

Angiogénesis

Carlos López-Graniel, Abelardo Meneses García

DEFINICIÓN

Existe evidencia experimental suficiente que indica que el crecimiento y diseminación de una neoplasia es dependiente de la angiogénesis. Angiogénesis o neovascularización (“*formación de nuevos vasos a partir del propio tumor*”), término inicialmente descrito por el Dr. Judah Folkman y demostrado en modelos experimentales en ratones desnudos y posteriormente en pacientes con melanoma metastático.

Así, después que un tumor ha alcanzado alrededor de 10^6 células, para poder sobrevivir requiere de neovascularización, y cada incremento sucesivo en el volumen del tumor es precedido por una fase de angiogénesis, fenómeno de inducción, de formación de nuevos capilares sanguíneos a partir del propio tumor, lo que incrementa las posibilidades de incorporación de células neoplásicas a la circulación.

ASPECTOS HISTÓRICOS

En 1935, Hertig y colaboradores acuñaron por primera vez el término *angiogénesis*, para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta. El proceso completo de neoformación vascular era posible identificarlo visualmente mediante la colocación de una cámara directamente sobre la oreja de un conejo después de habersele realizado una herida.

Estudios efectuados desde 1970, mismo año en que se aisló por primera vez el primer factor angiogénico de un tumor, permitieron sustentar la hipótesis de neoformación de vasos a partir de la propia neoplasia, propuesta por Judah Folkman.

No se conoce con precisión el mecanismo que desencadena el proceso de angiogénesis; sin embargo, se cree que posiblemente existan receptores de membrana específicos o dependientes de factores estimulantes del crecimiento vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF*), al cual se atribuye que sea el elemento iniciador de la angiogénesis. La inducción de la angiogénesis generalmente es mediada por moléculas angiogénicas específicas,

producidas por la propia célula tumoral o los macrófagos atraídos por ellas.

Independientemente se considera que existen dos fases intrínsecas al desarrollo de la neoplasia, una fase prevascular y otra vascular, propiamente dicha. La primera o fase prevascular ha sido dilucidada ampliamente en estudios de líneas celulares de carcinoma de cérvix, vejiga, y mama, la cual puede persistir por años y usualmente se asocia con crecimiento limitado del tumor y sin capacidad para dar metástasis; posiblemente se puedan incluir aquí fenómenos de tipo premaligno, como las displasias, las hiperplasias hasta el carcinoma *in situ*. La segunda fase o vascular se caracteriza por una rápida multiplicación de las células tumorales, neoformación de vasos capilares de manera acelerada, lo que condiciona amplias zonas de hemorragia, inducción de apoptosis y necrosis central del tumor, con alto potencial de diseminación a través de metástasis.

Hipótesis: Los tumores son angiogénico dependientes.

1. El crecimiento de las células neoplásicas implantadas en el tejido subcutáneo de ratones desnudos es lento y lineal, antes de la vascularización; pero se convierte en acelerado y exponencial al aparecer la neovascularización.

2. El crecimiento de las células neoplásicas implantadas en órganos perfundidos de manera aislada, en donde no existe proliferación vascular, la “carga tumoral” no rebasa los $1-2 \text{ mm}^3$; sin embargo, después de trasplantarse en los ratones desnudos, las dimensiones del tumor alcanzan rápidamente a $1-2 \text{ cm}^3$.

3. La implantación de células neoplásicas en la córnea, tejido pobremente vascularizado, es extremadamente lento, al sembrarse en tejido vascularizado la replicación tumoral se acelera.

4. Las células neoplásicas implantadas en el humor acuoso del ojo se mantienen viables, pero no se reproducen, manteniendo un tamaño $< 1 \text{ mm}^3$; una

vez que estas mismas células son desplazadas al iris, tejido ricamente vascularizado, aunado a la neovascularización propia de las células que confluyen entre sí, las dimensiones se incrementan 16,000 veces más su tamaño original en tan sólo dos semanas.

5. Las células metastásicas del retinoblastoma hacia el humor vítreo o la cámara anterior del ojo, que son similarmente avasculares, las células se mantienen viables, pero sin reproducirse.

6. En cuanto a los tumores sólidos, los niveles de timidina tritiada (^3H), el índice de células tumorales disminuye gradualmente a medida que se incrementa la distancia entre ellas y el capilar más próximo.

7. El carcinoma de ovario metastatiza a la membrana peritoneal de manera microscópica, mantiene sus dimensiones hasta que son vascularizadas.

8. La aparición de neovascularización en la base de un melanoma se asocia al crecimiento y aparición de metástasis. Las metástasis son raras antes de la neovascularización.

DETERMINACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

La actividad angiogénica se evalúa mediante el *índice de densidad microvascular* (DMV), que equivale al número de vasos de neoformación cuantificados mediante microscopia de luz en un campo de X200 (10x ocular y 20x objetivo). La cifra mayor de vasos en este campo, idealmente determinada por dos o tres patólogos, representa el índice de la densidad microvascular.

Básicamente los especímenes quirúrgicos son analizados a partir de la deshidratación de los bloques de parafina, cuidando que la región a estudiarse efectivamente posea células neoplásicas, e inmediatamente se procede a la realización de los rebajes en los bloques de parafina y a aplicar los anticuerpos seleccionados.

El índice de la DMV es difícil de determinar en especímenes de tejido mediante la simple visualización con tinciones tradicionales de hematoxilina-eosina (HE), por el diminuto tamaño en estos capilares, se requieren de marcadores específicos como el factor VIII, CD-33 y CD-34, del endotelio vascular, que permitan identificar la actividad angiogénica.

EVIDENCIA CLÍNICA

La primera evidencia cuantitativa de la intensidad de angiogénesis se efectuó en melanoma cutáneo en humanos. En tejido de carcinoma invasor de la mama de pacientes con metástasis demostradas se cuantificó 101 de índice de la DMV en un

campo de 200X (DS = 49.3, rango: 16-220); sin embargo, en pacientes sin evidencia de enfermedad metastásica, el índice de DMV fue de 45 por 200X (DS = 21.1, rango: 15-100); esta diferencia posee significancia estadística mediante el análisis univariado, $p < 0.003$. Así mismo se demostró que por cada 10 microvasos más cuantificados en 200X, el riesgo de metástasis se incrementaba 1.59 veces (IC: 95%; 1.19-2.12; $p = 0.003$). De esta manera se confirmó que el 100% de los pacientes con metástasis poseían más de 100 microvasos en un campo de 200X; al compararse mediante un análisis multivariado, se demostró que el índice de DMV era el mejor predictor de enfermedad metastásica al compararse con el tamaño del tumor, grado de diferenciación y ganglios negativos.

Bolsari y colaboradores demostraron, en pacientes con carcinoma invasor de la mama, que el índice de la DMV era significativamente superior en los casos con ganglios positivos *versus* ganglios negativos ($p < 0.001$). Con excepción de la permeación vascular y linfática, este índice tuvo mejor valor predictivo de manera independiente incluso que la ploidía y la fracción S del ciclo celular, expresión de oncoproteínas *c-erbB2*, procatepsina-D, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los receptores para estrógenos y progesterona.

Weidner y asociados reportaron que el riesgo de enfermedad metastásica en pacientes con carcinoma invasor de la mama se incrementaba con el índice de la DMV. La prevalencia fue del 45% entre aquellos tumores cuyo conteo vascular osciló entre 34 y 67; fue del 71% si la cifra se encontraba entre los 68 y 100 vasos, y del 100% cuando la DMV fue de 100 o más neovasos.

Gasparini y su grupo identificaron, en pacientes con carcinoma de mama invasor y axila negativa, que al compararse la DMV contra la expresión de p53, invasión vascular y linfática, oncogen *c-erbB-2* y el tamaño del tumor. Ellos también enfatizan que la determinación de la angiogénesis permitiría al clínico obtener mayor información acerca de la conducta biológica del tumor e influir en la decisión sobre la terapia adyuvante.

Wiggings, Obermair y Cantú de León han demostrado, en especímenes de pacientes con carcinoma de cérvix, que la angiogénesis es un factor independiente predictor para recurrencia sobre todo en pacientes con ganglios negativos.

En neoplasias de cabeza y cuello, los resultados han sido contradictorios, dado que algunos autores han encontrado que la angiogénesis es un factor pronóstico independiente para enfermedad metastásica

y recurrencia (como lo describimos en el Instituto Nacional de Cancerología), en cáncer de cavidad oral, pero otros autores no han observado esto; sin embargo, podría estar dado por las características de sus muestras y las pruebas estadísticas aplicadas.

La proporción de la DMV generalmente es similar a la capacidad angiogénica del tumor primario, y simultáneamente de su capacidad metastásica, la replicación por lo general es de tipo geométrico una vez que existe ruptura de la membrana basal y el tumor se encuentra en su fase vascular, lo cual se correlaciona directamente con la agresividad del tumor; así, los sarcomas y los melanomas generalmente poseen mayor capacidad de angiogénesis y, en forma temprana en la evolución natural de estas neoplasias, se presentarán células metastásicas. Sin embargo, la diseminación se efectúa mediante células aisladas, las cuales en su mayoría son secuestradas por el mecanismo inmune del individuo; aun así, algunas logran prevalecer y originar focos metastásicos, a diferencia de los carcinomas de mama, cérvix, cabeza y cuello en donde la diseminación se efectúa por grupos celulares mayores; la proporción del infiltrado linfocitario es sumamente mayor alrededor de estos grupos celulares y ello es responsable que prevalezcan y se consoliden en una metástasis.

El modelo quizás más representativo ha sido en carcinoma de mama, en donde los canalículos que poseen focos de carcinoma *in situ* se encuentran completamente rodeados por anillos de neovascularización, los cuales se interpretan como carcinoma *in situ* angiogénesis-dependiente; en particular en estos casos, a medida que se identifican con un índice de DMV por encima de 33 vasos de neoformación, la probabilidad de que exista enfermedad metastásica o que se presente ésta es mayor en forma directamente proporcional, en pacientes inicialmente con ganglios axilares negativos, de acuerdo al modelo de análisis de regresión logística, en grados 1-4, según el número de vasos de 80, 87, 129 y 149, es de 0.74, 0.96, 0.79 y 0.97 respectivamente.

El *fenómeno de angiogénesis* generalmente es independiente de la invasividad de un tumor. Ésta siempre se asocia con angiogénesis, y la identificación de la angiogénesis siempre es predictora de invasividad del tumor. La velocidad de replicación de los que codifica para las proteínas inductoras de angiogénesis (trombospondina; inhibidor de la proliferación endotelial y angiogénesis), cuya expresión puede detener la replicación de la neovascularización, este elemento simultáneamente ha sido empleado como blanco en la *terapia antiangiogénica*.