguíneos. Los vasos dentro de la masa tumoral rodeados por células tumorales fueron consideradas

como intratumorales (IT) . Los vasos a un campo de alto poder desde el límite tumoral se considerarán como peritumorales (PT); dentro de este concepto se excluyeron aquellos vasos que se encontraban a más de un campo de alto poder del límite tumoral. Utilizando la media de las series descritas (33 vasos por 2.22 mm²), los tumores se identificaron con una densidad microvascular sanguínea (DMVS) baja (≤ 33 microvasos) o alta (> 33 microvasos).

7.2 La densidad microvascular linfática (DMVL) expresada por la positividad de D2-40 se evaluó mediante la técnica de "hot spot", en la que cada muestra fue examinada a 10x para identificar la región con el mayor número de microvasos. Dentro de esta área a 200x se evaluó un campo por 2 observadores independientes. Se cuantificó el número de vasos linfáticos positivos para D2-40 (expresión en el citoplasma de las células endoteliales) con un lumen visible, claramente separados de microvasos adyacentes y otros componentes del tejido conectivo. Vasos aglomerados fueron considerados como unidad. Los vasos dentro de la masa tumoral rodeados por células tumorales fueron consideradas como intratumorales (IT) . Los vasos a un campo de alto poder desde el límite tumoral se considerarán como peritumorales (PT); dentro de este concepto se excluyeron aquellos vasos que se encontraban a más de un campo de alto poder del límite tumoral. La densidad microvascular linfática (DMVL) se definió como el promedio del número de vasos positivos para D2-40 en 10 campos identificados por la técnica de "hot spot" (región con el mayor número de microvasos)

7.3 Para evaluar la expresión de podoplanina dentro de las células tumorales del carcinoma basocelular, se utilizó un sistema de clasificación como el empleado por Parhar et al, y Yun et al, basado el puntaje de inmunoreactividad (IRS) de Remmele y Stegner. De acuerdo al anterior la intensidad del marcaje se divide

en: 0-negativa, 1-débil positiva, 2-moderado positivo y 3-fuerte positiva. La extensión de la expresión se cuantificó evaluando el porcentaje de positividad en relación con el área total del tumor. El puntaje se distribuyó de la siguiente manera: 0-reactividad de 1-10%; 1-reactividad de 11-30%; 2- reactividad de 31-50%; 3-reactividad del 51-80%; 5-reactividad del 81-100%. El puntaje de inmunoreactividad final se obtuvo multiplicando la intensidad por la extensión alcanzando rangos de 0 a 15. Un IRS de 0-7 se consideró como baja reactividad y un puntaje de 7 o mayor se consideró como reactividad alta. Se describieron 2 patrones de reactividad en las células tumorales: difuso (afección central de las células basaloideas en >25%) o focal (afección periférica de las células basaloideas sin afección central en 1-25%).

8. Se analizaron los datos con medidas de tendencia central (media, mediana, moda), proporciones y de dispersión (desviación estándar).
9. Se presentaron los resultados en forma de tablas y gráficas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron estadísticamente de forma descriptiva con medidas de tendencia central (media y mediana) proporciones y medidas de dispersión (desviación estándar). Se evaluó la correlación mediante el método estadístico de Pearson entre la expresión de Ki67, la densidad microvascular sanguínea y linfática con la variedad histológica de CBC. Y mediante el método de análisis multivariado ANOVA la expresión del CD34 y podoplanina intratumoral y peritumoral; así como la expresión de podoplanina por las células tumorales.

Para la captura de datos se utilizará el programa de Excel de Microsoft Office y para el análisis estadístico el programa SPSS versión 22 de IBM. Los datos se presentarán en

tablas y gráficas.

ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación está catalogada como “sin riesgo”, según el Artículo 17 del reglamento, en el Capítulo I del Título Segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Por lo que no se realizará consentimiento informado.

RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se pretende realizar el primer estudio en nuestro país que evalúe la relación entre la densidad microvascular sanguínea y linfática en las diferentes variedades histopatológicas de CBC.

Este trabajo representa la tesis de la Dra. Isabela Pérez Prieto, residente de la Especialidad de Dermatopatología.

Publicación de los resultados obtenidos y presentación en congresos de la especialidad de los mismos.

RECURSOS

HUMANOS:

- Tesista: Dra. Isabela Pérez Prieto.
- Directora de tesis: Dra. Patricia Mercadillo Pérez.

MATERIALES

- Fuente de inclusión de participantes:
 - Base de datos y laminillas almacenadas en el servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

- Microscopio Axiophot-2 Karl Zeiss.
- Computadora laptop MacBook Air.
- Programa de Excel de Microsoft Office y programa SPSS versión 22 de IBM.

FINANCIEROS

- Costo de la realización de la inmunohistoquímica cubierto por el Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

III. RESULTADOS

Se estudiaron 30 laminillas de las cuales 17 (56.7%) pertenecían a pacientes de género femenino y 13 (43.3%) al género masculino (Figura 1). Los grupos de edades reportados fueron: 4 (13.3%) correspondientes a las edades entre 40 y 50 años; 5 (16.7%) entre 51 y 60 años; 5 (16.7%) entre 61 y 70 años; 8 (26.7%) entre 71 y 80 años; y 8 (26.7%) más de 80 años (Figura 2). Reportándose una media de edad de 69.23 años \pm 13.878, con una mínima de edad de 45 años y una máxima de 90 años.

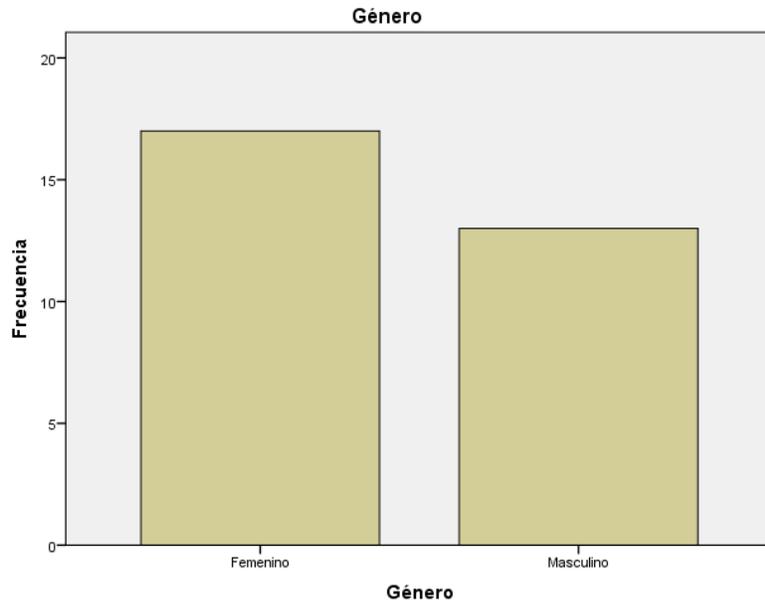


Figura 1. Género de los pacientes

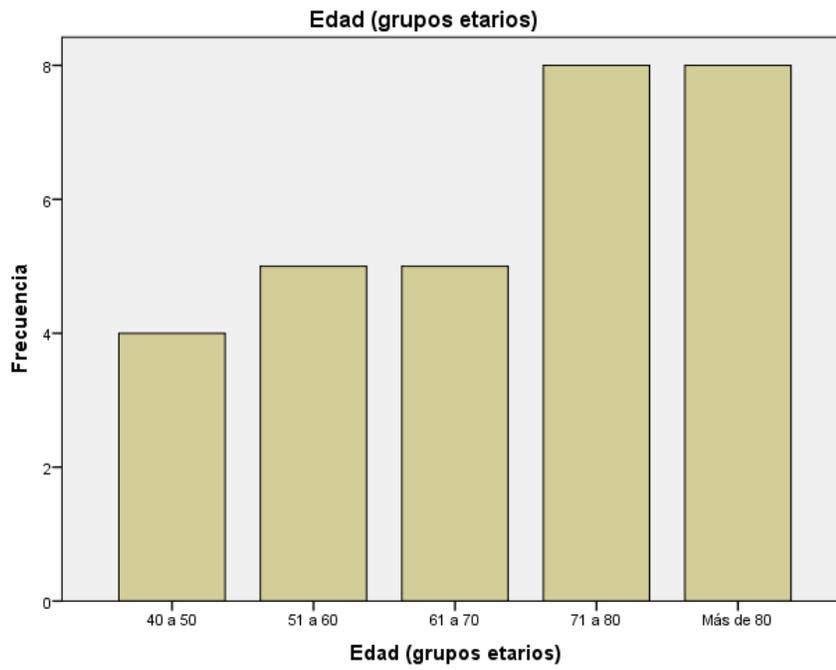


Figura 2. Edad de los pacientes

El tiempo de evolución de la lesión reportado en el expediente fue: menor o igual a 2 años en 11 casos (36.7%); entre 3 y 4 años en 11 casos (36.7%); y mayor o igual a 5 años en 8 casos (26.7%) (Figura 3). Las topografía más común fue la nariz en 12 casos (40%); otras topografías reportadas fueron frente en 2 casos (6.7%), párpado superior en 4 casos (13.3%), labio superior en 4 casos (13.3%), mejilla en 6 casos (20%), tronco en 2 casos (6.7%) (Figura 4). El diagnóstico clínico más común con el que fueron enviadas las muestras fue carcinoma basocelular nodular en 12 casos (40%); otras variedades clínicas reportadas fueron superficial en 5 casos (16.7%), verrugoso en 1 caso (3.3%), nodular pigmentado en 7 casos (23.3%), nodular ulcerado en 1 caso (3.3%), carcinoma epidermoide en 3 casos (10%) y no se reportó diagnóstico en 1 caso (3.3%). En 10 casos (33.3%) el tamaño de la lesión reportada fue menor o igual a 2cm y en 20 casos (66.7%) el tamaño fue mayor de 2cm (Figura 5).

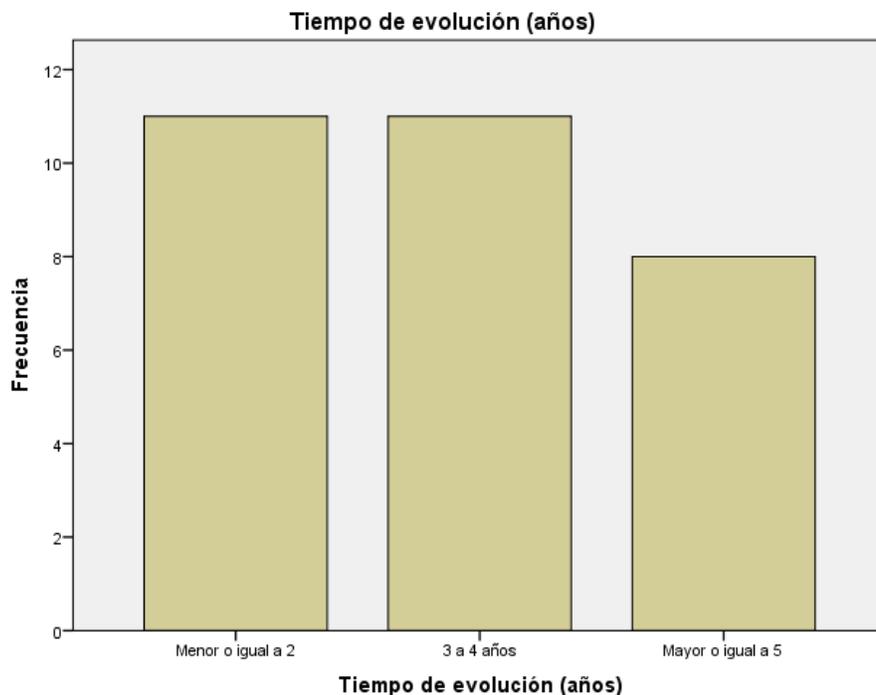


Figura 3. Tiempo de evolución de la lesión

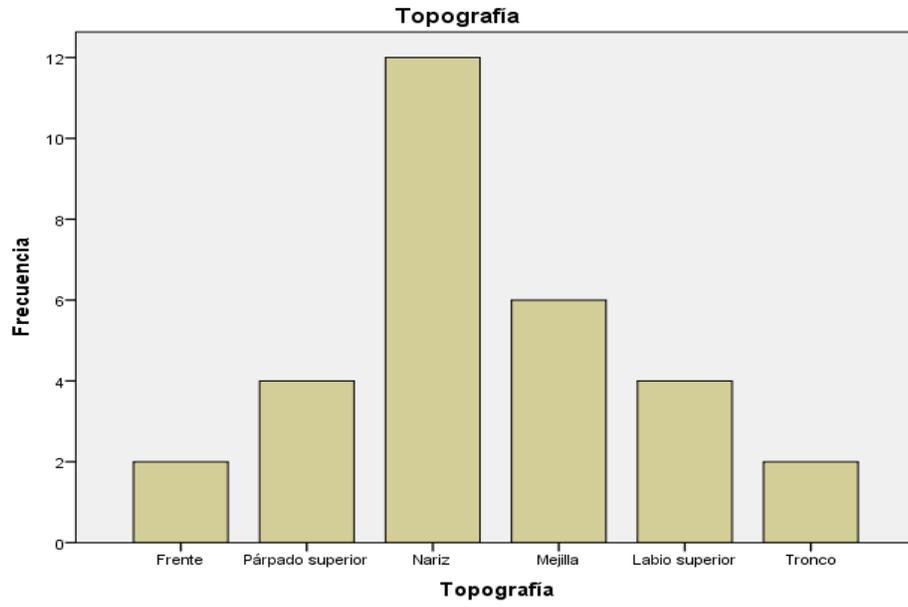


Figura 4. Topografía de la lesión

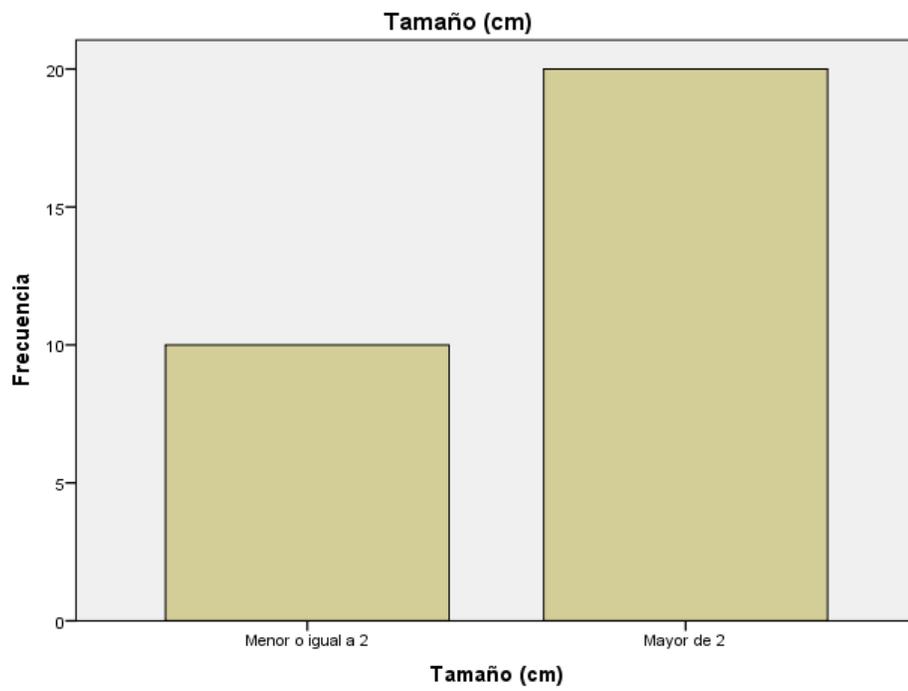


Figura 5. Tamaño de la lesión

El análisis histopatológico reportó los siguiente datos. La variedad histopatológica más común fue la infiltrante en 13 casos (43.3%); otras variedades reportadas fueron: nodular en 5 casos (16.7%), adenoide en 6 casos (20%), metatípico en 6 casos (20%) (Figura 6). La presencia de ulceración se reportó en 17 casos (56.7%) (Figura 7). En ninguno de los 30 casos se reportó invasión perinerual o perivascular. Los porcentajes de Ki67 reportados fueron 5% en 1 caso (3.3%), 10% en 3 casos (10%), 20% en 3 casos (10%), 30% en 3 casos (10%), 40% en 6 casos (20%), 50% en 4 casos (13.3%), 60% en 9 casos (30%), y 70% en 1 caso (3.3%) (Figura 8).

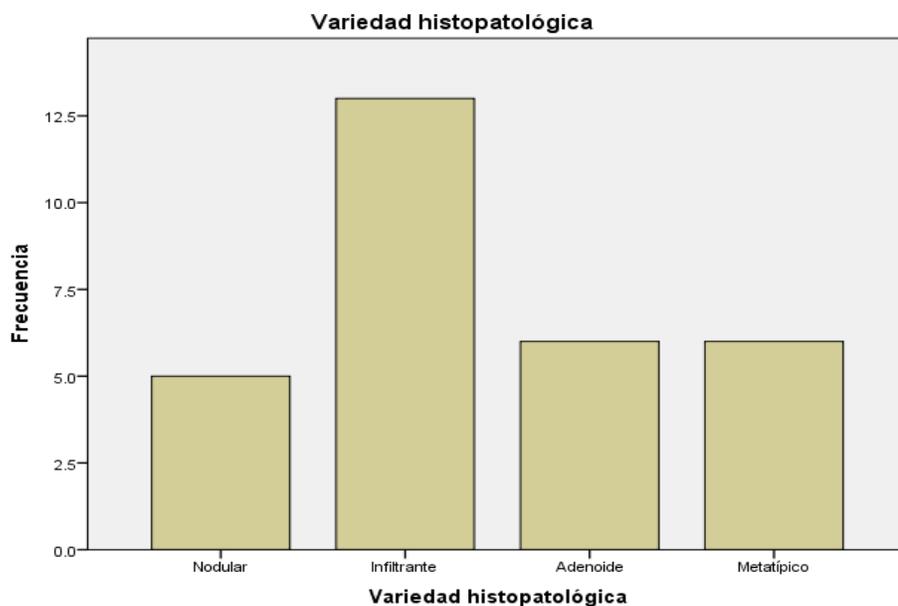


Figura 6. Variedades histológicas reportadas.

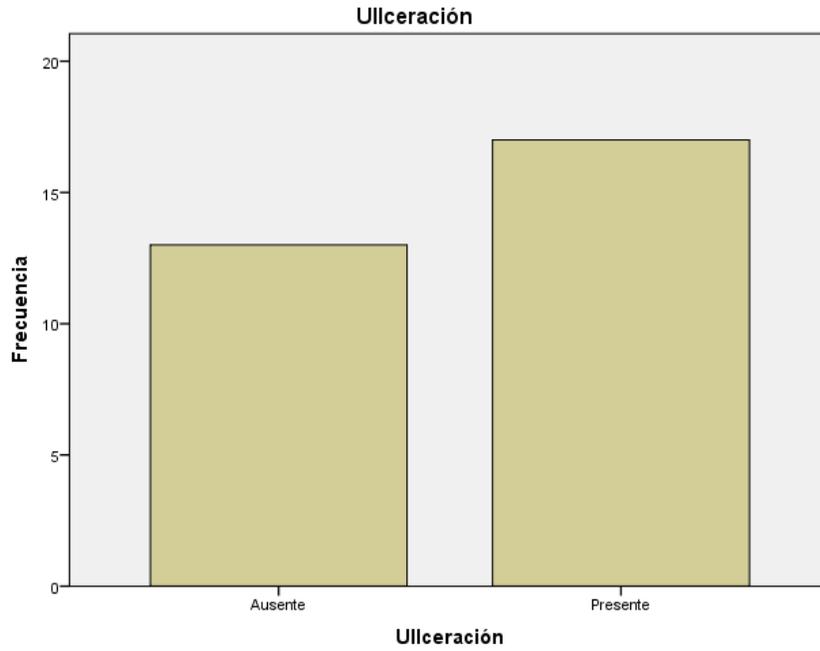


Figura 7. Ulceración en el análisis histológico.

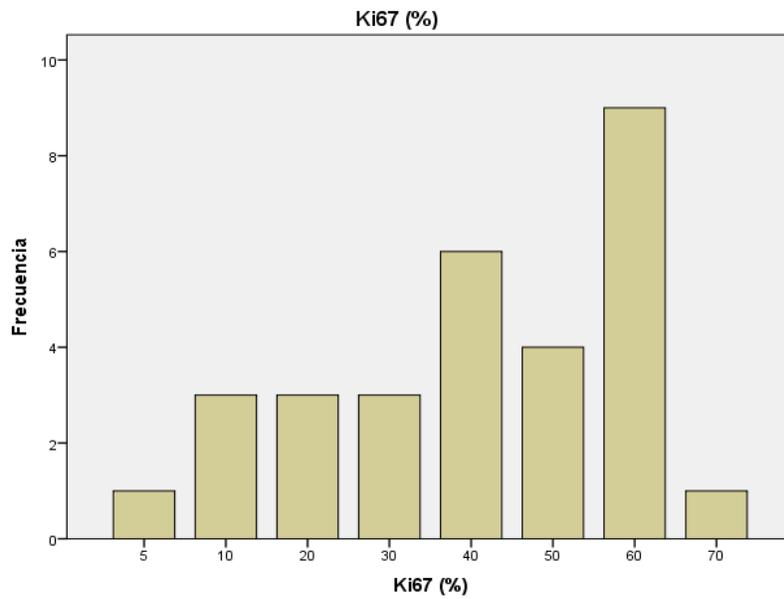


Figura 8. Expresión en porcentaje de Ki67 en la masa tumoral

La inmunotinción CD34 para determinar el número de vasos sanguíneos, se reportó positiva dentro de la masa tumoral con una media de 16.67 ± 6.905 vasos, con un mínimo de vasos de 2 y un máximo de 32 (Tabla 1).

		Edad (años)	CD34 intratumoral (número de vasos)
N	Válido	30	30
	Perdidos	0	0
Media		69.23	16.67
Mediana		72.50	16.00
Moda		50 ^a	13
Desviación estándar		13.878	6.905
Mínimo		45	2
Máximo		90	32
Percentiles	25	55.50	12.75
	50	72.50	16.00
	75	81.00	20.75

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

Tabla 1. Expresión positiva de CD34 dentro de la masa tumoral

La media de vasos sanguíneos intratumorales positivos en cada variedad histopatológica fue: nodular 12.80 ± 4.438 vasos; infiltrante 16.62 ± 5.393 vasos; adenoide 11 ± 4.733 vasos; y metatípico 25.67 ± 4.227 vasos (Figura 9). No existió una correlación estadísticamente significativa entre un número mayor de vasos sanguíneos intratumorales y la variedad histopatológica del tumor.

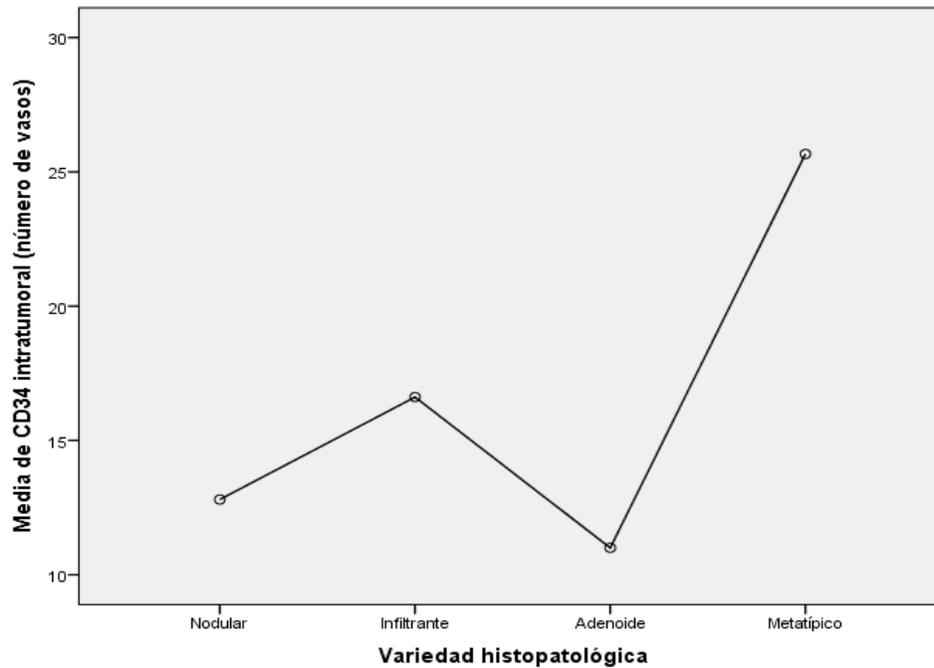


Figura 9. Expresión media de CD34 intratumoral en cada variedad histológica de CBC.

La positividad para CD34 alrededor de la masa tumoral fue positiva con una media de 28 \pm 8.408, con un mínim de 15 vasos y un máximo de 45 (Tabla 2).

		Edad (años)	CD34 intratumoral (número de vasos)	CD34 peritumoral (número de vasos)
N	Válido	30	30	30
	Perdidos	0	0	0
Media		69.23	16.67	28.00
Mediana		72.50	16.00	29.00
Moda		50 ^a	13	18
Desviación estándar		13.878	6.905	8.408
Mínimo		45	2	15
Máximo		90	32	45
Percentiles	25	55.50	12.75	19.50
	50	72.50	16.00	29.00
	75	81.00	20.75	35.25

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

Tabla 2. Expresión positiva de CD34 peritumoral

La media de vasos peritumorales positivos en cada variedad histopatológica fue: nodular 22.80 ± 12.558 vasos; infiltrante 29.31 ± 7.443 vasos; adenoide 25.67 ± 8.311 vasos; y metatípico 31.83 ± 5.115 vasos (Figura 10). No existió una correlación estadísticamente significativa entre un número mayor de vasos sanguíneos peritumorales y la variedad histopatológica del tumor.

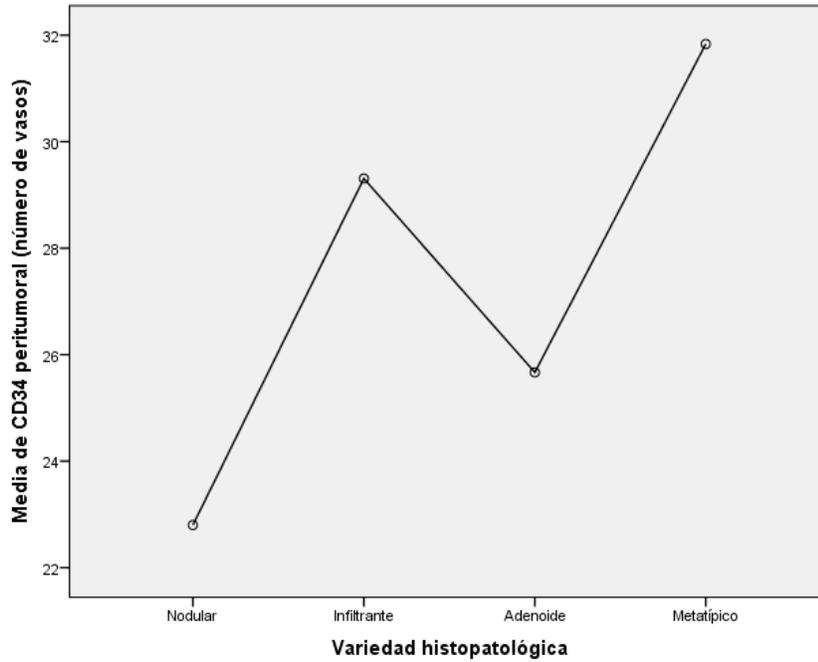


Figura 10. Expresión media de CD34 peritumoral en cada variedad histológica de CBC.

La DMVS se reportó como baja (≤ 33 microvasos) en 9 casos (30%) y alta (>33 microvasos) en 21 casos (70%) (Figura 11).

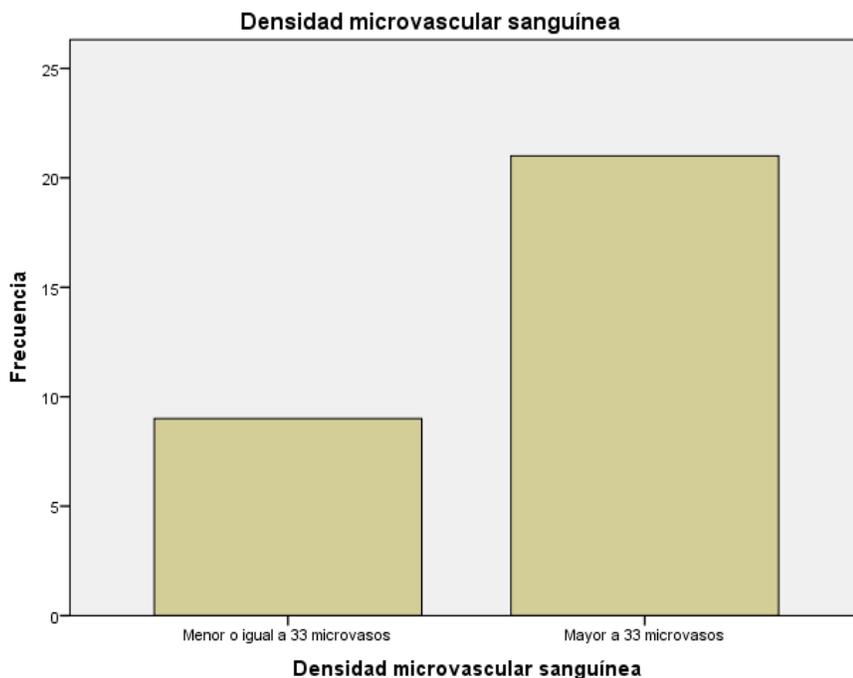


Figura 11. Densidad microvascular sanguínea (DMVS) alta y baja

La presencia de DMVS alta se correlacionó con el tiempo de evolución de la dermatosis, el tamaño de la lesión, la presencia o no de ulceración, la variedad histopatológica del tumor y el índice proliferativo tumoral, valorado mediante el porcentaje positivo de Ki67. Una DMVS alta se reportó en 9 casos (81.8%) con evolución menor o igual a 2 años, en 8 casos (72.7%) con evolución entre 3 a 4 años y en 4 casos (50%) con evolución mayor o igual a 5 años; no existió relación estadísticamente significativa entre estas dos variables. Se reportó una DMVS alta en 4 casos (40%) de las neoplasias con tamaño menor o igual a 2 años y en 17 casos (85%) con tamaño mayor de 2 años; lo anterior representó una relación estadísticamente significativa entre la presencia de una densidad microvascular alta y un tamaño mayor de 2cm de la neoplasia ($p=.018$) (Figura 12). La DMVS alta se presentó en 9 casos (69.2%) sin ulceración y 12 casos (70.6%) con ulceración; no existió

relación estadísticamente significativa entre estas dos variables. El número de casos reportados en cada variedad histopatológica con alta DMVS fue: nodular 1 caso (4.8%), infiltrante 11 casos (52.4%), adenoide 3 casos (14.3%) y metatípico 6 casos (28.6%). Lo anterior mostró una relación estadísticamente significativa entre una DMVS alta y las variedades histopatológicas infiltrante y metatípicas, en proporción con las variables nodular y adenoide ($p < .05$) (Figura 13). La DMVS alta se presentó en mayor proporción en aquellos tumores con Ki67 mayor de 40% en comparación con aquellos con Ki67 de 5 y 30 por ciento, pero no con Ki67 de 10 y 20 por ciento, por lo que no existió una correlación estadísticamente significativa entre una DMVS alta y una Ki67 mayor de 40%.

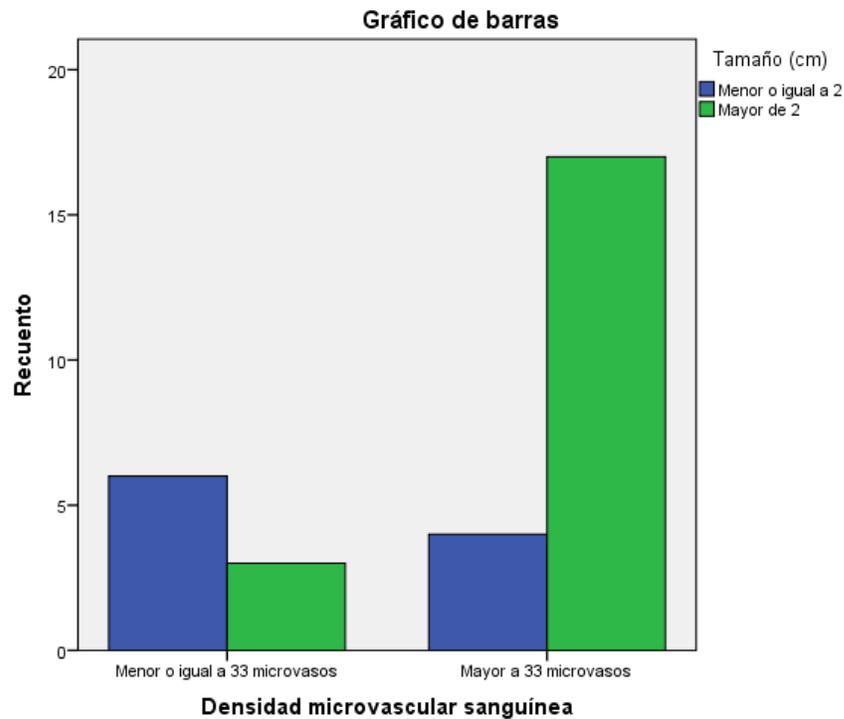


Figura 12. Correlación entre densidad microvascular sanguínea (DMVS) y el tamaño tumoral .

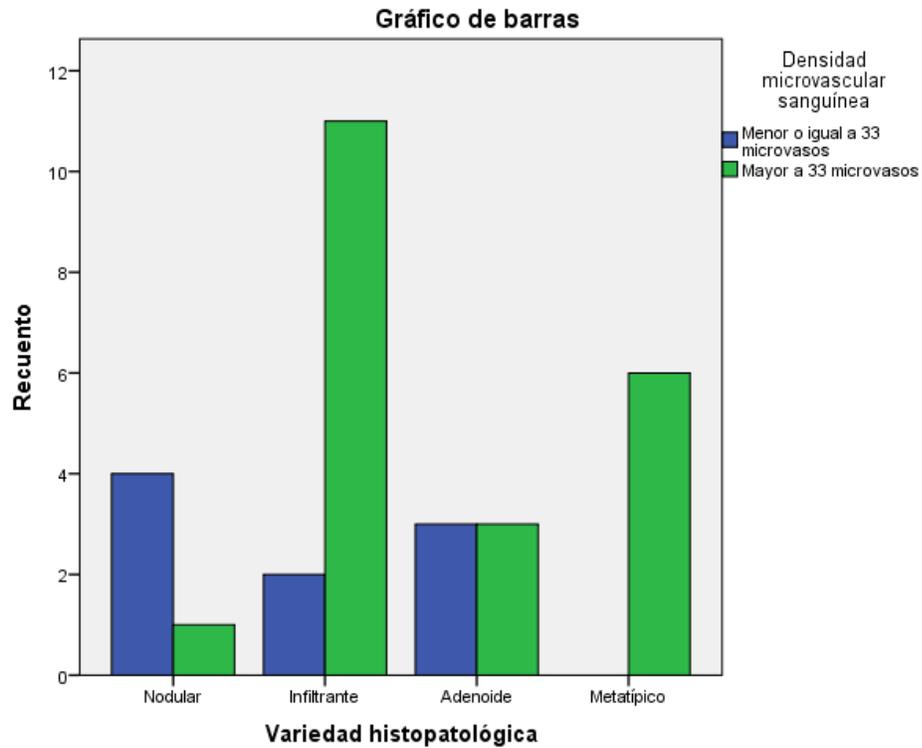


Figura 13. Correlación entre densidad microvascular sanguínea (DMVS) y la variedad histológica de CBC

La inmunotinción D2-40 para determinar el número de vasos linfáticos, se reportó positiva dentro de la masa tumoral con una media de 4.73 ± 4.556 vasos, con un mínimo de vasos de 0 y un máximo de 16. La positividad para D2-40 alrededor de la masa tumoral fue positiva con una media de 5.03 ± 4.056 , con un mínimo de 0 vasos y un máximo de 16. Al no existir en la literatura un punto de corte que permita definir una DMVL baja o alta, se relacionó la media de vasos linfáticos intratumorales y peritumorales de forma independiente con la variedades histopatológicas reportadas.

La media de vasos linfáticos intratumorales positivos en cada variedad histopatológica fue: nodular 5.80 ± 6.723 vasos; infiltrante 2.92 ± 3.121 vasos; adenoide 7.17 ± 5.231 vasos; y metatípico 5.33 ± 4.033 vasos (Figura 14). No existió una correlación estadísticamente significativa entre un número mayor de vasos linfáticos intratumorales y la variedad histopatológica del tumor.

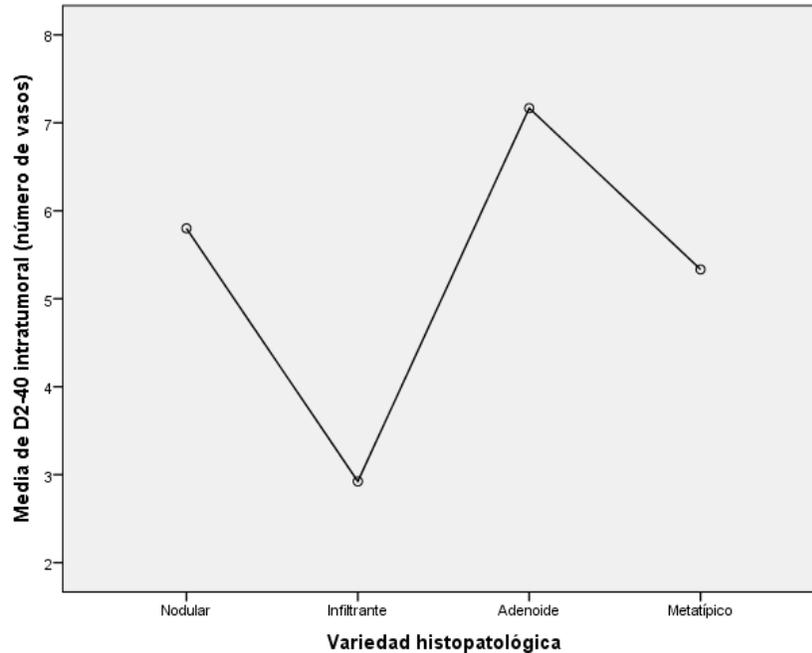


Figura 14. Expresión media de podoplanina (D2-40) intratumoral en cada variedad histológica de CBC.

La media de vasos linfáticos peritumorales positivos en cada variedad histopatológica fue: nodular 5.20 ± 6.834 vasos; infiltrante 4.08 ± 2.326 vasos; adenoide 6.50 ± 4.848 vasos; y metatípico 5.50 ± 4.037 vasos (Figura 15). No existió una correlación estadísticamente significativa entre un número mayor de vasos linfáticos peritumorales y la variedad histopatológica del tumor.

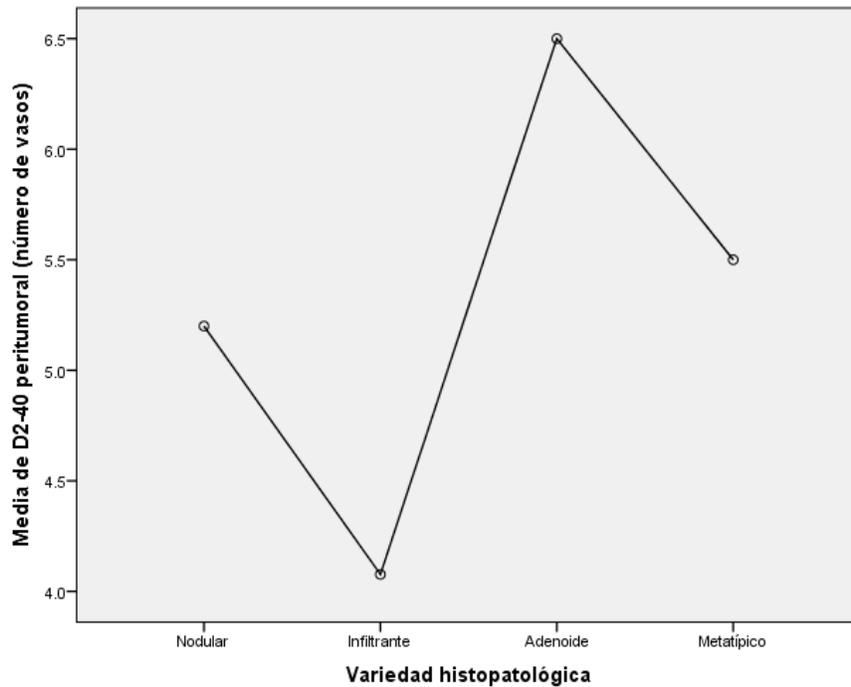


Figura 14. Expresión media de podoplanina (D2-40) peritumoral en cada variedad histológica de CBC

La inmunotinción de las células tumorales a D2-40 se reportó negativa en 7 casos (23.3%) y positiva en 23 casos (76.7%). La media de células tumorales positivas para la inmunotinción fue de 11.13 ± 15.138 , con un mínimo de 0 y un máximo de 60. De los casos positivos se reportó una baja positividad en las células tumorales (≤ 7 células) en 11 casos (36.7%) y una alta positividad (>7 células) en 12 casos (40%) (Figura 15). El patrón de inmunotinción en los casos positivos fue: difuso en 9 casos (30%) y focal en 14 casos (46.7%) (Figura 16).

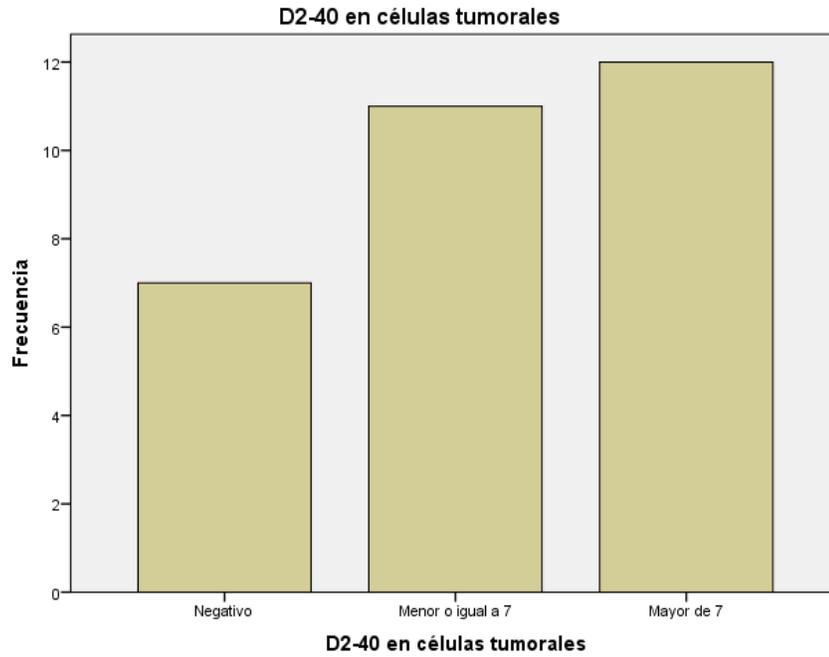


Figura 15. Expresión media de podoplanina (D2-40) en las células tumorales

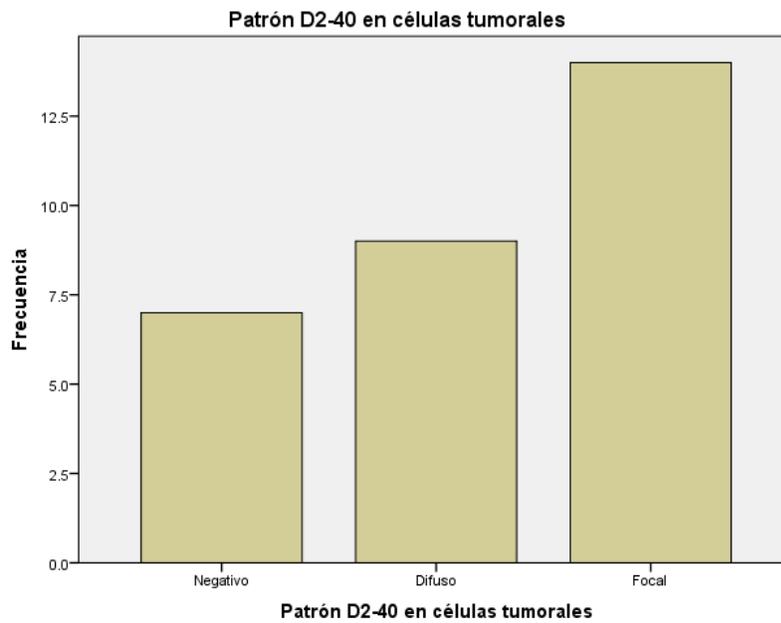


Figura 16. Patrón de expresión de podoplanina (D2-40) en las células tumorales

La presencia de positividad alta a D2-40 en las células tumorales se correlacionó con el tiempo de evolución de la dermatosis, el tamaño de la lesión, la presencia o no de ulceración, la variedad histopatológica del tumor y el índice proliferativo tumoral, valorado mediante el porcentaje positivo de Ki67. Una alta positividad a D2-40 en las células tumorales se reportó en 4 casos (36.4%) con evolución menor o igual a 2 años, en 5 casos (45.5%) con evolución entre 3 a 4 años y en 3 casos (37.5%) con evolución mayor o igual a 5 años; no existió relación estadísticamente significativa entre estas dos variables. Se reportó positividad a D2-40 alta en células tumorales, en 3 casos (30%) de las neoplasias con tamaño menor o igual a 2 años y en 9 casos (45%) con tamaño mayor de 2 años; no existió relación estadísticamente significativa entre estas dos variables. La positividad alta de D2-40 en las células tumorales se presentó en 2 casos (15.4%) sin ulceración y 10 casos (58.8%) con ulceración; lo que demostró una relación estadísticamente significativa entre una alta positividad y la presencia de ulceración ($p=0.25$) (Figura 17).

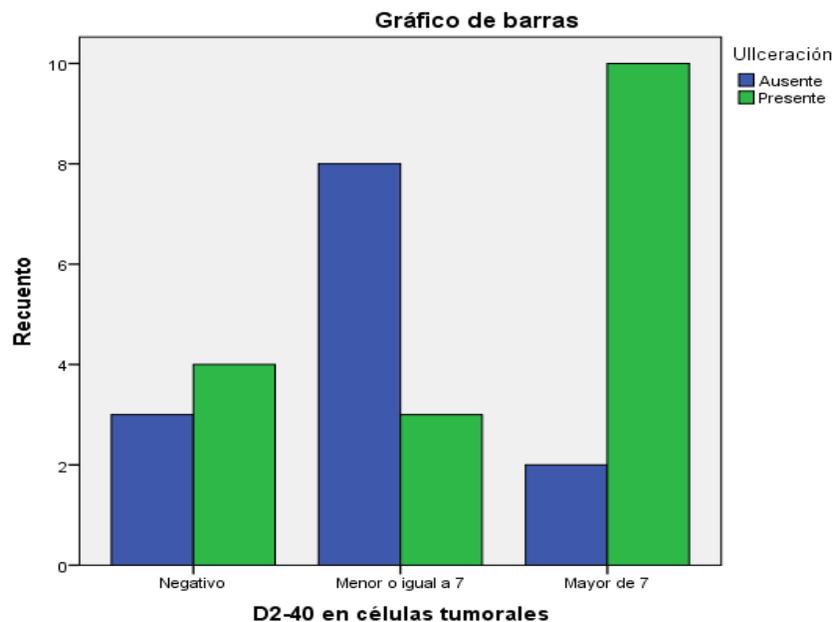


Figura 17. Correlación entre la expresión de podoplanina (D2-40) en las células tumorales y la presencia de ulceración.

El número de casos reportados en cada variedad histopatológica con alta positividad a D2-40 dentro de las células tumorales fue: nodular 3 casos (60%), infiltrante 6 casos (46.2%), adenoide 1 caso (14%) y metatípico 2 casos (33.3%); no existió relación estadísticamente significativa entre estas dos variables (Figura 18). La positividad alta dentro de las células tumorales se presentó en mayor proporción en aquellos tumores con Ki67 de 40% en 3 casos (50%) y de 60% en 3 casos (33.3%); sin embargo esto no representó una correlación estadísticamente significativa entre estas dos variables.

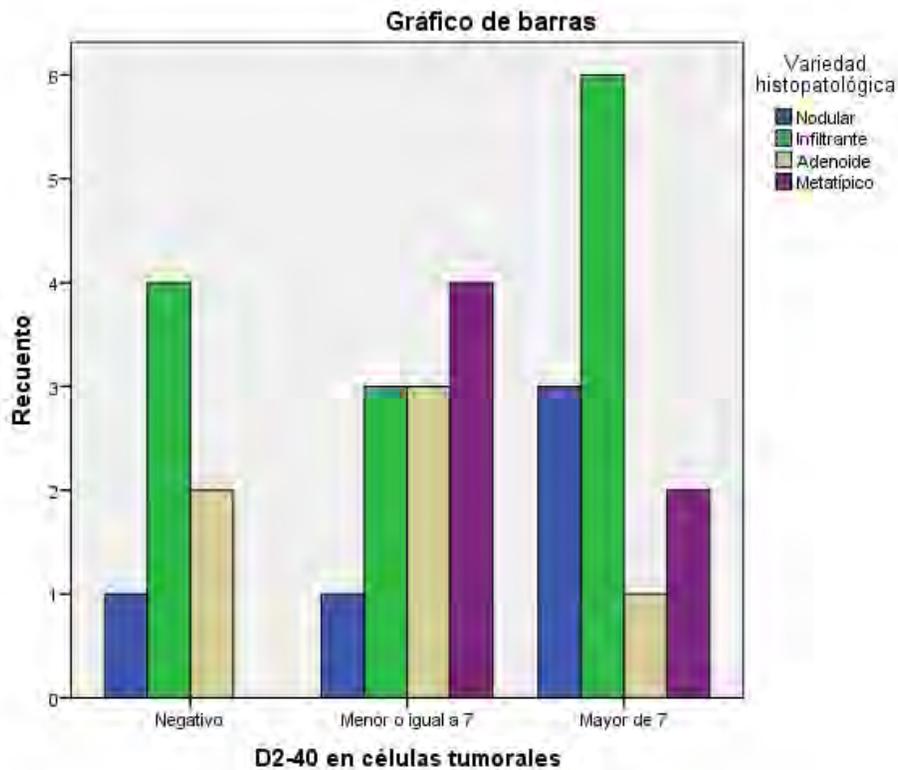


Figura 18. Correlación entre la expresión de podoplanina (D2-40) en las células tumorales y la variedad histológica de CBC

IV. DISCUSIÓN

Este estudio evaluó 30 casos de carcinoma basocelular; entre los hallazgos epidemiológicos encontrados, se reportó una mayor prevalencia en el género femenino (56.7%) y en una edad mayor a 71 años. La mayoría de las lesiones estudiadas reportaban una evolución menor de 4 años (73.4%). La topografía de presentación más común fue la nariz en el 40% de los casos. Lo anterior coincide con lo reportado por Loggini et al⁴⁴, quienes estudiaron 26 casos de carcinoma basocelular, reportando una media de edad de 75 años (rango de 43-93) y una localización de los tumores con predominio en cabeza y cuello (14 casos), comparado con tronco (9 casos) y extremidades (3 casos).

En nuestro estudio la mayoría de las laminillas estudiadas fueron recibidas con diagnóstico clínico de envío de carcinoma basocelular nodular (16.7%); y la mayoría de las lesiones extirpadas reportaron un tamaño mayor de 2cm (66.7%). Por su parte, Loggini et al⁴⁴, reportaron como variedad histológica más frecuente la nodular (76.9%) y un tamaño tumoral $\leq 1.5\text{cm}$ (57.6%).

El análisis histopatológico general de nuestras laminillas, reportó como variedad histopatológica más frecuente, la variedad infiltrante en el 43.3% de los casos. Se detectó la presencia de ulceración en el 56.7% de las extirpaciones analizadas y en ninguno de los casos se identificó la presencia de invasión perineural y/o perivascular.

Nuestro análisis de marcadores de inmunohistoquímica, reportó variabilidad en la expresión del marcador de índice de proliferación celular Ki67, predominando porcentajes entre 40% y 70%.

En cuanto al marcador de inmunohistoquímica de células endoteliales sanguíneas CD34, se reportó una media de 16.67 ± 6.905 vasos positivos dentro de la masa tumoral, con el mayor número de vasos reportado en la variedad histológica metatípica (media de 25.67 ± 4.227 vasos). En cuanto a la expresión de este marcador a nivel peritumoral, se reportó una media de 28 ± 8.408 vasos positivos, siendo nuevamente la variedad histológica metatípica, la que mayor cantidad de vasos peritumorales positivos reportó (media de 31.83 ± 5.115 vasos). En general se reportó una DMVS alta en el 70% de las laminillas estudiadas; la presencia de ésta tuvo una correlación estadísticamente significativa con un tamaño tumoral mayor de 2 cm ($p=.018$) y las variedades histológicas infiltrante y metatípicas ($p<.05$). Nuestros hallazgos difirieron con el estudio de Loggini et al⁴⁴, el cual reportó una DMVS alta únicamente en el 26.9% de los casos; el análisis estadístico de este autor demostró que la media de DMVS fue mayor en la variante nodular (23 ± 11.8 vasos) con una $p=0.003$, siendo la variante esclerosante la que mayor vascularización demostró (40 microvasos). Por su parte, este autor demostró una relación estadísticamente significativa entre una dimensión tumoral ≤ 1.5 cm y una DMVS baja; lo cual es comparable con nuestros resultados.

La correlación entre una DMVS alta con otras variables: tiempo de evolución, presencia de ulceración e índice proliferativo tumoral (expresión positiva de Ki67); no reportaron significancia estadística. Por su parte Loggini et al⁴⁴, reportaron una asociación significativa ($p=0.01$) entre la densidad microvascular y la presencia de ulceración ya que todos los carcinomas no ulcerados (19.2%) mostraron una DMVS baja (11.2 ± 2.16) comparado con los ulcerados (80.7%), los cuales mostraron una DMVS alta (25 ± 12.1).

En cuanto al marcador de inmunohistoquímica de células endoteliales linfáticas D2-40, se

reportó una media de 4.73 ± 4.556 vasos positivos dentro de la masa tumoral, con el mayor número de vasos reportado en la variedad adenoide (media de 7.17 ± 5.231 vasos). En cuanto a la expresión de este marcador a nivel peritumoral, se reportó una media de vasos positivos de 5.03 ± 4.056 , siendo nuevamente la variedad histológica adenoide, la que mayor cantidad de vasos peritumorales positivos reportó (media de 6.50 ± 4.848 vasos). Al no existir en la literatura un punto de corte que permita definir una DMVL baja o alta, se relacionó la media de vasos linfáticos intratumorales y peritumorales de forma independiente con otras variables como: tiempo de evolución, tamaño tumoral, presencia de ulceración e índice proliferativo tumoral (expresión positiva de Ki67); lo anterior no reportó significancia estadística.

En nuestro estudio, la expresión positiva de este marcador en las células tumorales, se reportó en el 76.7% de los casos, con una media de 11.13 ± 15.138 células. De los casos positivos, el 40% reportó una alta positividad ($>$ de 7 células) con un patrón predominantemente focal en el 46.7% de los casos. Lo anterior difiere con lo establecido por Tebcherani et al⁴⁵, quienes únicamente reportaron positividad a D2-40 en las células tumorales, en 6% de los 307 carcinomas basocelulares que estudiaron; sin embargo coinciden con nuestro estudio, en que el patrón de inmunotinción predominante es focal (4%). Por su parte, Plaza et al⁴⁶, estudiaron 27 casos de carcinoma basocelular y reportaron expresividad débilmente positiva para D2-40 en 6 de los 27 casos (22.2%) con los siguientes patrones: 2 casos (7.4%) difuso y 4 casos (14.8%) focal. Otros estudios con resultados similares son el de Yang et al⁴⁷, quienes evaluaron 17 casos de carcinoma basocelular, mostrando positividad a D2-40 en 7 casos (41%) con predominio de un patrón débil y focal.

En nuestro estudio, la presencia de positividad alta a D2-40 en las células tumorales se

correlacionó con el tiempo de evolución de la dermatosis, el tamaño de la lesión, la presencia o no de ulceración, la variedad histopatológica del tumor y el índice proliferativo tumoral (expresión positiva de Ki67); reportándose significancia estadística entre la positividad alta de D2-40 en las células tumorales y la presencia de ulceración ($p=0.25$).

Algunos de los datos anteriores, coinciden con lo reportado por Ishida et al⁴⁸, quienes evaluaron 20 casos de carcinoma basocelular reportando positividad débil de D2-40 en 13 casos (65%) con un patrón predominantemente focal (periférico) y demostraron que no existía relación estadísticamente significativa entre la variedad histológica y la incidencia de reactividad a este marcador. Sin embargo, nuestro estudio difiere con reportado por Mercut et al⁴⁹, quienes evaluaron a 25 pacientes con carcinoma basocelular, reportando reactividad a D2-40 en 12 casos (48%). La mayor positividad se reportó en la variante metatípica, alrededor de las áreas con diferenciación escamosa, con un máximo puntaje de intensidad (IRS) de 6. En dos casos profundamente invasivos se mostró reactividad estromal (la mayoría a nivel de los miofibroblastos asociados al tumor) en proximidad a las islas de tumor invasivo. En el segundo lugar de reactividad se presentó en 3 casos con variedad superficial; la reacción presentó un patrón focal predominando en las células periféricas. De los 8 casos con variedad infiltrante morfeiforme, únicamente 3 casos mostraron una positividad débil en el citoplasma de algunas células tumorales de la periferia. La variedad con menos reactividad fue la micronodular en donde de los 6 casos reportados únicamente 2 se mostraron positivos con un puntaje mínimo de intensidad (IRS) de 1. En términos generales el patrón de reactividad fue focal con algunas células positivas de predominio en la periferia del tumor; sin embargo esta reactividad fue menor que la reportada en la células basales de la epidermis adyacente o en el endotelio de los vasos linfáticos. Este estudio demostró una inmunoreactividad significativa a D2-40 en relación con la variedad histológica metatípica de carcinomas basocelulares; así como

con estadios avanzados del tumor; dicho hallazgo no se encontró en nuestro estudio.

Nuestro estudio cuenta con las siguientes limitaciones: 1) tamaño de la muestra pequeño, debido a que se ve afectada directamente por el presupuesto que involucra el trabajo con inmunohistoquímica; 2) estudio transversal en el no fue posible dar seguimiento para determinar un pronóstico.

V. CONCLUSIÓN

- En nuestra población, el carcinoma basocelular se reporta con mayor frecuencia en mujeres mayores de 71 años.
- El diagnóstico confirmatorio de carcinoma basocelular tiende a establecerse en los primeros 4 años desde la aparición de la lesión.
- La topografía más común de presentación es la cara, específicamente en la nariz.
- La variedad clínica más común es la nodular y la mayoría de las lesiones extirpadas presentan un tamaño mayor de 2cm.
- La variedad histológica más común es la infiltrante.
- La mayoría de las lesiones extirpadas presentan ulceración.
- Ninguna variedad histológica se asoció a invasión perineural y/o perivascular.
- El índice de proliferación celular Ki67 es variable reportando porcentajes entre 40% y 70%.
- La media de vasos positivos para CD34 intratumoral es de 16.67 ± 6.905 vasos.
- La media de vasos positivos para CD34 peritumoral es de 28 ± 8.408 vasos.
- La variedad histológica metatípica presentó mayor cantidad de vasos positivos para CD34 tanto de forma intratumoral (media de 25.67 ± 4.227 vasos) como peritumoral (media de 31.83 ± 5.115 vasos).

- Los carcinomas basocelulares muestran una DMVS alta hasta en el 70% de los casos.
- La DMVS alta se asocia con un tamaño tumoral mayor de 2 cm y las variedades histológicas infiltrante y metatípica.
- No existe una asociación entre la DMVS alta y el tiempo de evolución de la lesión, presencia de ulceración o un índice proliferativo tumoral alto.
- La media de vasos positivos para D2-40 intratumoral es de 4.73 ± 4.556 vasos.
- La media de vasos positivos para D2-40 peritumoral es de 5.03 ± 4.056 vasos.
- La variedad histológica adenoide presentó mayor cantidad de vasos positivos para D2-40 tanto de forma intratumoral (media de 7.17 ± 5.231 vasos) como peritumoral (media de 6.50 ± 4.848 vasos)..
- No existe relación entre la media de vasos linfáticos positivos para D2-40 tanto de forma intratumoral como peritumoral, y el tiempo de evolución, tamaño tumoral, presencia de ulceración e índice proliferativo tumoral alto.
- D2-40 resulta positiva en las células tumorales hasta en el 76.7% de los casos.
- La media de células positivas para D2-40 dentro de la masa tumoral es 11.13 ± 15.138 células.
- D2-40 se reporta altamente positiva dentro de las células tumorales en el 40% de los casos con un patrón predominantemente focal en el 46.7%
- Un D2-40 altamente positivo dentro de las células tumorales se correlaciona con la presencia de ulceración.
- Un D2-40 altamente positivo dentro de las células tumorales no guarda relación con tiempo de evolución de la dermatosis, el tamaño de la lesión, la variedad histopatológica del tumor y el índice proliferativo tumoral.

- La densidad microvascular sanguínea y linfática pudiera proveer de información útil para distinguir subgrupos de pacientes en quienes la recurrencia y/o posible riesgo de metástasis pudiera existir de forma más frecuente.
- Una variedad de carcinomas basocelulares, que expresan D2-40 pudieran tener el potencial de diferenciación multilíneaer debido a los hallazgos en este y otros estudios de la expresión de este marcador en las células basales de la vaina radicular externa.
- La expresión del marcador D2-40 parece deteriorarse durante la tumorigénesis del carcinoma basocelular (Ishida et al).

VI. REFERENCIAS:

1. Losquadro W. *Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer*. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2017; 25(3):283-289.
2. Requena L. *Neoplasias anexiales cutáneas*. Grupo Aula Media, S.L. 2004; 341-350.
3. Fernández S. *Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México*. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. SSA. 2011.
4. Hernández –Zarate SI, et al. *Epidemiología del cáncer de piel en pacientes de la Clínica de Dermato-oncología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua*. Estudio retrospectivo de los últimos ocho años. *Dermatol Rev Mex* 2012;56(1):30-37.
5. Coups EJ, et al. *Prevalence and correlates of skin cancer screening among middle-aged and older white adults in the United States*. *Amer Jour Med* 2010;123:439-445.
6. Bologna J, et al. *Dermatology*, 2nd ed. USA. Mosby Elsevier; 2008
7. Kyrgidis A. *New Concepts for Basal Cell Carcinoma. Demographic, Clinical, Histological Risk Factors, and Biomarkers. A Systematic Review of Evidence Regarding Risk for Tumor Development, Susceptibility for Second Primary and Recurrence*. *Journ Surg Reser* 2010;159:545–556
8. Narayanan DL. *Ultraviolet radiation and skin cancer*. *Int J Dermatol*. 2010;49(9):978-986.
9. Richmond-Sinclair NM, et. al. *Clinical signs of photodamage are associated with BCC multiplicity and site*. *Int J Ca* 2010;127:2622-29
10. Wolff, K et al. Fitzpatrick in General Medicine. 7th ed. 2008.
11. Boyd AS. *Tumor of the Epidermis in:* Barnhill RL, et. Al. *Dermatopathology*. Mc Graw Hill 2010.
12. Donovan J. *Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma*. *Dermatol Surg* 2009; 35:1311–1323
13. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH et al. *Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations*. *J Clin Invest* 2011;121:1768-81
14. Hsu YC, Li L, Fuchs E. *Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration*. *Cell* 2014;157:935-49
15. Alsaad KO, Obaidat NA, Ghazarian D. *Skin adnexal neoplasms- part 1: An*

approach to tumours of the pilosebaceous unit. J Clin Pathol 2007;60:129-44

16. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. *Basal cell carcinoma: What's new under the sun.* Photochem. Photobiol. 86(3), 481-491 (2010).
17. Epstein EH. *Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog.* Nat Rev Cancer 2008;8:743-54.
18. Dessinioti C, Antoniou C, Stratigos AJ. *New targeted approaches for the treatment and prevention of nonmelanoma skin cancer.* Exp. Rev. Dermatol. 2011; 6(6), 625-634.
19. Lacouture ME, Dreno B, Ascierto PA et al. *Characterization and management of hedgehog pathway inhibitor-related adverse events in patients with advanced basal cell carcinoma.* The Oncologist 2016;21:1218-29
20. Dessinioti C, Antoniou C, Stratigos AJ. *From basal cell morphogenesis to the alopecia induced by hedgehog inhibitors: connecting the dots.* Br J Dermatol. 2017 Jun 18. doi: 10.1111/bjd.15738.
21. Folkman J. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.* Nat Med. 1995; 1: 27–31
22. Saito H, Tsujitani S. *Angiogenesis, angiogenic factor expression and prognosis of gastric carcinoma.* Anti- cancer Res. 2001; 21: 4365–4372.
23. Rak J, Filmus J, Kerbel RS. *Reciprocal paracrine interaction between tumor cells and endothelial cells: the “angiogenesis progression” hypothesis.* Eur J Cancer. 2006; 32A: 2438–2450
24. Detmar M, Velasco P, Richard I, Claffey KP, Streit M, Riccardi L, Brown LF. *Expression of vascular endothelial growth factor induces an invasive phenotype in human squamous cell carcinomas.* Am J Pathol. 2010; 156: 159–167
25. Folkman J. *Tumor angiogenesis.* In: Holland JF, Frei EIII, Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichsel-baum RR: Cancer Medicine, 5th ed., pp 132–152. 2000.
26. Pastushenko I, Conejero C, Carapeto FJ. *Lymphangiogenesis: implications for diagnosis, treatment, and prognosis in patients with melanoma.* Actas Dermosifiliogr. 2015 Jan-Feb;106(1):7-16.

27. Weedon D. Tumor of the epidermin In: Skin Pathology. Churchill Livingstone Elsevier. 3ra. Edición. 2010.
28. Young L, Coates D, Pagliaro J, et al. *Perineural invasion present exclusively in central tissue blocks of Mohs surgical excisions of basal cell carcinoma*. Australas J Dermatol. 2017 Jul 14. doi: 10.1111/ajd.12617.
29. Elder D, Murphy G, Elenitsas R. *Tumor de los anexos epidérmicos In: Lever's Histopathology of the Skin*. Lippincott Williams & Wilkins. 10. Edición
30. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H. *Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte 1)*. Actas Dermosifiliogr. 2013;104(2):99-127
31. Wasserman J, Maddox J, Racz M, Petronic-Rosic V. *Update on immunohistochemical methods relevant to dermatopathology*. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:1053-61.
32. Wallace ML, Smoller BR. *Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology*. J Am Acad Dermatol. 1996;34:163-83.
33. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H. *Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte II)*. Actas Dermosifiliogr. 2013;104(3):181-203.
34. Khodaeiani E, Fakhrijou A, Amirnia M, et al. *Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki67 expression in skin epithelial tumors*. Indian J Dermatol. 2013 May;58(3):181-7. doi: 10.4103/0019-5154.110824.
35. Yerebakan O, Ciftçioğlu MA, Akkaya BK, et al. *Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma*. J Dermatol. 2003;30:33–41.
36. 53. Smith KJ, Williams J, Corbett D, Skelton H. *Microcystic adnexal carcinoma: An immunohistochemical study including markers of proliferation and apoptosis*. Am J Surg Pathol. 2001;25:464–71.

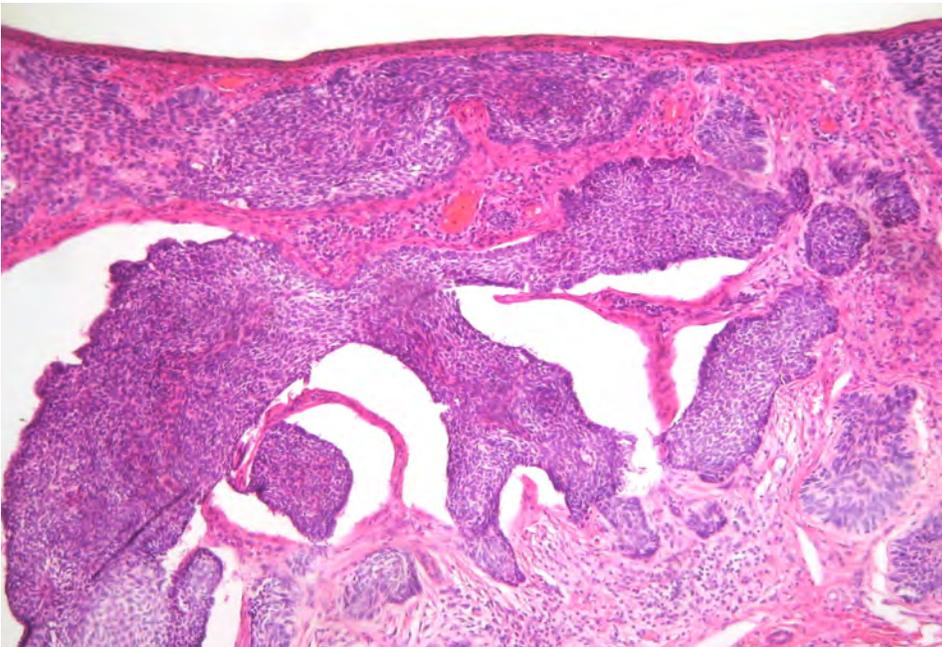
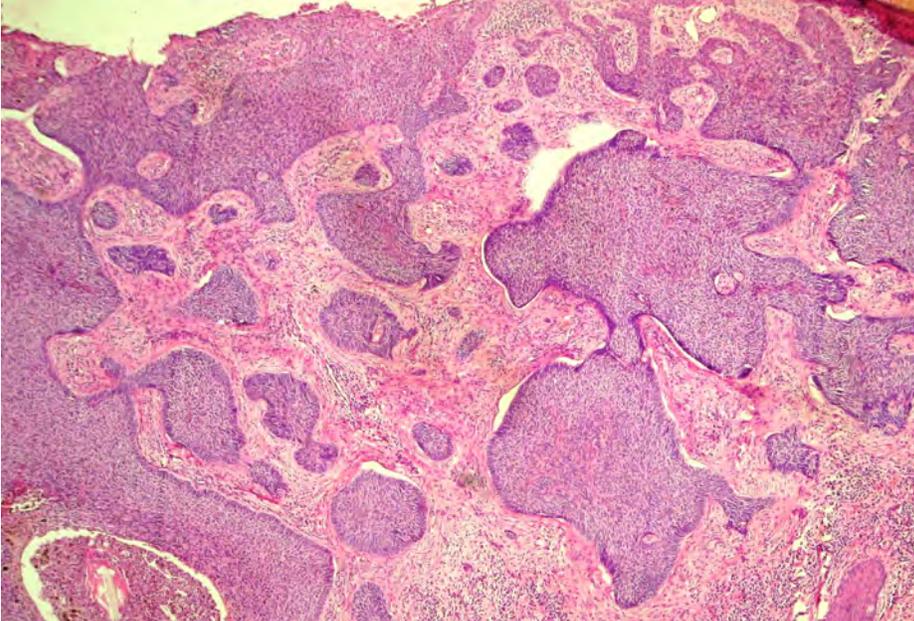
37. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Steiniche T. *Immunohistochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: Promising diagnostic tools in melanocytic lesions.* Am J Dermatopathol. 2011;33:361–70.
38. Tardio JC. CD34-reactive tumors of the skin. *An updated review of an ever-growing list of lesions.* J Cutan Pathol. 2009;36:89-102.
39. Corbalán-Vélez R, Ruiz-Maciá JA, Martínez-Sánchez D, Martínez- Barba E. *Utilidad de la tinción inmunohistoquímica con CD34 en el diagnóstico de lesiones con diferenciación tricolemal.* Actas Dermosifiliogr. 2009;100:738-40.
40. Liang H, Wu H, Giorgadze TA, Sariya D, et al. *Podoplanin is a highly sensitive and specific marker to distinguish primary skin adnexal carcinomas from adenocarcinomas metastatic to skin.* Am J Surg Pathol. 2007;31:304-10.
41. Plaza JA, Ortega PF, Stockman DL, et al. *Value of p63 and podoplanin (D2-40) immunoreactivity in the distinction between primary cutaneous tumors and adenocarcinomas metastatic to the skin: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 79 cases.* J Cutan Pathol. 2010;37:403-10.
42. Florez-Vargas A, Vargas SO, Debelenko LV, et al. *Comparative analysis of D2-40 and LYVE-1 immunostaining in lymphatic malformations.* Lymphology. 2008;41:103-10.
43. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, et al. *Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis.* J Cutan Pathol. 2009;36:772-80.
44. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, et al. *CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma.* Pathol Res Pract. 2003;199:705-712-
45. Tebcherani A, Franco H, Sotto M. *Diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing trichoepithelioma and basal cell carcinoma: evaluation using tissue microarray samples.* Modern Pathology. 2012; 25:1345-1353..
46. Plaza J, Ortega P, Bengana C, et al. *Immunolabeling pattern of podoplanin (D2-40) may distinguish basal cell carcinoma from trichoepitheliomas: a clinicopathologic*

and immunohistochemical study of 49 cases. Am J Dermatopathol 2010; 32:683-687.

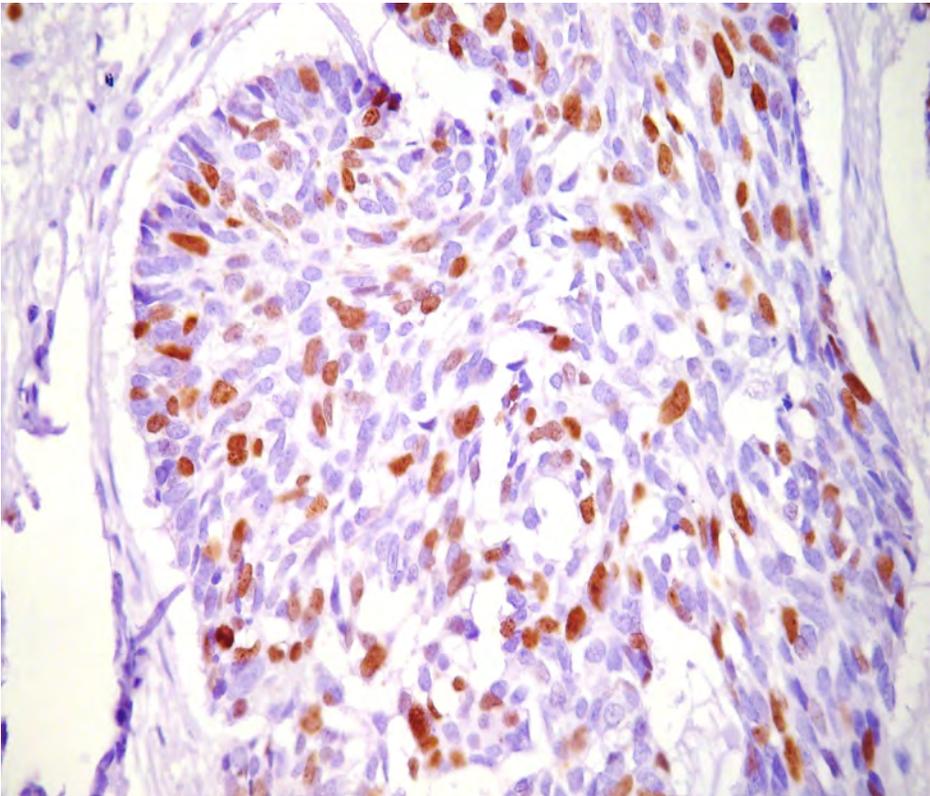
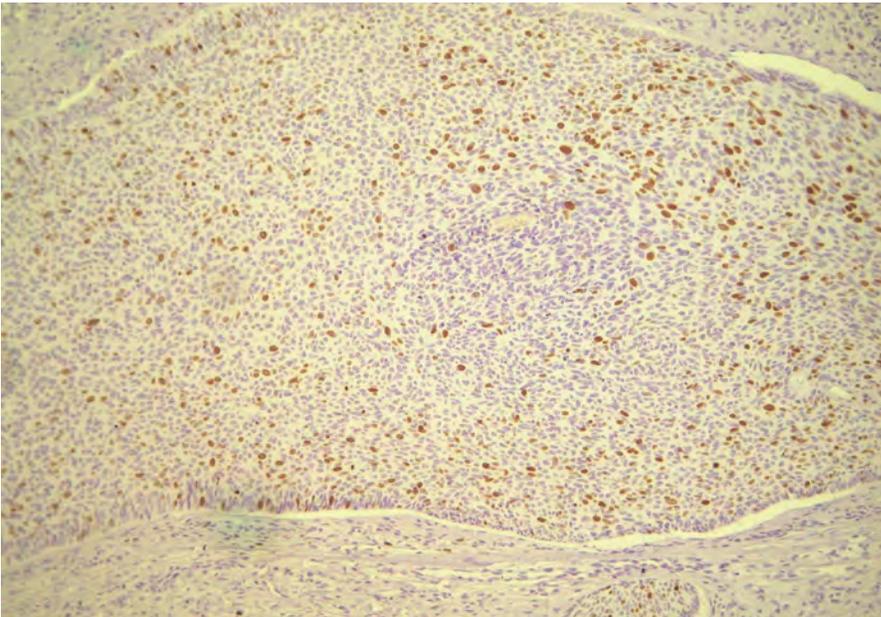
47. Yang HM, Cabral E, Dadras S, et al. Immunohistochemical expression of D2-40 in benign and malignant sebaceous tumors and comparison to basal and squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:549-554
48. Ishida M, Kushima R, Okabe H, et al. *Immunohistochemical demonstration of D2-40 in basal cell carcinoma of the skin.* *J Cutan Pathol* 2008; 35:926-930.
49. Mercut R, Eugen M, Margaritescu C, et al. Expression of p53, D2-40 and alpha-smooth muscle actin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2014. 55(2):263-272.

Vii. ANEXOS.

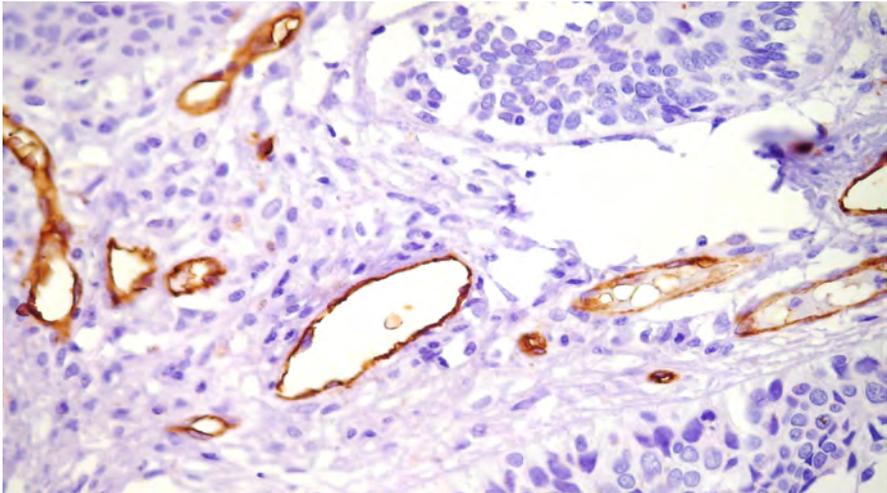
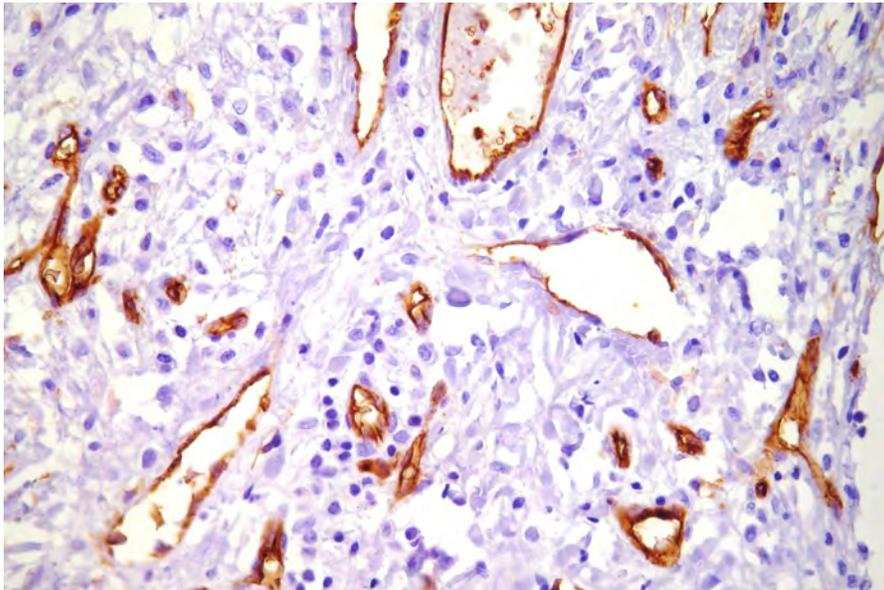
HEMATOXILINA Y EOSINA DE CARCINOMA BASOCELULAR



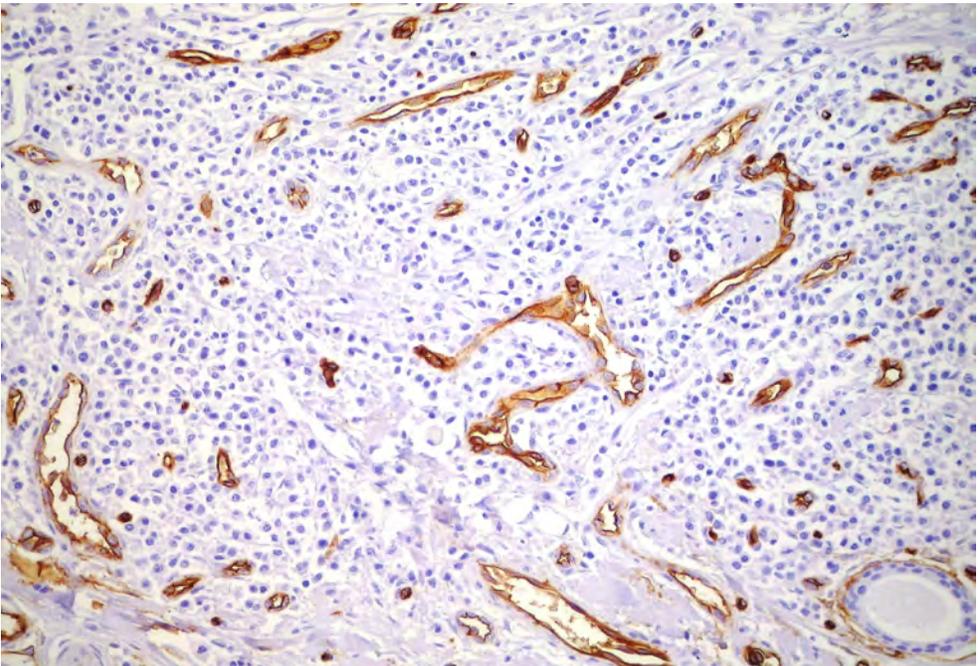
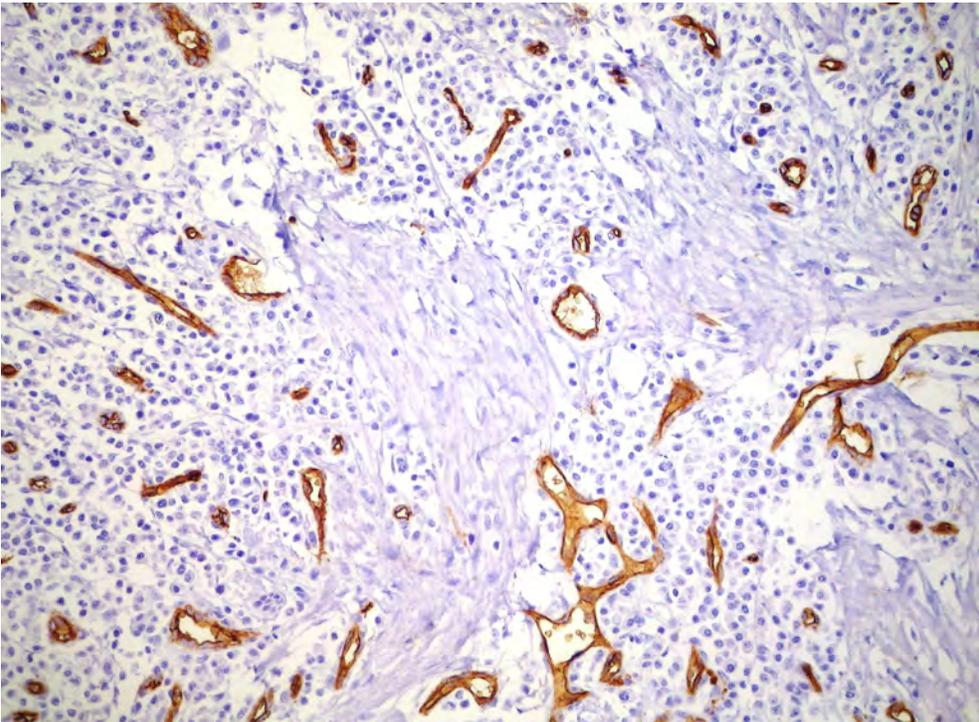
Ki67 INDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR



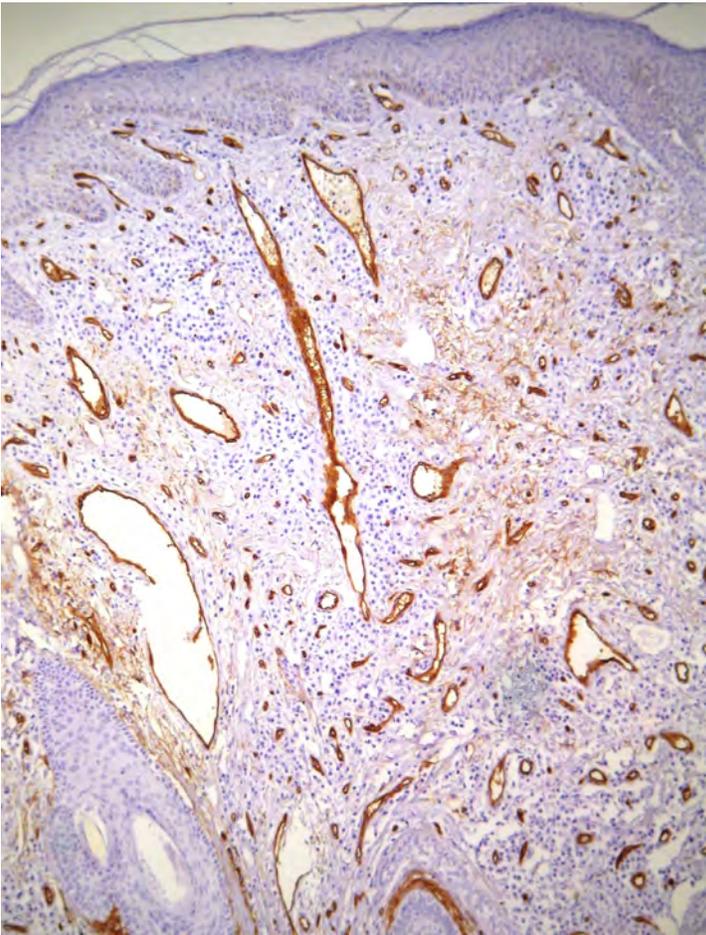
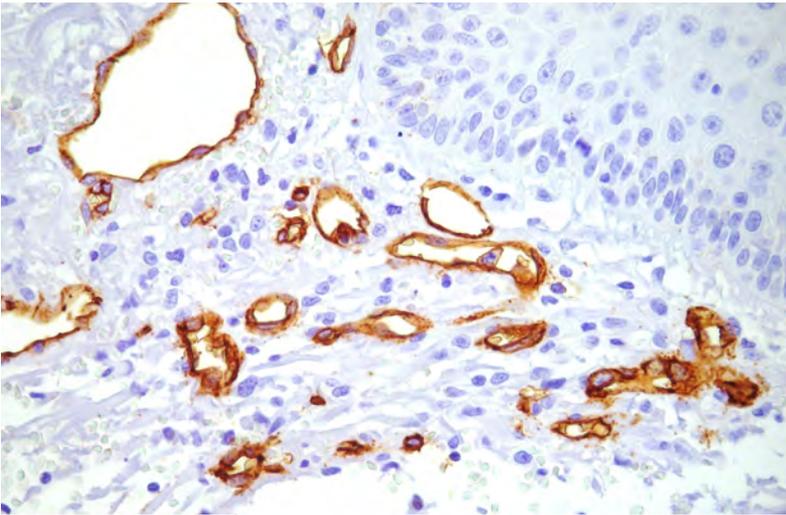
CD34 INTRATUMORAL



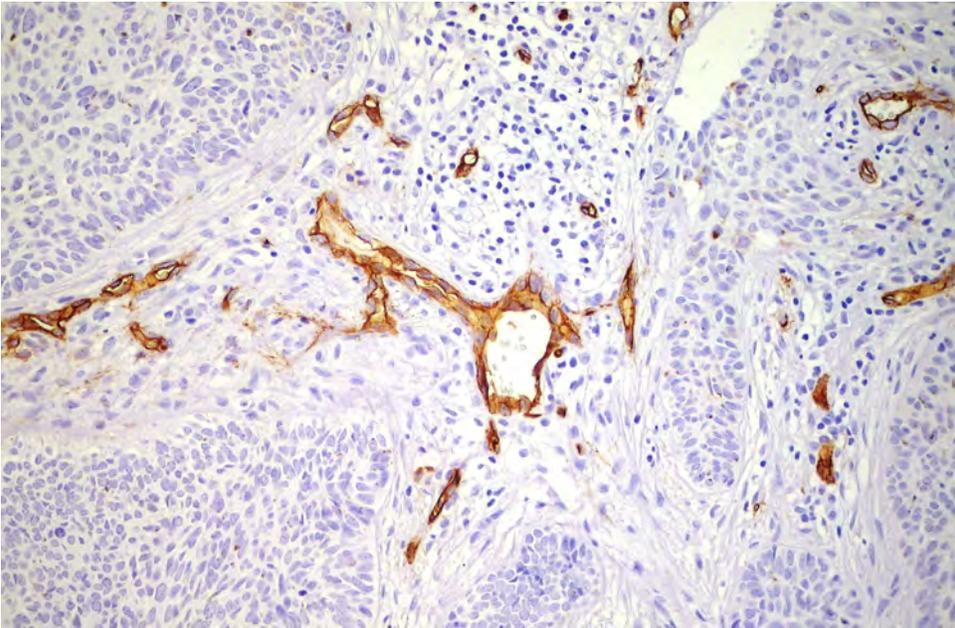
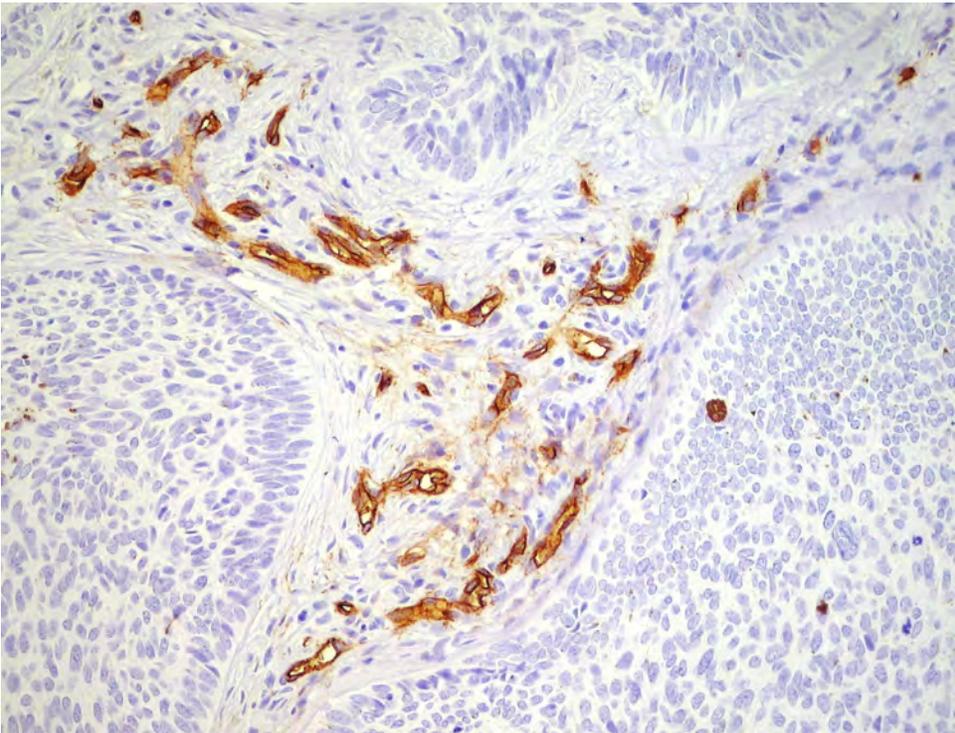
CD34 INTRATUMORAL



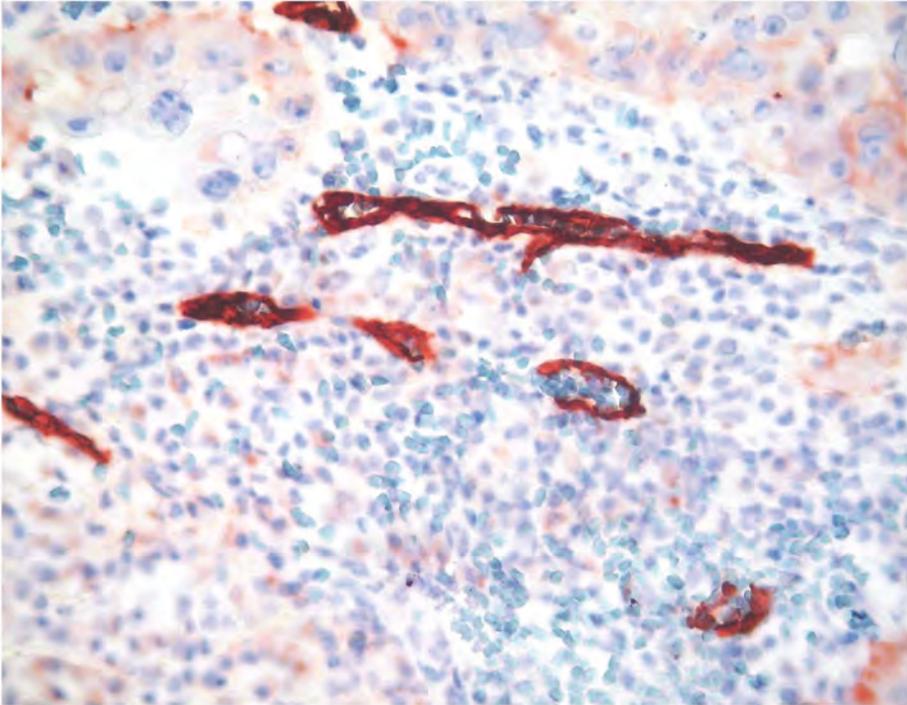
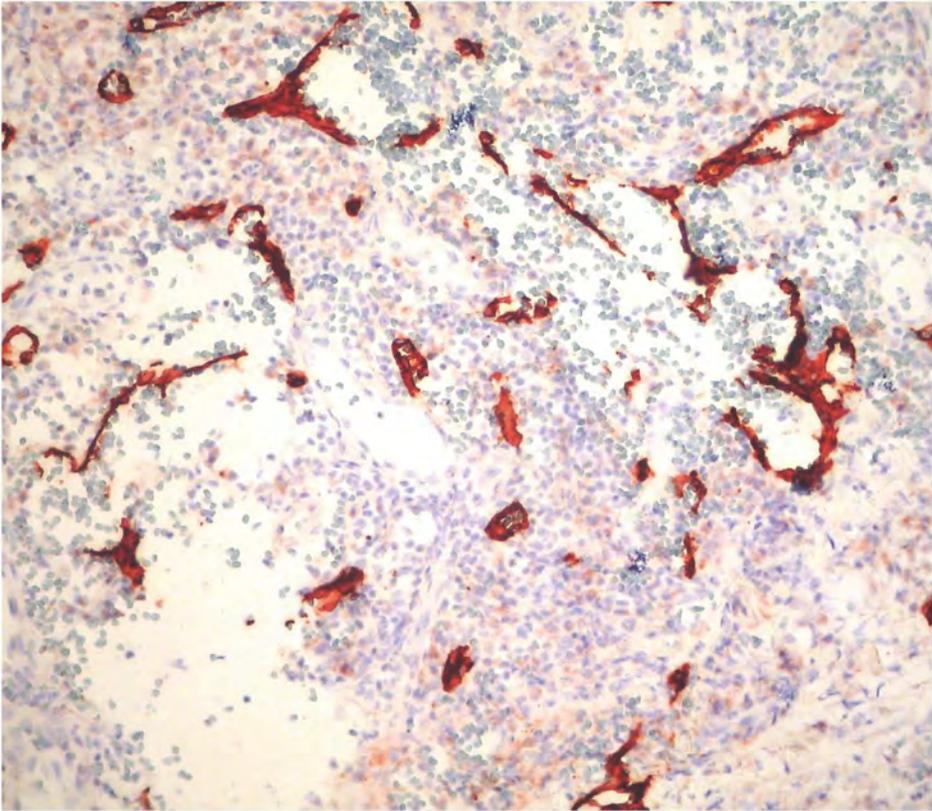
CD34 PERITUMORAL



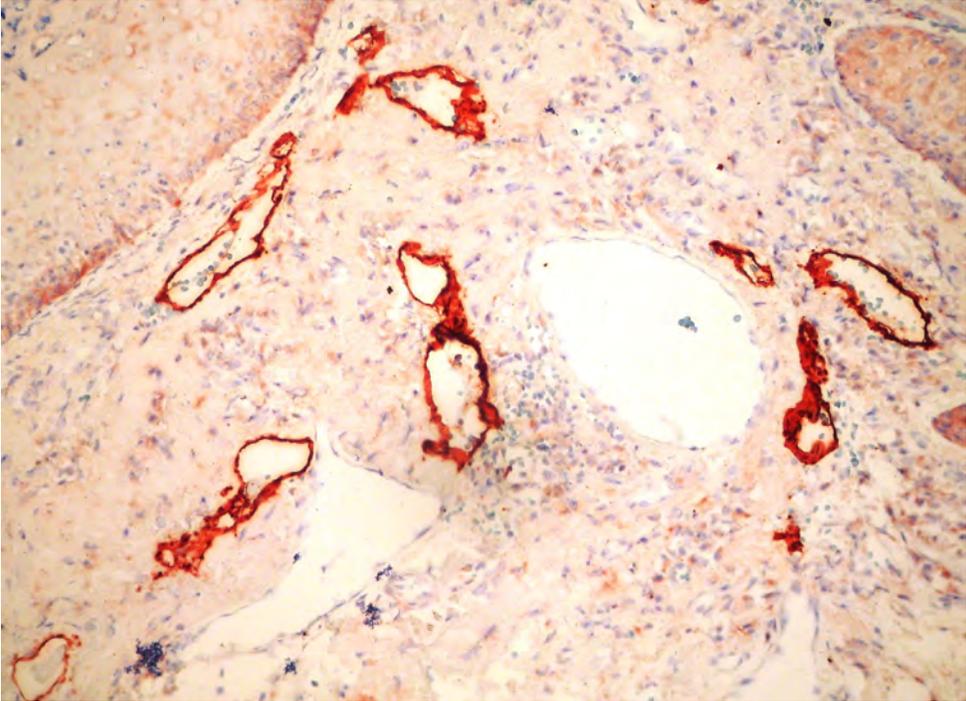
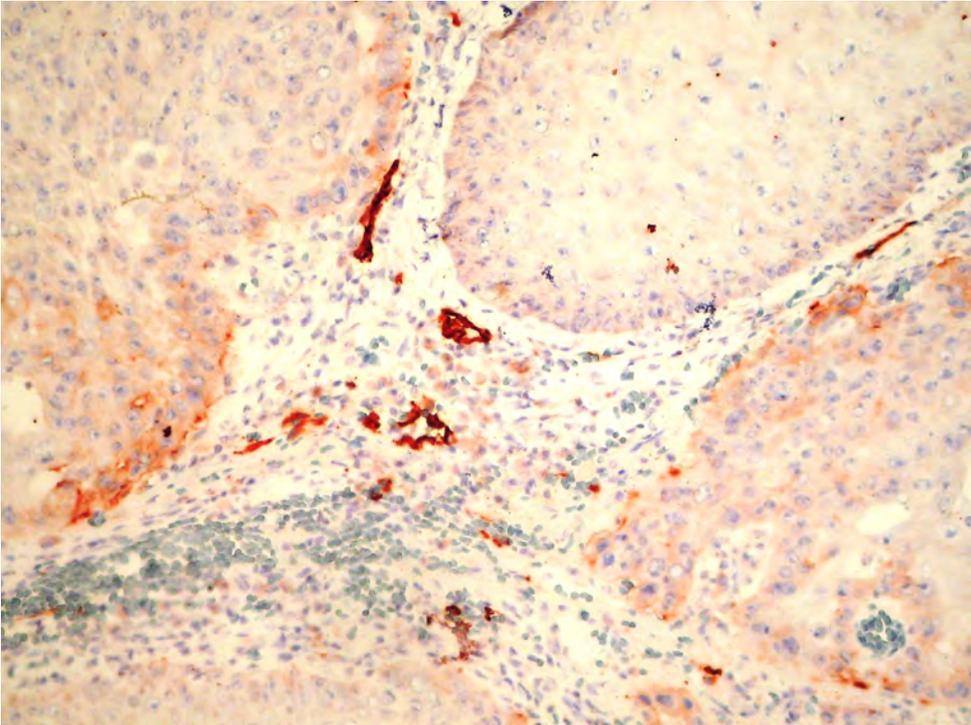
CD34 PERITUMORAL



D2-40 INTRATUMORAL



D2-40 PERITUMORAL



D2-40 EN CÉLULAS TUMORALES

