



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina. Universidad de Málaga

VEGF-A Y COX-2 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL CARCINOMA DE MAMA

Lidia Pérez Villa

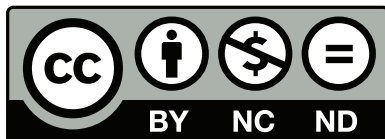
Málaga, 2011



SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: Lidia Pérez Villa

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):
[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar,
transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de
la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Prof. Dr. Luis Vicioso Recio, Prof. Titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

CERTIFICAN:

Que DÑA. **LIDIA PÉREZ VILLA**, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral "**VEFG-A Y COX-2 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL CARCINOMA DE MAMA**", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D. L. Vicioso

Prof. Dr. D. A. Matilla

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de casi una década transcurrida desde el comienzo de este trabajo de tesis doctoral, tengo una lista interminable de personas a las cuales me gustaría agradecer su inestimable ayuda, tanto a nivel laboral como personal.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al **Prof. Dr. D. Alfredo Matilla**, Catedrático, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica y director de este trabajo, que con su envidiable entusiasmo permanente y generosidad ha conseguido despertar mi curiosidad por la investigación clínico-patológica; así como, por haberme brindado la oportunidad de ser su discípula desde los inicios de mi trayectoria profesional.

Al **Prof. Dr. D. Luís Vicioso**, director y tutor, no sólo de este trabajo sino en el camino de formación como patóloga, por sus horas de enseñanza y paciencia, por transmitirme la importancia de la metodología y meticulosidad en el trabajo, y sobre todo por confiar en la viabilidad del trabajo, a pesar del tiempo transcurrido.

A todos los componentes del **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Victoria** de Málaga (tanto actuales como pasados), por hacerme sentir, en mayor o menor medida, como en casa.

A "la jefa" y a "mis niñas", por su apoyo e innumerables horas dedicadas a que esta tesis viera la luz, son el pilar de este trabajo.

A las incansables "abuelas", por ofrecerme siempre la logística necesaria para ejercer mi actividad laboral.

A mis padres, por brindármelo todo sin pedir nada a cambio.

A Floren, por saber comprenderme y por darme lo más bonito que tengo en la vida.

A todos aquellos, que de una u otra manera aportaron su granito de arena.

MUCHAS GRACIAS.

ABREVIATURAS

cols: colaboradores

COX: ciclooxigenasa

FAK: kinasas asocias a las adhesiones focales

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

HIF: factor inductible por la hipoxia

Kb: Kilobases

Kd: Kilodalton

DMD: densidad de microvasos

DT: desviación típica

EGF: factor de crecimiento epidérmico

HGF: factor de crecimiento de los hepatocitos

IL: interleuquinas.

MMP: metaloproteinasas

MTI-MMP: metaloproteinasa 14

NO: óxido nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI: inhibidor de activador del plasminógeno

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PG: prostaglandinas

PG I2: prostaciclina

RE: receptores de estrógenos

RGD: residuos de argininoglicina-ácido aspártico

RP: receptores de progesterona

Sig: significación

SLG: supervivencia libre de enfermedad

SG: supervivencia global

TAMs: macrófagos asociados al tumor

TGF: factor de crecimiento transformante

TSP: trombospondina

TXA: tromboxanos

u-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa

t-PA: activador del plasminógeno tipo tisular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

VHL: Von Hippel Lindau

VPF: factor de permeabilidad vascular

ÍNDICE

B. VEGF	
1. VEGF y la angiogénesis	25
2. Isoformas de VEGF	27
3. VEGF como factor pronóstico	29
C. Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	
1. COX-2 y la angiogénesis tumoral	36
2. COX-2 como factor pronóstico	39
D. Papel de los macrófagos en la angiogénesis	42
E. Cuantificación de la angiogénesis	43
1. Método de Weidner	47
2. Método de Chalkey	49
3. Análisis computerizado de la imagen	50
4. Métodos complementarios	53
II: PLANTEAMIENTO DEL TEMA	56
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
A. Selección de las muestras	61
B. Datos recogidos de cada caso	61
C. Estudio histopatológico	62
D. Estudio inmunohistoquímico	62
E. Valoración de los resultados	64
F. Análisis estadístico	70
IV. RESULTADOS	
A. Estadística descriptiva	73
1. Parámetros clínico-patológicos	73
2. Parámetros relacionados con la angiogénesis	76
3. Expresión de CD 68	77
B. Estadística analítica	
1. Relación del VEGF en las células tumorales con factores histopatológicos	78

2. Relación del VEGF en las células tumorales con la expresión de marcadores inmunohistoquímicos	80
3. Relación del VEGF en los macrófagos con factores histopatológicos	85
4. Relación del VEGF en los macrófagos con la expresión de marcadores inmunohistoquímicos	87
5. Relación de la COX-2 con factores histopatológicos	90
6. Relación COX-2 con la expresión de marcadores inmunohistoquímicos	92
7. Relación del índice macrofágico (CD68) con factores histopatológicos	95
8. Relación del índice macrofágico con la expresión de marcadores inmunohistoquímicos	98
9. Relación de la densidad de microvasos con factores histopatológico	100
C. Estudio de la supervivencia global en relación con factores angiogénicos	101
V. DISCUSIÓN	108
VI. CONCLUSIONES	126
VII. BIBLIOGRAFÍA	129
VIII. ANEXO	146

I. INTRODUCCIÓN

A. ANGIOGENESIS

La angiogénesis es el proceso por el cual se producen vasos sanguíneos a partir de otros ya establecidos. Este concepto hay que diferenciarlo de otros como son la vasculogénesis y la arteriogénesis.

La vasculogénesis ocurre en el periodo embrionario y consiste en la formación de vasos "de novo", por diferenciación de precursores mesodérmicos que se diferencian en angioblastos. De éstos se desarrollan las células endoteliales que coalescen para formar los cordones angioblásticos que se fusionan para formar los plexos angioblásticos, estableciendo la configuración inicial del sistema circulatorio.

La arteriogénesis es el crecimiento de arteriolas colaterales preexistentes que intentan compensar la función de alguna arteria ocluida.

La angiogénesis se encuentra regulada por una serie de factores angiogénicos y antiangiogénicos. En el adulto la red vascular está en estado quiescente. Sin embargo, la angiogénesis se puede activar ante determinados estímulos, cuando el organismo requiere una mayor cantidad de nutrientes, y esta activación puede ser transitoria o mantenida.

La angiogénesis es transitoria en la cicatrización de las heridas y en la transformación cíclica de estructuras del sistema reproductor femenino como son: formación del cuerpo lúteo, regeneración del endometrio funcional, en el desarrollo de estructuras placentarias y cambios relacionados con la lactación en la glándula mamaria.

En determinadas enfermedades como la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la psoriasis y los hemangiomas, y en la progresión tumoral aparece una angiogénesis mantenida y persistente.

La angiogénesis ha sido estudiada en múltiples neoplasias, entre ellas los carcinomas mamarios^{1,2}.

1. ETAPAS DE LA ANGIOGÉNESIS:

La angiogénesis es un proceso complejo que comprende una serie de etapas, las cuales pueden esquematizarse de la siguiente forma:

- Estímulo angiogénico (activación de células endoteliales y pericitos).
- Degradación de la matriz extracelular.
- Migración de células endoteliales.
- Proliferación de células endoteliales y formación de una nueva luz capilar.
- Estabilización de los nuevos vasos.

1.1 Estímulo angiogénico

La hipoxia es el principal factor desencadenante de la angiogénesis. Esta induce un incremento en la célula del factor inducible por la hipoxia (HIF-1), que en el núcleo promueve la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran dos potentes factores angiogénicos como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF)³.

La unión de estos factores a los receptores de las células endoteliales induce la fosforilación de distintas proteínas, activándose así las señales de supervivencia para estas células.

Por otro lado, la apoptosis, o proceso por el cual se produce una muerte celular programada, es también fundamental en la remodelación de los vasos sanguíneos, ya que así, se eliminan los vasos no necesarios, aunque parece que la apoptosis es necesaria en la iniciación del proceso angiogénico. La apoptosis de las células endoteliales se produce por la pérdida de adhesión al sustrato.

En el proceso angiogénico existen factores que promueven la apoptosis de las células endoteliales y otros que ejercen un cierto efecto protector sobre el endotelio, promoviendo la supervivencia y la proliferación de los mismos.

Por lo tanto, durante la angiogénesis no solo se establece un equilibrio dinámico entre señales pro y antiangiogénicas, sino también entre señales de supervivencia y de muerte celular.

Entre los factores que promueven la apoptosis de la célula endotelial caben señalar varios factores de los que hablaremos posteriormente, como son: el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento transformante α (TGF α), y por otro lado hay factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) que son factores de supervivencia. Estos factores pueden conseguir su acción activando a la protein-quinasa B (Akt) a través de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3k), lo que constituye una vía clave en la activación endotelial, ya que transmite señales de supervivencia, migración y proliferación.

La PI3k, a través de receptores tirosinquinasa, produce fosforilación de fosfoinosítidos. Así se reclutan a la membrana celular moléculas esenciales para la supervivencia, motilidad y participación en procesos morfogénicos como la tubulogénesis⁴.

La PI3k produce una fosforilación de Akt. Akt tiene una distribución citoplásmica pero su fosforilación provoca un reclutamiento hacia la membrana celular. De esta forma queda expuesto un dominio quinasa que quedaba oculto en su forma inactiva. Este dominio quinasa de Akt en la membrana es activado por dos proteínquinasas de membranas que son PDK 1 y 2. De esta forma Akt vuelve al citoplasma en su forma activa y ejerce la fosforilación de distintos efectores relacionados con la supervivencia celular, proliferación del metabolismo de la glucosa y síntesis de proteínas⁵.

La activación de Akt también puede producirse por una segunda vía, protagonizada por las integrinas que se conectan a sus ligandos de la matriz extracelular, lo que produce la activación de quinastas asociadas a las adhesiones focales (FAK)⁶, las cuales actúan sobre Akt. Las adhesiones focales son regiones concretas de la superficie celular en las que se concentran moléculas de adhesión al sustrato (sobre todo integrinas) y numerosas proteínas que conectan estas moléculas al citoesqueleto.

Algunos factores como VEGF consiguen igualmente una mayor supervivencia de las células endoteliales provocando un incremento de los niveles de las proteínas antiapoptóticas A1 y bcl-2.

Además, la activación del receptor VEGFR2 por VEGF favorece la proliferación celular. VEGF fosforila y activa a la fosfolipasa C que cataliza la síntesis de diacilglicerol e inositol1, 4, 5 trifosfatos que activan a la proteínquina C. Dicha enzima activa una importante vía de proliferación celular^{7,8}.

1.2 Degradación de la matriz extracelular

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales y células de sostén que están ancladas en una matriz extracelular. Para que se lleve a cabo el proceso angiogénico hay que "romper" esta matrix extracelular.

La degradación de la matriz celular se produce a través de una serie de proteasas que se liberan tras el estímulo angiogénico. Su consecución es necesaria para la posterior migración celular; además, se precisa la formación de sitios de anclaje que hagan posible el desplazamiento.

Cuando los factores angiogénicos activan a las células endoteliales, inducen la expresión de activadores del plasminógeno, tipo uroquinasa (u-PA) y tisular (t-PA)⁹. Estos activadores convierten al plasminógeno en plasmina, una potente proteasa que activa a los precursores de las metaloproteinasas de matriz, iniciándose así la degradación proteolítica.

Existen múltiples metaloproteinasas de matriz extracelular, de las que la tipo 2 es la que mayor importancia presenta en la angiogénesis. De hecho se considera fundamental para la adquisición del fenotipo angiogénico¹⁰. La MMP-2 degrada a las proteínas que constituyen la membrana basal, como son el colágeno IV y la laminina. La metaloproteinasas-2 (MMP-2) está expresada en la mayoría de las células. Se segrega de forma inactiva y se activa a través de otra metaloproteinasas de membrana, la MT1-MMP (MMP-14), que está regulada por las células perivasculares.

Es esencial controlar la actividad proteolítica en áreas concretas de la superficie celular. Esto se consigue gracias a la unión de las metaloproteinasas a las integrinas¹¹, proteínas de membrana celular mediante las que la célula se adhiere al sustrato y transmite señales desde el exterior al interior de la célula¹².

1.3 Migración de las células endoteliales

Una vez producida la degradación de la lámina basal, ocurre la migración de células endoteliales, que protuyen de la pared del vaso y migran a través del espacio intersticial.

Algunos factores angiogénicos pueden provocar señales de migración, transmitidas por su receptor de membrana que provoca la fosforilación y activación de FAK, protein-quinasa asociada a las adhesiones focales. Las adhesiones focales son regiones concretas de la superficie celular en las que se concentran moléculas de adhesión al sustrato (sobre todo integrinas) y numerosas proteínas que conectan estas moléculas al citoesqueleto. Estas adhesiones focales desempeñan fundamentalmente una función mecánica en la migración, aunque también están involucradas en otros procesos celulares.

Cuando la célula endotelial migra dentro del intersticio, otras células endoteliales le siguen y forman cordones en el estroma perivascular. Existen dos tipos diferentes de migración:

- *Configuración bipolar o bicelular*: dos o más células endoteliales migran desde la pared del vaso hacia el espacio perivascular, cargadas de polirribosomas y abundantes filamentos intermedios.
- *Formación lineal*: una única célula proyecta sus pseudópodos, migrando dentro del tejido conectivo que rodea las paredes capilares.

Para la migración de las células endoteliales se requiere interacción con moléculas de la matriz extracelular, como son la fibronectina, laminina y vitronectina, en la que intervienen las integrinas. Las integrinas son una amplia familia de proteínas transmembrana que se forman por heterodimerización de unidades alfa y beta. Existen más de 15 subunidades alfa distintas, y 8 subunidades beta. Estas subunidades

forman 20 combinaciones distintas, de las cuales la más implicada en la angiogénesis es la integrina $\alpha v \beta 3$.

La migración de las células endoteliales se produce por la unión de las células a unos residuos de aminoácidos que quedan expuestos en la matriz por proteólisis del colágeno. Estos residuos de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) son reconocidos por la integrina $\alpha v \beta 3$ expresada en la superficie endotelial. La célula endotelial utiliza la unión RGD como una matriz provisional para desarrollar y coordinar su capacidad de adhesión y de invasión durante la angiogénesis.

La integrina $\alpha v \beta 3$ es crítica para la diferenciación, maduración y supervivencia de los vasos, y está presente en la superficie del endotelio activado, permitiendo la expansión de las células y la creación de luces vasculares¹³.

En resumen, las integrinas son proteínas de membrana celular gracias a las cuales la célula se adhiere al sustrato y transmite señales desde el exterior al interior de la célula¹².

Otras moléculas de adhesión celular son las cadherinas, proteínas de membrana gracias a las cuales se producen uniones intercelulares entre células homólogas. La cadherina presente en las células endoteliales es una cadherina específica, la VE-cadherina o cadherina-5. Su papel en la angiogénesis es poco conocido, aunque se sabe que su deficiencia inhibe la transmisión de la señal de supervivencia dependiente de factores angiogénicos, induciendo la apoptosis. VE-cadherina aparece asociada espacialmente con los receptores de factores angiogénicos, sugiriendo algún tipo de interacción esencial para la transmisión de la señal angiogénica⁴.

A lo largo de un vaso neoformado se observa una variación de la composición de la matriz extracelular que rodea a las células endoteliales según la zona.

Así, en la zona más distal del brote vascular las células muestran mayor proliferación y se rodean de colágeno tipo V y de fibronectina, mientras que en la región más proximal las células se estabilizan, recubriéndose de membrana basal compuesta por fibronectina, laminina 1 y colágeno de tipo IV¹⁴.

1.4 Proliferación de las células endoteliales y formación de una nueva luz capilar

El último paso en el proceso angiogénico es la formación de nuevos vasos. Se trata de una etapa no bien caracterizada, aunque perfectamente controlada en el tiempo y en el espacio, de modo que las células endoteliales proliferantes no ocluyen la luz de los capilares que se van formando. A medida que el nuevo brote se forma, algunas de las células han de volver a estado de quiescencia para formar las paredes de los nuevos capilares, incrementar su adhesividad a otras células endoteliales, comenzar a producir la lámina basal y la matriz extracelular, y reclutar las células perivasculares necesarias para estabilizarlos.

Para la formación de los nuevos vasos sanguíneos es fundamental que estas células se adhieran. Las integrinas, esenciales en la activación endotelial, también desempeñan una importante función en la morfogénesis de los nuevos vasos, ya que aumentan la adhesión entre las células endoteliales, y entre éstas y el sustrato.

La integrina $\alpha6\beta1$ es el principal mediador de la adhesión de las células endoteliales a la laminina.

1.5 Estabilización de los nuevos vasos

La maduración de los nuevos vasos incluye la creación de una nueva membrana basal, y la estabilización de dichas estructuras vasculares por el recubrimiento de células de soporte, como las células musculares lisas en grandes vasos, o los pericitos en los capilares¹⁵.

Los pericitos son las células perivasculares que rodean a los capilares y se cree que derivan de células musculares lisas preexistentes, contribuyendo a la estabilización de los capilares, gracias al control del equilibrio proteolítico¹⁶.

Experimentos in vivo sugieren que los vasos que no llegan a rodearse de células de soporte, requieren factores angiogénicos para su supervivencia. Mientras que los vasos maduros y estables pueden sobrevivir en ausencia de dichos factores¹⁷.

Los factores angiogénicos estimulan el desarrollo y migración de los pericitos, contribuyendo así a la estabilización vascular y, a su vez, actúan como potentes factores quimiotácticos atrayendo a las células musculares lisas¹⁸.

Por otro lado, existen factores específicos para las células endoteliales, con funciones de estabilización y mantenimiento de los vasos maduros, y que promueven la interacción entre las células endoteliales y musculares lisas¹⁹.

2. FACTORES QUE REGULAN LA ANGIOGENESIS

Existen diversos factores implicados en la angiogénesis, unos con acción proangiogénica y otros antiangiogénica, de forma que cuando existe un balance positivo a favor de los factores angiogénicos se produce la angiogénesis.

Los principales factores proangiogénicos son: VEGF, factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante β (TGF β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquinas (IL).

Entre los factores anti-angiogénicos se encuentran la angiostatina, endostatina, trombospondina-1, angiopoyetina-2, interferon- α , interleuquina 12.

2.1 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF también conocido como VPF (factor de permeabilidad vascular) o vasculotropina es una glicoproteína básica homodimérica de 34-42 kDa, ligadora de heparina, formada por polipéptidos con extremo N terminal idénticos unidos por puentes disulfuro que es secretada y expresada por múltiples células de origen humano y animal²⁰. VEGF induce la neoangiogénesis estimulando la proliferación, permeabilidad y migración capilar²¹.

VEGF es un potente mitógeno para las células endoteliales procedentes de arterias, venas y linfáticos pero carece de actividad mitogénica sobre otros tipos celulares²².

El descubrimiento de que VEGF era difusible y específico para las células endoteliales llevó a la hipótesis que esta sustancia jugase un papel fundamental en la regulación del crecimiento de los vasos, tanto en situaciones fisiológicas como en procesos patológicos²³.

Existen distintos tipos de VEGF²⁴: VEGF-A (también conocido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La acción de VEGF-B no es bien conocida, VEGF-C y VEGF-D se relacionan con la linfangiogénesis²⁵ y de VEGF-E se sabe que está codificado por el genoma del virus orf.

En las células endoteliales se encuentran los receptores de VEGF, denominados VEGFR1/flt-1 y VEGFR2/flk-1. Al igual que ocurre con el VEGF, la hipoxia también aumenta en número de estos receptores.

El VEGFR1 se activa de manera directa, mientras que VEGFR2 aumenta como resultado de señales procedentes de los tejidos isquémicos.

La vía más utilizada por VEGF es VEGFR2, e incluso se cree que VEGFR1 sería un regulador negativo de VEGFR2, ya que compiten por el VEGF existente.

2.2 Factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF)

El factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) es la enzima timidina fosforilasa que, al metabolizar la timidina, produce metabolitos, que ejercen un efecto quimiotáctico sobre las células endoteliales. Este metabolito es la 2-desoxirribosa, la cual por sí sola ejerce una acción angiogénica. Además, tanto la 2-desoxirribosa como la timidina protegen a las células endoteliales de la apoptosis que induce la hipoxia.

2.3 Angiopoyetinas

Otros factores implicados en la angiogénesis son las angiopoyetinas, de las que existen cuatro tipos, aunque las más estudiadas son la angiopoyetina 1 y 2. Estas actúan uniéndose al receptor tirosinquinasa Tie 2/Tek.

La angiopoyetina 1 es producida por las células perivasculares y mantiene el endotelio en estado quiescente, además está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de los vasos²⁶, y es necesaria para hacer que los vasos maduros sean insensibles al VEGF y parece favorecer el crecimiento en diámetro del vaso²⁷. La angiopoyetina 2 se estimula en función de la hipoxia.

Ambas angiopoyetinas compiten por el mismo receptor produciendo una alteración en el estado de quiescencia endotelial. En condiciones en las que se estimula la angiogénesis, una región del vaso maduro se desestabiliza, haciéndose sensible al VEGF. La angiopoyetina 2 parece tener un papel clave en esta desestabilización, actuando como antagonista de la angiopoyetina 1²⁸. El vaso desestabilizado experimenta la formación de un brote angiogénico cuando está presente VEGF, o involuciona si no lo está.

2.4 Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Existen varios tipos de factores de crecimiento fibroblástico de los cuales algunos son directamente angiogénicos y otros no.

El factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), también denominado factor de crecimiento fibroblástico β , fue el primer factor angiogénico reconocido²⁹.

El factor vascular de crecimiento-1, también denominado factor de crecimiento fibroblástico α , comparte muchas de sus características angiogénicas.

Sin embargo, el factor de crecimiento fibroblástico-7, también denominado KDF (factor de crecimiento de queratinocitos), no es directamente angiogénico, aunque induce la producción de VEGF, por lo que tendría un papel indirecto en el proceso de la angiogénesis.

El FGF-2 se expresa en casi todos los tipos celulares. Este factor es un importante mitógeno, modula la diferenciación, inhibe la apoptosis y es quimiotáctico. En definitiva, interviene en las funciones de reparación, regeneración y homeostasis tisular.

Está presente en las células endoteliales induciendo la proliferación, la atracción quimiotáctica y un incremento en la expresión de uroquinasa³⁰.

Presenta una alta afinidad por la heparina, uniéndose a proteoglicanos del tipo heparan sulfato. Se puede considerar por lo tanto que la matrix extracelular sería una reserva de FGF en estado latente. Cuando VEGF inicia el proceso angiogénico se desencadena una proteólisis que induce la liberación de FGF-2 activo, por lo que así se amplifican los efectos de VEGF.

Los factores de crecimiento fibroblástico se unen a receptores tirosinquinasa. En dichas uniones pueden actuar diversos proteoglicanos con cadenas heparan sulfato, debido al dominio de unión a heparina de los

FGF. Se piensa que la presencia de heparina estabiliza y prolonga la unión de los FGF a sus receptores, aumentando así la transmisión de la señal³¹.

2.5 Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF)

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una proteína que participa en diversos procesos embrionarios, fundamentalmente relacionados con la organogénesis.

El HGF actúa en la disociación celular, en la adquisición de motilidad y capacidad invasiva y promueve la morfogénesis en diversos tipos epiteliales (células renales y mamarias)³².

Además, el HGF estimula la morfogénesis de los capilares, protege de la apoptosis a las células endoteliales y estimula su migración y sus capacidades invasivas, de ahí su importancia como factor angiogénico.

El HGF se expresa en los fibroblastos y en células perivasculares, se secreta de forma inactiva y requiere de una activación proteolítica.

El receptor del HGF es el producto del protooncogen c-met, que es un receptor tirosinquinasa expresado por los epitelios y presente en las células endoteliales³³.

Las células estimuladas por HGF producen un aumento en la expresión del factor de transcripción Ets-1. Este factor induce la expresión de proteasas como el activador del plasminogéno tipo uroquinasa y el receptor del activador del plasminogéno tipo uroquinasa. Así se produciría un fenómeno de retroalimentación positiva, ya que estas proteasas activarían al HGF inactivo³⁴.

2.6 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico es un inductor indirecto de la angiogénesis, debido a la capacidad de inducir la expresión de VEGF y Ets-1 en las células tumorales.

Por otro lado, el factor de crecimiento epidérmico induce la expresión de la "proteína ligadora" del FGF. Este "proteína ligadora" de FGF es un activador del FGF-1 y FGF-2, que produce, por lo tanto, un incremento de las señales angiogénicas³⁵.

2.7 Factor de crecimiento transformante β (TGF β)

Hay tres tipos de factores de crecimiento transformante β que se relacionan con el proceso angiogénico: TGF 1, 2 y 3.

Los TGF β son indirectamente proangiogénicos ya que producen un efecto quimiotáctico sobre células inflamatorias que producen VEGF, FGF-2, TNF- α y PDGF, que son factores directa o indirectamente inductores de angiogénesis³⁶. Además de su capacidad para inducir la angiogénesis, los factores de crecimiento transformante β están relacionados en la maduración y estabilización endotelial.

La estimulación de las células endoteliales por la angiopoyetina-1 procedente del mesénquima induce la producción endotelial de PDGF-B, un factor que atrae células mesenquimales y provoca la activación de TGF β latente, induciendo la diferenciación del mesénquima en células perivasculares³⁷.

2.8 Factor de necrosis tumoral α

El factor de necrosis tumoral α induce la angiogénesis por distintas vías, favorece la angiogénesis de forma indirecta ya que aumenta la respuesta

inflamatoria. Pero también, produce en las células endoteliales un aumento de expresión de VEGF, IL-8 y FGF-2, promoviendo así la angiogénesis³⁸.

2.9 Interleuquinas (IL)

Existen diversas interleuquinas relacionadas con la angiogénesis, algunas de las cuales, como las IL-1, IL-6, IL-15, producen un aumento de la expresión de VEGF en algunos tipos celulares.

La interleuquina IL-13, que es antiinflamatoria, posee propiedades quimiotácticas para el endotelio por lo que también podría actuar en el proceso angiogénico.

La interleuquina 8 se ha demostrado que es angiogénica in vitro e in vivo, induciendo la angiogénesis a través de macrófagos³⁹.

También se ha demostrado que la interleuquina 8, in vitro, induce la proliferación en las células endoteliales.

2.10 Trombospondina-1 (TSP-1)

La trombospondina-1 (TSP-1) es un potente inhibidor multifuncional de la angiogénesis que modula la adhesividad de la célula endotelial, motilidad y la actividad proteolítica impidiendo la acción de los inductores de la angiogénesis.

Es una glicoproteína trimérica de gran peso molecular liberada por los gránulos α de las plaquetas en respuesta a la estimulación por parte de la trombina, y es también, un componente transitorio de la matriz extracelular en el desarrollo y la reparación tisular, siendo secretada por múltiples células de la pared vascular, incluyendo las células musculares lisas y las células endoteliales.

La TSP-1 liberada por las plaquetas activadas participa en la formación y resolución del coágulo de fibrina, uniéndose a la fibrina, el plasminógeno y la uroquinasa. También participa en la respuesta inflamatoria a través de la formación de puentes entre las plaquetas y los leucocitos reclutados en el foco inflamatorio⁴⁰.

En las células endoteliales, la TSP-1 puede inhibir la proliferación, la formación de adhesiones focales desestabilizando los contactos de la matriz extracelular, inducir la apoptosis endotelial e inhibir la angiogenesis.

Cada vez existen más evidencias de que la TSP-1 puede ser un modulador natural de la angiogénesis, dominando una regulación positiva o negativa dependiendo del contexto y de la concentración de la misma. Por ejemplo, es capaz de activar TGF- β , que es un factor angiogénico y en presencia de colágeno tipo I la TSP-1 inhibe la neoformación vascular.

Existen diversas situaciones capaces de inducir la expresión de TSP-1 como son: la hipoxia, el producto del gen supresor tumoral p53, TGF- β , PDGF y el FGF-b. Entre los factores capaces de inhibir la expresión de TSP-1 destacan la IL-1 y el factor de necrosis tumoral α .

2.11 Angioestatina

La angioestatina, es un agente antiangiogénico derivado de la proteólisis del plasminógeno, se piensa que tiene un efecto antiangiogénico derivado del bloqueo de las señales HGF en el endotelio⁴¹.

2.12 Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico lo producen las células endoteliales y tiene un efecto relajante en las células musculares lisa, controlando el flujo sanguíneo. El

aumento de NO provoca una vasodilatación, incrementando la permeabilidad vascular. Además, el NO potencia la supervivencia de VEGF, ya que inactiva a las caspasas y estimula la proliferación del endotelio.

Tiene un efecto bifásico sobre otro modulador angiogénico, la trombospondina; a dosis extremas (elevadas o bajas) disminuye la expresión de trombospondina, mientras que a dosis intermedias aumenta dicha expresión.

3. ANGIOGENESIS TUMORAL

3.1 Definición

Los vasos sanguíneos son un componente importante en el estroma tumoral, ya que el tumor necesita de oxígeno y nutrientes. Hasta que el tumor alcanza un tamaño de 1 a 2 mm³ recibe todos los nutrientes y el oxígeno por difusión simple. Una vez que el tumor alcanza un mayor tamaño necesita generar neovascularización que permita el aporte sanguíneo necesarios para continuar su desarrollo.

En los experimentos llevados a cabo por Folkman y cols. en la década de 1960 a 1970, inoculando células tumorales en órganos aislados y perfundidos, se demostró que la ausencia de angiogénesis se asociaba a una restricción del crecimiento tumoral a pequeños esferoides de 1 mm³ o menos. Esta fue la primera vez que se consiguió que tumores viables crecieran como masas tridimensionales en un tejido sin neovascularización. Cuando se trasladaba el pequeño tumor al ratón del que provenía desarrollaba neovascularización y crecía alcanzando tamaños 1000 veces superiores al obtenido en el órgano aislado⁴². A partir de estos estudios, Folkman, en 1970, formuló la hipótesis de que el

crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente y que los nuevos vasos sanguíneos son necesarios cuando el diámetro de la masa tumoral es mayor de 1-2 mm, puesto que la nutrición no la pueden conseguir por difusión pasiva⁴³.

En 1976 Gullino realizó un experimento con ratones neozelandeses, en los que valoró la capacidad de neovascularización de tejido mamario sano, preneoplásico y neoplásico, implantando pequeñas biopsias en el iris de estos ratones. Observó como el 90% de los tumores mamarios implantados producían neovascularización en 48-72%, la administración de corticoides cedía la inflamación postcirugía, pero no afectaba al crecimiento de neovasos. Sin embargo, solo el 6% de los tejidos sanos inducía alguna proliferación vascular. Además, observó que el 30% de las lesiones preneoplásicas producían un patrón de crecimiento vascular similar al de los implantes tumorales, demostrando así que las células de los tejidos precancerosos en el proceso de transformación neoplásica adquieren capacidad angiogénica⁴⁴.

La angiogénesis no es solo necesaria para la nutrición tumoral sino que también es fundamental para la diseminación metastásica. En la producción de las metástasis es necesario que el tumor esté vascularizado para que las células neoplásicas tengan una vía por donde puedan ser vehiculizadas. Además, cuando estas células neoplásicas llegan al lugar diana también necesitan de la angiogénesis para su nutrición en su nueva ubicación.

La actividad angiogénica de cada tumor dependerá del balance entre señales proangiogénicas y antiangiogénicas.

Los factores antiangiogénicos pueden actuar inhibiendo la proliferación celular o inhibiendo la quimiotaxis, y estos pueden actuar desde la circulación o en la matrix extracelular.

Estos factores que actúan en la angiogénesis tumoral pueden derivar de las células neoplásicas, de las células endoteliales, de las células adyacentes o actuar por mecanismos no bien aclarados⁴⁵.

Las células tumorales presentan un aumento de la secreción de una serie de factores angiogénicos tales como VEGF, TGF α y β , bFGF.

Además, las células tumorales son capaces de desencadenar la diferenciación de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos a través de la liberación de enzimas proteolíticas y produciendo alteraciones en las células estromales que las rodean.

También se ha demostrado que al estimular a las células endoteliales, éstas aumentan el número de receptores en su superficie. En la transformación al fenotipo angiogénico las células endoteliales tienen que incrementar la producción de factores de crecimiento⁴⁶.

El modelo de angiogénesis tumoral es un equilibrio dinámico entre la regresión y crecimiento tumoral, regulado principalmente por VEGF y las angiopoyetinas.

En las fases iniciales de la angiogénesis tumoral se produce una regresión de los vasos presentes en el tejido implicado, antes de que los nuevos vasos se desarrollen.

Los nuevos vasos tumorales parecen "reclutar" a los vasos ya existentes. Como consecuencia de ese reclutamiento, las células endoteliales aumentan la expresión de citoquinas específicas como la angiopoyetina-2, producida por ellas mismas, y que actúa por un mecanismo autocrino sobre

los vasos tumorales como antagonista de los receptores Tie-2, conduciendo a la desestabilización vascular. Así se aumenta la plasticidad de los vasos, permitiendo iniciar el proceso de la angiogénesis y remodelación vascular.

Como ya hemos comentado anteriormente el fenotipo angiogénico se conseguirá cuando el balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos esté a favor de los estímulos proangiogénicos. Cuando esto ocurre se dice que el tumor pasa de la fase prevascular a la fase vascular.

En la fase prevascular el tumor se desarrolla sin neovascularización. Rara vez sobrepasan los 2-3 mm⁴⁷. Suelen ser lesiones asintomáticas y no detectables clínicamente. Sus células pueden crecer tan rápido como en las variedades vascularizadas pero predominan las micrometástasis, ya que la proliferación y la muerte celular se mantienen en equilibrio.

La fase vascular o angiogénica comienza cuando un subgrupo de células dentro del tumor adquiere el fenotipo angiogénico, con capacidad de inducir formación de nuevos vasos, lo que permite continuar el crecimiento tumoral^{48,49}. Además, gracias a esta vascularización las células pueden metastatizar a órganos distantes⁵⁰. Es por ello que el proceso angiogénico se considera uno de los factores más importantes en la progresión y diseminación neoplásica y en consecuencia como un factor pronóstico.

Los nuevos vasos producidos por el tumor simulan a los de la red capilar normal pero presentan notables diferencias, son vasos más proliferantes e inmaduros⁵¹. Son vasos de paredes finas y ramificaciones anormales que con frecuencia forman uniones arteriovenosas, lo que impide una perfusión adecuada. El revestimiento endotelial suele ser incompleto con

ausencia de uniones intercelulares; además, pueden faltarle componentes como la membrana basal, lo que facilita el escape de células tumorales al torrente sanguíneo, con el consiguiente riesgo de metástasis a distancia. No poseen capa muscular, pericitos ni inervación por lo que carecen de control del flujo lo que hace que el flujo sea irregular e impide la nutrición de toda la masa tumoral⁵². Incluso, en tumores muy agresivos los neovasos están compuestos por las propias células tumorales⁵³.

La vascularización es diferente según el área del tumor en la que nos encontremos. En el área tumoral central existe una continua remodelación de los vasos preexistentes, siendo éstos utilizados para la nutrición tumoral. En la periferia del tumor se encuentran las áreas más vascularizadas, en donde existe una mayor proliferación de células endoteliales; estos vasos de la periferia tumoral se comunican con la red vascular preexistente y son los denominados "puntos calientes" (hot spots). En estas áreas es donde se cuantifica la densidad vascular intratumoral, que es un parámetro utilizado para cuantificar la capacidad angiogénica tumoral.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en las neoplasias la hipoxia es la principal causa de aumento de los factores angiogénicos que ponen en marcha el proceso angiogénico. Resulta lógico pensar que el crecimiento desmesurado de los tumores provoca déficit de la tensión de oxígeno en sus células formándose en ellas señales, como HIF-1, capaces de activar la secreción de factores angiogénicos⁵⁴.

3.2 Influencia en la angiogénesis de otros factores tumorales

La expresión de algunos factores angiogénicos está regulada además por otros estímulos, incluyendo factores de crecimiento y productos de

oncogenes o genes supresores, producidos por el propio tumor y que pueden actuar de forma autocrina o paracrina. Factores hormonales, como los estrógenos, activan la producción de VEGF en las células tumorales de las neoplasias de mama⁵⁵. Los andrógenos juegan un papel similar en la próstata neoplásica⁵⁶. La forma salvaje de p53 interviene en la angiogénesis provocada por la hipoxia induciendo apoptosis o incrementando factores antiangiogénicos, pero también disminuyendo VEGF⁵⁷, mientras que, en tumores, la forma mutante se asocia a su incremento. El producto del gen supresor von Hippel-Lindau (vHL) está directamente involucrado en la degradación del VEGF, atribuyéndose la susceptibilidad a cáncer cerebral o renal en la enfermedad a la pérdida de la función de VHL, que disregularía al factor angiogénico. La forma mutante de ras puede regular al alza tanto VEGF como otros factores angiogénicos.

3.3 Factores antiangiogénicos

Las células neoplásicas pueden tener también capacidad para expresar factores antiangiogénicos como la trombospondina, angiostatina y endostatina. En esta capacidad se basan algunas hipótesis que intentan explicar por qué en ocasiones la extirpación de una neoplasia primaria se sigue de la progresión de sus depósitos metastáticos, supuestamente frenados en su crecimiento por los inhibidores de la angiogénesis que producía el tumor principal.

3.4 Intervención de otras estirpes celulares en la angiogénesis tumoral

No sólo las células neoplásicas juegan un papel importante en el proceso angiogénico, otras estirpes celulares acompañantes pueden intervenir en

el proceso angiogénico, siendo los macrófagos, de los que haremos mención especial posteriormente en un apartado específico, los que tienen el papel más importante. Los macrófagos representan el mayor componente del infiltrado inflamatorio en la mayor parte de los tumores, a donde son atraídos por citoquinas y otras moléculas como el VEGF.

Particularmente, VEGF es capaz de inducir migración y activación de monocitos periféricos a través del receptor ftl-1 que se expresa en la membrana del monocito. Los macrófagos asociados al tumor tienen una relación compleja con la biología tumoral, con acciones tanto promotoras como inhibitoras del crecimiento tumoral. Una de sus acciones promotoras está en relación con la angiogénesis, pudiendo influir en cada una de las fases del proceso angiogénico, incluyendo la secreción de factores angiogénicos. La expresión de VEGF en los macrófagos se ha detectado en el citoplasma, tanto como proteína, mediante inmunohistoquímica, como en forma de mRNA, mediante hibridación in situ. Su secreción se ha estimado en 2-3 veces la de las propias células tumorales, lo que resalta la relevancia de los macrófagos asociados a tumores (TAMs) en la angiogénesis tumoral.

B. VEGF

1. VEGF Y SU ACTIVIDAD ANGIOGÉNICA.

VEGF induce la neoangiogénesis estimulando la proliferación, permeabilidad y migración capilar²¹.

El hallazgo de que la sola pérdida de un alelo de VEGF produzca una vascularización embrionaria defectuosa que induce la muerte del embrión señala el papel fundamental que juega este factor en el desarrollo del aparato circulatorio⁵⁸.

Asimismo, VEGF ha resultado ser un mediador clave de la neovascularización asociada a determinados tumores y algunos procesos patológicos oculares⁵⁹.

VEGF induce la expresión tanto de activadores del plasminógeno como del inhibidor del activador plasminógeno (PAI-1) en cultivos de células endoteliales.

Mandriota y cols. mostraron que VEGF favorece la expresión de receptores de uroquinasa en las células endoteliales vascular⁶⁰.

Dvorak postuló que el aumento de la permeabilidad vascular era un paso crucial en la angiogénesis asociada a la cicatrización de heridas y a la observada en el desarrollo tumoral⁶¹.

En consonancia con esta hipótesis, una de las principales funciones de VEGF en el proceso angiogénico es la inducción de un aumento de la permeabilidad vascular a macromoléculas produciendo una filtración o pérdida transvascular de proteínas plasmáticas que da lugar a la formación de un "gel" extravascular de fibrina. Este "gel" constituiría el substrato sobre el que puedan desarrollarse tanto las células endoteliales como las células tumorales.

Estudios recientes sugieren que VEGF induce fenestraciones en las células endoteliales. Roberts y cols. demostraron que la administración tópica de VEGF producía la fenestración del endotelio de pequeñas vénulas y capilares incluso en regiones en las que, en condiciones naturales, estos vasos no son fenestrados, como son los del cremáster o la piel⁶².

VEGF provoca un rápido pero transitorio aumento de la permeabilidad microvascular sin provocar daños celulares endoteliales ni degranulación de los mastocitos y su acción no se ve bloqueada por los antihistamínicos.

Así, VEGF puede ser considerado como una citosina multifuncional que, por un lado modifica la matriz extracelular al promover la extravasación de plasma, con la resultante aparición de fibrina, y por otro estimula directamente la proliferación de células endoteliales.

VEGF también induce vasodilatación dosis dependiente in vitro y produce taquicardia transitoria e hipotensión cuando se administra vía sistémica. Estos efectos parecen estar mediados por el óxido nítrico derivado de las células endoteliales⁶³.

2. ISOFORMAS DE VEGF

El gen humano del VEGF está organizado en ocho exones separados por siete intrones, teniendo una extensión de unas 14 kilobases (kb)⁶⁴.

El gen humano del VEGF ha sido localizado en el cromosoma 6p21.3.

El análisis de secuencial de ADNc (ADN complementario) de un surtido de clones de VEGF humano indicó que el factor de crecimiento del endotelio vascular podía tener hasta cuatro formas moleculares diferentes teniendo respectivamente 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206)⁶⁵.

La unión alternante de exones de un único gen de VEGF es la base de esta heterogenicidad molecular.

VEGF165 carece de los residuos codificados por el exon 6, mientras que VEGF121 carece de los residuos codificados por los exones 6 y 7. VEGF189 tiene una inserción de 24 aminoácidos ricos en restos básicos y

VEGF165 es la isoforma predominantemente secretada tanto por células normales como anormales⁶⁵.

Las transcripciones de VEGF121 y VEGF189 se pueden detectar en la mayoría de células que expresan el gen VEGF. Por el contrario VEGF206 es una isoforma de presentación poco habitual⁶⁵.

Como ya se ha mencionado previamente, el VEGF nativo es una glicoproteína de unos 42kDa homodimérica, básica y ligadora de heparina. Estas propiedades se corresponden con las de VEGF165.

VEGF121 es un polipéptido ácido que no liga heparina. VEGF189 y VEGF206 son más básicos y se fijan a la heparina con mayor afinidad que VEGF165⁶⁶.

VEGF121 es una proteína soluble; no obstante existe un porcentaje significativo de VEGF165 que, una vez segregada, queda unido a la superficie celular y a la matriz extracelular. VEGF189 y VEGF206 quedan secuestradas casi por completo en la matriz extracelular pero pueden ser liberadas a una forma soluble mediante heparina o heparinasa. Estas formas largas también pueden ser liberadas por la plasmina tras realizar una división a nivel del extremo carboxiterminal⁶⁷.

La activación del plasminógeno y la generación de plasmina han mostrado tener un papel importante en la cascada angiogénica.

Existen evidencias experimentales que apoyan la teoría que los factores de crecimiento "almacenados" en la matriz extracelular y liberados tras la degradación de la misma juegan un papel fundamental en los procesos citados⁶⁸.

Así, la proteólisis de VEGF también parece tener lugar in vivo de una manera similar.

La generación de VEGF bioactivo por división protelítica parece tener especial importancia en el microambiente tumoral donde el aumento de expresión de las proteasas, incluyendo los activadores del plasminógeno, está bien documentada⁶⁹.

Estudios relativamente recientes, realizados por Keyt y cols. a mitad de la década de los noventa, realizando una proteólisis de VEGF mediante plasmina mostraron que ésta escindía VEGF165 en un fragmento de 110 aminoácidos sin afinidad por la heparina (VEGF110) y en un fragmento de 55 aminoácidos (constituido por el extremo carboxiterminal) con capacidad para unirse a la heparina.

Los mismos autores demostraron que el producto con actividad biológica de la acción de la plasmina se compone de los primeros 110 aminoácidos del extremo NH₂ terminal de VEGF, careciendo el polipéptido del extremo carboxi terminal de afinidad por los receptores de VEGF. No obstante, la pérdida de la capacidad fijadora de heparina (que reside en el extremo carboxiterminal, aminoácidos 111-165) conllevaba una pérdida notable de la capacidad de inducir mitosis de las células endoteliales. La potencia mitogénica VEGF110 era cien veces menor que la que posee VEGF165, luego en este extremo carboxi-terminal reside la capacidad mitógena del VEGF⁶⁸.

3. VEGF COMO FACTOR PRONÓSTICO

Muchos estudios han demostrado que la expresión del VEGF es elevada en tejidos tumorales o en la circulación en muchos tipos de tumores sólidos humanos, incluido el melanoma⁷⁰ y tumores gastrointestinales⁷¹, de mama⁷², del sistema nervioso central⁷³, de ovario⁷⁴, de cervix⁷⁵, de pulmón⁷⁶, hepático⁷⁷, de cabeza y cuello⁷⁸ y renal^{79,80}. En muchos

estudios, la expresión de VEGF aumentaba con la progresión hacia una mayor malignidad^{71,72,75,81,82} y tenía relación con el grado de vascularización del tumor^{75,76,82,83,84}. Hay estudios que demuestran que la expresión del receptor del VEGF en las células endoteliales de vasos sanguíneos próximos también está estimulada⁷².

En muchos estudios, el VEGF estaba incrementado en el plasma, así como en el lugar del tumor^{2,85,86} y se ha descrito una asociación significativa entre los niveles de VEGF en plasma y la etapa de la enfermedad o las metástasis. Por otra parte, se ha descubierto una correlación significativa entre los niveles de VEGF en plasma y tejidos empleando tinción inmunohistoquímica⁸⁶. La expresión del VEGF en tumores es mayor en las zonas adyacentes a la necrosis tisular^{71, 77}. Estas zonas son probablemente hipóxicas. Aunque las células malignas son la fuente principal de VEGF en los tumores, las células estromales e incluso el endotelio vascular también pueden contribuir, en particular en zonas hipóxicas⁷¹.

En muchos estudios se ha encontrado que la expresión del VEGF se correlaciona con el grado de angiogénesis tumoral^{76,83}, corroborando el papel clave del VEGF en este proceso. Por ejemplo, Nakasaki y col⁸¹ observaron una estrecha y significativa relación entre la expresión del VEGF y la densidad de microvasos ($p < 0.001$) cuando examinaron muestras de tumores de 100 pacientes con cáncer colorrectal.

El desarrollo de anticuerpos anti-VEGF y de otras moléculas capaces de inhibir el sistema del VEGF y del receptor del VEGF han proporcionado una evidencia directa del papel del VEGF en la angiogénesis y el crecimiento del tumor. En los primeros experimentos que utilizaron anticuerpos frente al VEGF, algunos autores demostraron que un

anticuerpo monoclonal específico para el VEGF inhibe enérgicamente el crecimiento de tumores producidos a partir de líneas celulares de tumores humanos inyectadas en ratones lampiños. Además, la administración de un anticuerpo policlonal suprimía el crecimiento de líneas celulares de tumores secretores de VEGF transfectados a ratones⁸⁷. La inhibición de la actividad del VEGF por transfección de líneas celulares de tumor humano con un ADNc que codifica receptores de VEGF solubles, también suprime el crecimiento del tumor y de las metástasis y prolonga la supervivencia en ratones⁸⁸. Estos experimentos demuestran la acción paracrina del receptor del VEGF, ya que no se inhibió el crecimiento del tumor in-vitro. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en la inhibición de la actividad del VEGF poco después de haberse inoculado las células tumorales en animales, se ha demostrado que también los anticuerpos anti-VEGF inhiben el crecimiento posterior y las metástasis en tumores ya establecidos⁸⁹.

El uso de videomicroscopía intravital ha proporcionado nuevas pruebas de que los anticuerpos anti-VEGF pueden inhibir la angiogénesis en el tumor y suprimir el crecimiento tumoral⁹⁰. Esta técnica permite el estudio *in vivo* e *in situ* de forma no invasiva de la angiogénesis en tumores y del crecimiento de tumores en ratones conscientes. Se implantaron esferoides tumorales humanos en ratones lampiños y se trataron con el anticuerpo monoclonal A4.6.1, que es específico para el VEGF. El anticuerpo suprimió totalmente la neovascularización e inhibió el crecimiento del tumor en tres líneas celulares diferentes de carcinoma de mama⁹⁰.

Estos estudios de inhibición del VEGF también demostraron la función de éste en la producción de cambios morfológicos en los vasos sanguíneos de

los tumores. Los estudios de videomicroscopia intravital que implican la inyección del anticuerpo monoclonal A4.6.1 en ratones con xenoinjertos de tumor humano establecido y vascularizado, demostraron que la inhibición del VEGF reducía la permeabilidad vascular, el diámetro y la tortuosidad⁹¹. Estudios de imagen por resonancia magnética confirmaron el hallazgo de que la permeabilidad vascular se reduce por la acción de anticuerpos anti-VEGF⁹².

Una baja concentración de oxígeno indica la necesidad de más vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y nutrientes a un tumor en crecimiento. Muchos estudios han demostrado que la hipoxia es un estimulador eficaz de la expresión de VEGF⁹³, que actúa aumentando la transcripción del VEGF y estabilizando el ARNm resultante^{94,95}. Sin embargo, dado que algunos tumores expresan elevados niveles de VEGF incluso en condiciones normales de oxigenación, parece que la hipoxia no es el único regulador de la expresión del VEGF de los tumores⁹⁶. Varios oncogenes y genes supresores de tumores favorecen la producción de VEGF en ausencia de hipoxia. Hay mutaciones del gen supresor de tumores VHL que están asociadas con una mayor producción de HIF-1 y VEGF⁹⁷, debido a la incapacidad de la proteína mutante de VHL para degradar el HIF-1, lo que actúa estimulando la expresión del VEGF⁹⁸. Tales mutaciones son frecuentes en el carcinoma renal de células claras esporádico muy vascularizado⁹⁷. Otros genes supresores de tumores que están relacionados con la producción de VEGF son el p53⁹⁹ y el p73¹⁰⁰.

También se sabe que hay oncogenes normales, incluidos ras y raf, que están relacionados con el aumento en la expresión del VEGF¹⁰¹.

Considerados en conjunto, la tendencia de los tumores es a volverse hipóxicos debido al rápido crecimiento, lo que estimula la expresión del

VEGF tanto por los tumores como por las células normales que los rodean, y el efecto positivo de los oncogenes del tumor activados sobre la expresión del VEGF, crean un entorno local que favorece la angiogénesis. Este entorno es vital para el crecimiento del tumor. A su vez, la mayor permeabilidad vascular inducida por el VEGF puede agudizar la hipoxia local.

Hay nuevas pruebas que sugieren que, además de promover el crecimiento de los tumores induciendo la angiogénesis, el VEGF tiene otras actividades que pueden favorecer la supervivencia y el crecimiento del tumor:

- efectos anti-apoptóticos para células tumorales
- aumento de la permeabilidad
- resistencia a la radioterapia
- aumento de la probabilidad de metástasis
- supresión de la respuesta inmunitaria antitumoral

La primera actividad *in vivo* del VEGF es aumentar la permeabilidad de los microvasos para las macromoléculas circulantes. Esto permite el escape de proteínas plasmáticas, incluido el fibrinógeno y otras proteínas de coagulación, lo que da lugar a la formación de un estroma provisional que es pro-angiogénico⁹⁶.

Además de la producción de estroma, la mayor permeabilidad también provoca el aumento de la tensión intersticial, probablemente como resultado del aumento de la permeabilidad vascular. El aumento de la permeabilidad vascular y de la presión intersticial puede facilitar la entrada de células tumorales en el torrente sanguíneo y la diseminación metastásica. El aumento de la presión intersticial también puede dificultar la difusión de moléculas de mayor tamaño como los agentes

quimioterapéuticos o los anticuerpos antitumorales al interior del tumor. Dado que la extensa vasculatura tumoral podría facilitar la entrada de agentes anticancerígenos al interior de los tumores si la permeabilidad fuera normal, la normalización de la presión intersticial podría ser beneficiosa cuando se traten neoplasias⁹⁸.

Los tumores desarrollan metástasis cuando las células tumorales invaden el sistema vascular o linfático y se desplazan a una zona distante donde se "siembran" y crecen. Se desconoce la importancia relativa de la invasión tumoral de los vasos existentes y el uso de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos, pero hay pruebas que indican que la angiogénesis tiene su función en la propagación del tumor. Además, los vasos linfáticos tienen un papel importante en la propagación precoz del cáncer. Y los nódulos locales suelen ser el primer punto de metástasis. Estas observaciones sugieren que la función del VEGF favorecedora de angiogénesis y, de forma limitada, linfangiogénesis es probablemente importante para las metástasis tumorales, y están corroboradas por datos que vinculan los niveles del VEGF con la probabilidad de metástasis

Aunque la angiogénesis tumoral se produce en todos los tumores a medida que crecen, la intensidad de la angiogénesis puede variar según los tipos de tumor e incluso entre individuos con el mismo tipo de tumor. Eberhard y cols. evaluaron la proliferación de células endoteliales en muestras de archivo de tumores humanos y descubrieron que la angiogénesis estaba presente en todos los tumores, pero con diferencias características y significativas entre los diferentes tipos de tumor¹⁰².

Además, la intensidad de la angiogénesis dentro de cada grupo de tumores era diferente, teniendo algunos tumores muchos capilares en proliferación y otros muy pocos.

Se ha correlacionado un alto grado de vascularización con un mal pronóstico después de una terapia anticancerosa convencional¹⁰³, lo que convierte a los pacientes con tumores muy vascularizados en candidatos lógicos para una terapia antiVEGF. Sin embargo, un bajo nivel de vascularización no significa necesariamente que el tumor sea menos sensible a la terapia anti-VEGF que los tumores más vascularizados¹⁰⁴. Lo contrario puede ser cierto, siendo los tumores relativamente avasculares más dependientes de los vasos sanguíneos existentes que los tumores vasculares. Hay estudios que han demostrado que los tumores humanos poco vascularizados y de crecimiento lento en modelos animales responden a los inhibidores de la angiogénesis TNP-470 y angiostatina igual que los tumores muy vascularizados y de crecimiento rápido¹⁰⁵.

Existen diversos estudios realizados en distintos tipos de tumores que sugieren la existencia de una estrecha relación entre los niveles elevados de VEGF y un mal pronóstico. Entre los valores pronósticos que se han relacionado con la cantidad de VEGF, ya sea sérico o en el tumor, incluyen el tamaño tumoral, el grado, y la supervivencia libre de recaída o global.

Existen algunos tipos de tumores, como los de mama, pulmón y colon-rectal, en donde se han estudiado con detalle la correlación entre los niveles de VEGF y el pronóstico.

El valor pronóstico de los niveles de VEGF en el cáncer de mama ha sido estudiado exhaustivamente, principalmente en pacientes con cáncer de mama primario. Varios estudios encontraron una correlación significativa entre los niveles elevados de VEGF y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Además, en algunos de estos estudios, los niveles elevados de VEGF se correlacionan con la respuesta a la quimioterapia o a

la terapia hormonal¹⁰⁶. Sin embargo, otros estudios no han hallado una correlación entre los niveles de VEGF y la supervivencia global¹⁰⁷.

Recientemente también se ha demostrado que los niveles de VEGF-C y VEGF-D están significativamente relacionados con la supervivencia libre de recaída y global en pacientes con carcinomas de mama invasivos¹⁰⁸.

C. COX-2

1. COX-2 Y LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Como ya hemos mencionado en varias ocasiones la hipoxia es uno de los mayores estimuladores angiogénicos. Además de los efectos señalados anteriormente, la hipoxia estimula a la COX-2 que también es un factor angiogénico.

La COX o prostaglandina H sintetasa es una enzima limitante en la síntesis de prostaglandinas; como es la conversión de ácido araquidónico a prostaglandina G₂ introduciendo una molécula de oxígeno en el ácido araquidónico, que por acción de la peroxidasa lo transforma en prostaglandina H₂(PG H₂), ésta es químicamente muy inestable por lo que por lo que sufren una transformación enzimática, convirtiéndose en una variedad de productos, incluyendo prostaciclina (PGI₂), tromboxano (TXA), y las prostaglandinas E₂ y F₂alfa (PGE₂ y PGF₂alfa).

Se han identificado dos formas de COX: la COX-1 y la COX-2.

La COX-1 es una enzima limitante que se expresa en la membrana celular de la mayoría de los tejidos, y es la responsable de la síntesis de prostaglandinas en condiciones fisiológicas. Fue aislada por Miyamoto en 1976. La COX-1 presenta un efecto protector del tracto gastrointestinal.

En 1991 dos grupos, de forma independiente, aislaron una nueva isoforma de COX a la que se le denominó COX-2.

La COX-2 no se detecta en los tejidos en situaciones fisiológicas; sino que es inducida por los tejidos en respuesta a diversos cambios inflamatorios y hormonales.

La COX-2 se produce en respuesta a varios estímulos extracelulares, como son: factores de crecimiento, citoquinas, carcinógenos, promotores tumorales, y algunos oncogenes como V-src, v-Ha-ras, Her-2/neu y Wnt.

El principal producto de la COX-2 es la PG E2.

La sobreexpresión de COX-2 y altas concentraciones de prostaglandinas se han asociado con enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y algunos tipos de neoplasias como: colon, cabeza y cuello, pulmón, vejiga, próstata, estómago y mama¹⁰⁹.

La COX-2 contribuye a la tumorigenesis y a la mayor agresividad de las células tumorales, esto se puede explicar por diversos mecanismos en los que actúa la COX-2:

- Inhibe la apoptosis, esto ha sido objeto de estudio de diversos autores como Tsuji y cols. que demostraron como la sobreexpresión de COX-2 inhibía la apoptosis y elevaba los niveles de bcl-2¹¹⁰.
- Incrementa la angiogenesis.
- Aumenta la invisibilidad tumoral, ya que estimula la producción de metaloproteinasas de membrana de tipo 1 y 2.
- Modula la inflamación y la inmunosupresión.
- Convierte procarcinógenos en carcinógenos¹¹¹.

La expresión del gen de la COX-2 en las células endoteliales está regulada fundamentalmente por la hipoxia. La hipoxia, como ya hemos

mencionado anteriormente, es el principal estímulo angiogénico e induce la expresión de factores proangiogénicos como VEGF, iNOS, IL-6 e IL-8.

Las prostaglandinas producidas por la COX-2 pueden producir un incremento del factor básico de crecimiento de fibroblastos, induciendo la angiogénesis.

Además, existen varios artículos que describen que las prostaglandinas pueden regular la expresión de VEGF y demuestran la importante relación entre la actividad de la COX-2 y VEGF en la estimulación de la angiogénesis tumoral¹¹¹. Las prostaglandinas aumentan la expresión de IL-6 que regula la síntesis de VEGF, produciéndose así un feed-back proangiogénico positivo.

Además, se ha publicado que la liberación de prostaciclina puede incrementarse cuando las células endoteliales están expuestas a diversos factores angiogénicos como bFGF, VEGF, angiopoyetinas o PECAM.

Los efectos angiogénicos de la COX-2 son los siguientes:

- 1.- Juega un papel importante en la liberación y activación de factores proangiogénicos.
- 2.- Aumenta la producción de eicosanoides como TXA2, PGI2 y PGE2 que estimulan directamente la migración de las células endoteliales y la angiogénesis.
- 3.- Posibilita la supervivencia de las células endoteliales ya que "sobre-regula" las proteínas antiapoptóticas bcl-2 y/o Akt¹¹³.

2. COX-2 COMO FACTOR PRONÓSTICO

Desde que se conocieron los efectos angiogénicos de la COX-2, diversos autores han estudiado su implicación en distintas neoplasias, intentando valorar su utilidad como factor pronóstico.

La COX-2 se ha valorado en neoplasias de múltiples localizaciones, Gallo y cols. demostraron que en los tumores de cabeza y cuello existía una correlación significativa entre los niveles de COX-2 y la vascularización tumoral ($p < 0.0001$) y la densidad de microvasos ($p < 0.007$) y con el VEGF¹¹⁴.

Asimismo, Uefuji y cols. estudiando los adenocarcinomas gástricos hallaron una correlación positiva entre los niveles de COX-2 en las células neoplásicas y la densidad de microvasos, en estos casos la sobreexpresión de COX-2 se relacionaba con niveles elevados de prostaglandinas E2 que se encontraba en la mucosa gástrica¹¹⁵.

Se han estudiado ambas isoformas de COX (COX-1 y COX-2) en elementos tumorales. Específicamente en la mama, hay que reseñar un estudio realizado por Denker con 221 neoplasias mamarias, en los cuales se analizaron tanto COX-1 como COX-2, para intentar establecer su relación como factores pronósticos. Su primer resultado que obtuvieron fue que la isoforma relacionada con el pronóstico era la COX-2. Además consiguieron establecer relaciones estadísticamente significativas de la COX-2 con factores pronósticos conocidos como: tamaño tumoral ($p < 0.0005$), afectación ganglionar ($p < 0.0005$), invasión vascular ($p = 0.03$), RE negativos ($p = 0.04$) y pobre diferenciación ($p < 0.0005$)¹¹⁶.

Existen numerosos estudios que valoran la COX-2 en las neoplasias mamarias. Se han detectado niveles elevados de COX-2 en lesiones

preneoplásicas, en carcinomas in situ, así como en carcinomas infiltrantes mamarios.

Half y cols. demostraron que en el componente in situ próximo a la neoplasia invasiva se detectaban niveles más elevados de COX-2 que en el propio componente infiltrante, sugiriendo que la expresión de COX-2 podría tener un papel importante, al ser un evento precoz en la carcinogénesis mamaria¹¹⁷.

Otros estudios realizados, valoran la presencia de COX-2 tanto en las células neoplásicas como en el epitelio normal, para así llegar a conocer el mecanismo de actuación de la COX-2. Estos autores observaron que en las células no neoplásicas cercanas a las tumorales existía sobreexpresión de COX-2, pero esta sobreexpresión no se observaba en las células no tumorales distantes al tumor, surgiendo así la posibilidad de que COX-2 presentara un efecto paracrino en la angiogenesis tumoral. Además se podría correlacionar los niveles de COX-2 en estas células con el posterior riesgo de convertirse en neoplásicas¹¹⁸.

Los niveles de prostaglandinas segregados por la activación de la COX-2 en las células neoplásicas ejercen como moduladores positivos para la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Existen numerosos artículos que relacionan la presencia de COX-2 en neoplasias mamarias y la correlacionan con factores pronósticos ya conocidos, en esta línea un grupo de investigadores dirigidos por Jeong Yum Shim estudiaron 64 neoplasias mamarias, en las que valoraron la COX-2 y su relación con factores pronósticos clinicopatológicos como: tamaño, afectación ganglionar, estadiaje, receptores de estrógenos y progesterona, grado histológico y nuclear. Encontraron positividad para COX-2 en el 72% de los carcinomas. Además observaron que existía

positividad para COX-2 en las células peritumorales, tanto en las células estromales, endoteliales, e inflamatorias mononucleadas.

Para estos autores la positividad de COX-2 en estas células ejercería un efecto paracrino sobre las células tumorales. Además, al igual que Soslow, piensan que sobre las células epiteliales cercanas a estas células estromales puede asentar una posterior neoplasia¹¹⁹.

Sin embargo, no todos los estudios demuestran positividad para COX-2 en las células peritumorales. Ristimaki, analizando el significado pronóstico de COX-2 en carcinomas mamarios, observó solo positividad de COX-2 en las células neoplásicas, las células estromales adyacentes no presentaban tinción y si lo hacían era débilmente¹²⁰.

Similares resultados obtuvieron Costa y cols. al valorar la COX-2 en los carcinomas mamarios, no observaron tinción en las células estromales ni en las endoteliales, en contraposición a la fuerte tinción que presentaban las células neoplásicas¹⁰⁹.

De este modo sería difícil explicar que la expresión de COX-2 en las células tumorales se relacione con el incremento en la proliferación de las células endoteliales.

Las prostaglandinas presentan propiedades vasoactivas y mitógenas, siendo mediadores importantes en el incremento de la permeabilidad vascular en diversos órganos, como por ejemplo, el endometrio¹²¹.

Algunos autores como Parret y Rolland demostraron el importante papel de las prostaglandinas y de la COX-2 en la capacidad de invasión de los tumores mamarios¹²².

Los mecanismos por los que COX-2 y la PGE2 pueden modular el desarrollo tumoral mamario fue explicado por Wang.

En las células epiteliales tumorales de la glándula mamaria, la PGE2 derivada de la COX-2 puede:

- Estimular la proliferación y la angiogénesis.
- Aumentar la invasibilidad
- Protege a las células de la apoptosis
- Modula la inmunosupresión

La PGE2 solo estimula la proliferación de las células epiteliales mamarias en presencia de EGF.

La PGE2 derivada de la COX-2 puede modular la proliferación celular indirectamente, estimulando la síntesis de estrógenos en el tejido mamario.

Los niveles elevados de prostaglandinas estimulan a la aromatasa que es una enzima citocromo p450 que cataliza la producción de estrógenos.

La PGE2 puede estimular la progresión tumoral por mecanismos indirectos, ya que suprime a las células inmunes antitumorales. La PGE2 suprime la actividad antitumoral de las células natural killer y macrófagos, y actúa sobre la capacidad de los linfocitos T de producir citoquinas Th1 (factor de necrosis tumoral- α , interferon, IL-2)¹²³.

D. PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS EN LA ANGIOGÉNESIS

En muchos cánceres humanos, la abundancia de macrófagos en el microambiente tumoral se correlaciona con mal pronóstico. La evidencia experimental de la relación causal entre los macrófagos y el pronóstico procede de modelos de ratón de cáncer de mama en los que la ablación genética de los macrófagos dio lugar a la disminución de la progresión tumoral y las metástasis.

Los macrófagos son reclutados al frente invasivo mediante factores quimiotácticos derivados del tumor. Los macrófagos mejoran la migración de células tumorales y la invasión a través de la secreción de factores quimiotácticos y quimiocinas como el factor de crecimiento epidérmico (EGF). También promueven la angiogénesis mediante la síntesis de factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y la remodelación de la matriz extracelular y, en particular, la regulación de la fibrinogénesis de colágeno.

Experimentalmente, se ha demostrado que la ablación genética de los macrófagos en ratones del modelo PYMT de cáncer de mama, se traduce en una menor tasa de progresión del tumor y una inhibición considerable de la metástasis, y que este proceso implica, en parte, la síntesis de los macrófagos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹²⁴.

Los estudios clínicos han tratado de identificar las correlaciones entre la densidad de macrófagos y el pronóstico. Una revisión reciente de Bingle y cols.¹²⁵, usando un meta-análisis, mostró que en más del 80% de los casos, un aumento de la densidad de macrófagos se asocia con mal pronóstico, y el 20% restante se dividió entre los que no tienen efecto y los que tienen buen pronóstico.

E. CUANTIFICACION DE LA ANGIOGÉNESIS

La cuantificación y densidad de la angiogénesis en una gran variedad de neoplasias malignas ha sido estudiada con el objetivo de predecir el comportamiento biológico y pronóstico de las mismas. Varios estudios señalan que un alto grado de angiogénesis (aumento del número de vasos y

mayor densidad vascular) está asociado con un incremento de la proliferación celular, mayor riesgo de metástasis, recurrencia y peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama, colon-rectal, próstata, vejiga, neuroblastoma, ovario, gastrointestinal, glándulas salivales, gliomas cerebrales, etc. De igual forma el estudio de factores angiogénicos favorecedores en varios tipos de neoplasias malignas se ha correlacionado con parámetros clínico patológicos, reportándose su expresión como índice de pronóstico desfavorable en las mismas.

Existen varios métodos para la cuantificación de la angiogénesis, la más utilizada es la valoración de la densidad de microvasos. La identificación de microvasos se realiza en secciones histológicas, a través de la microscopía óptica. Para identificar los microvasos se utilizan marcadores inmunohistoquímicos que permitan determinar las estructuras vasculares, con lo que se consigue resaltar los vasos al diferenciarlos del resto del tejido. Dichos marcadores inmunohistoquímicos suelen ser anticuerpos monoclonales que se unen a los distintos componentes vasculares.

Existe un anticuerpo que detecta antígenos endoteliales, como es el factor de Von Willebrand. El factor de Von Willebrand, también denominado antígeno relacionado con el factor VIII, es una proteína de 250 Kd sintetizada por la célula endotelial que se almacena en el citoplasma de las células endoteliales (en los cuerpos de Weidel-Palade), y juega un papel importante en la adherencia y agregación plaquetaria.

Otros anticuerpos utilizados son los dirigidos hacia el CD 31 (molécula de adhesión celular endotelial o PECAM) y el CD 34 (antígeno glicoproteico de superficie de célula progenitora del sistema hematopoyético humano).

El CD 31 es un glicoproteína de membrana de 130 Kd, que forma parte de las moléculas de adhesión celular y se expresa en las células endoteliales

que conforman diversas estructuras vasculares, tales como capilares, sinusoides y vasos de mayor calibre. Además, de en las células endoteliales también se expresa en las plaquetas y algunos leucocitos. Tiene un papel importante en la adhesión leucocitaria al endotelio y en especial en la transmigración leucocitaria al mismo.

El CD 34 es un antígeno de diferenciación leucocitaria que se expresa en las células madres hematopoyéticas y, fundamentalmente en el endotelio vascular; es una proteína transmembrana de cadena única de 110 Kd que se encuentra asociada a microprocesos endoteliales de los brotes vasculares, interviniendo en la adhesión celular y migración¹²⁶.

También se valoró la utilidad de la endoglina (CD 105) en el estudio de los neovasos. La endoglina es una proteína de membrana de 180 Kd, cuyo gen está localizado en el cromosoma 9q34. La endoglina está presente en células endoteliales, macrófagos y algunos tipos de fibroblastos, y forma parte del sistema de receptores de membrana de TGF-beta. Desde que el grupo de Letarte descubrió al CD 105 se le han relacionado con diversas funciones, todas ellas relacionadas con señales de TGF-beta.

El CD 105 tiene un importante papel en la angiogénesis. Estudios como los de Wang, Kumar demuestran que existe una sobreexpresión de CD 105 en las células endoteliales tumorales, si lo comparamos con las células endoteliales de los tejidos sanos¹²⁷.

Los anticuerpos dirigidos contra CD 105 muestran una gran especificidad para la vasculatura tumoral, si lo comparamos con los marcadores pan-endoteliales como CD 31, CD 34 y factor Von Willebrand. Estos tres anticuerpos panendoteliales (anti factor vw, anti CD 31 y anti CD34) se utilizan para el diagnóstico de lesiones de origen vascular, ya sean de origen benigno o maligno.

Los anticuerpos pan-endoteliales plantean ciertos problemas a la hora del recuento de microvasos ya que suelen presentar reacciones cruzadas con otros tipos celulares.

El inconveniente que plantea el anticuerpo anti factor de Von Willebrand es que marca tanto el endotelio capilar como el linfático, y además, hay veces que no tiñe parte de los endotelios capilares de tejidos tumorales¹²⁸.

El problema que plantea en anticuerpo anti CD 31 para la cuantificación de la densidad de microvasos es que puede presentar reacciones cruzadas con fibroblastos, células plasmáticas y mielomonocíticas, esto podría inducir falsas señales en la cuantificación, considerando como positivas células que no lo serían. Este problema puede solucionarse basandonos en el diferente aspecto morfológico.

El anticuerpo anti CD 34 también marca las estructuras linfáticas, por lo que nos podría llevar a un error en la cuantificación de auténticos vasos neoformados. Además puede tener reacción cruzada con fibroblastos.

Aunque algunos estudios, como el realizado por Martín L y cols. en 1995, sugirieron que el anti CD 34 era el anticuerpo más reproducible y seguro en análisis de rutina¹²⁹; la mayoría de los investigadores utilizan los anticuerpos dirigidos contra el factor VIII y contra CD 31. Haciendo comparaciones entre estos dos anticuerpos, se ha afirmado que el CD 31 tiene una sensibilidad superior¹³⁰.

Un anticuerpo bastante estudiado es el CD 105. Kurman y cols. realizaron un estudio cuantificando la densidad de microvasos con anti CD 105 y anti CD 34 en carcinomas mamarios y hallaron una correlación significativa entre la DMV y el tiempo libre de enfermedad cuando utilizaron anti CD 105; y no existía esa correlación cuando para determinar la densidad de

microvasos usaron marcadores pan-endoteliales como CD 34¹³¹. Otros autores obtuvieron resultados similares en carcinomas no microcíticos de pulmón usando CD 105 y otros marcadores endoteliales.

Behrem S y cols compararon el CD 105 con el CD 31 al valorar la microvasculatura en los glioblastomas, y concluyeron que el CD 105 es más sensible en la evaluación de la angiogénesis para dichos tumores¹³².

Métodos para la cuantificación de la densidad de microvasos intratumorales

Existen diversos métodos para la cuantificación de microvasos intratumorales descritos en la literatura, entre los que caben destacar:

- Método de Weidner y cols..
- Graduación de la densidad de microvasos
- Método de Chalkey.
- Análisis computerizado de imágenes.

1. MÉTODO DE WEIDNER

Weidner planteo realizar un recuento de vasos sanguíneos en áreas calientes o "hot spots", que son zonas del tumor que presentan una mayor cantidad de neovascularización. La necesidad de seleccionar estas áreas se debe a la heterogenicidad tumoral en los cortes histológicos. El proceso para el conteo de la microvasculatura tumoral tiene varias fases:

- Hay que valorar todas las secciones teñidas con hematoxilina-eosina y seleccionar aquellas en la que exista un gran componente invasivo tumoral.
- Tomar los bloques de las correspondientes secciones seleccionadas y realizar cortes de unas 5 micras de espesor para inmunotinción.

- Inmuntinción de la sección con un marcador endotelial para poder determinar la DMV (p. ej: anti-F VIII, anti-CD31, antiCD34, etc).
- Escanear las secciones inmunoteñidas con microscopía óptica a baja magnificación (10-100x) para seleccionar las áreas "hot spot".
- Realizar a mayor aumento (200x, que corresponde a un tamaño de campo de 0.74mm) recuento de todos los vasos contenidos en esas áreas "hot spot".

De acuerdo con Weidner 1991¹³³, cualquier célula endotelial individualmente inmunoteñida, o grupo de células que puedan claramente separarse de microvasos adyacentes, células tumorales y de otras estructuras del estroma, deben ser consideradas microvasos contables. La existencia de luz vascular no es requisito. Weidner no entra en consideraciones de calibre vascular para considerar un vaso contable o no.

Graduación de DMV:

Consiste en una determinación semi cuantitativa de la densidad microvascular, trasladando los valores continuos de DMV a valores categóricos en una escala de tres grupos (+1 a +3), lo que resulta más fácil y rápido, pero inevitablemente conlleva pérdida de información.

Diversos estudios han encontrado una correlación positiva entre la determinación de DMV por métodos cuantitativos y semicuantitativos y comprobado que ambos eran predictores estadísticamente significativos de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE)^{133,134,135}.

Fox y cols. 1995 realizaron un estudio comparativo de densidad microvascular en cáncer de mama comparando su determinación por CIAS

(análisis computarizado de imagen) y con gradiente semicuantitativo, encontrando una amplia correlación en cuanto al área luminal, y una menor correlación con el perímetro y el número de vasos, sugiriendo que el investigador cuando realiza el gradiente se guía fundamentalmente por el área total de vascularización tumoral más que por el número de microvasos considerados aisladamente¹³⁶.

2. MÉTODO DE CHALKEY (Chalkley H 1943)

El recuento según el método de Chalkey fue introducido por Chalkley H 1943. Este método también implica escanear el tumor, a baja magnificación para identificar las áreas que dan la impresión de contener el máximo número de microvasos. Es un método reconocido por el Comité Internacional para la valoración de la angiogénesis de tumores sólidos. Este método consiste en una rejilla que contiene 25 puntos distribuidos al azar que se coloca sobre el ocular del microscopio. La cuantificación vascular en las áreas de tumor se efectúa en los cortes seleccionados y teñidos con un anticuerpo específico para vasos (CD 31, CD 34, CD 105) en los denominados "hot- spots" o puntos calientes del tumor. Estos puntos representan la zona de mayor densidad vascular del tumor y se localizan tras barrido a bajo aumento (10X).

Con la rejilla de Chalkey y realizando una rotación del ocular se hace coincidir el máximo de puntos con los vasos teñidos con el anticuerpo seleccionado, efectuando el conteo de positividad de inmunotinción coincidente (a 250X), estudiando para cada caso 3 puntos calientes y obteniendo la media ponderada.

Fox y cols. en 1995 en un estudio piloto en cáncer de mama encontraron una significativa correlación entre los métodos de Weidner y Chalkley¹³⁶. Ambos métodos, en el estudio de Fox en cáncer de mama y en el de Dickinson AL 1994 en cáncer de vejiga, proporcionaban información pronóstica independiente^{136,137}.

Gasparini G y cols. en 1996, en un estudio multicéntrico, encontraron que en el análisis multivariante el score Chalkley poseía una gran significación como predictor independiente de resultados. Este estudio sugiere la validez del uso del método Chalkley para comparar las determinaciones de angiogénesis con intención pronóstica entre distintos centros¹³⁸. Sin embargo, con este método sigue siendo necesario realizar el paso más observador-dependiente, la selección de las áreas "hot spot".

3. ANÁLISIS COMPUTERIZADO DE IMÁGEN (CIAS)

Desde finales de la década de los 70 y principios de los 80 el estudio anatomopatológico se ha visto enriquecido por la aparición de métodos que permiten objetivar y cuantificar características morfológicas celulares. Dentro de estas nuevas técnicas se incluyen: morfometría, citofotometría, citofluorometría de flujo y el análisis de imagen; las cuales permiten medir lo que hasta ese momento sólo podía valorarse comparativamente, permitiendo transformar la patología cualitativa tradicional en patología cuantitativa.

El análisis computarizado de imágenes supone un intento de evitar la influencia de factores subjetivos, agilizar los estudios y mejorar la fiabilidad.

CIAS proporciona información adicional de la morfología de la vascularización tumoral. La mayoría de los estudios parecen indicar que el

área vascular media (AVM) y perímetro vascular medio (PVM) son un reflejo cuantitativo del grado de eventos fisiopatológicos implicados en la angiogénesis de los tumores en progresión. La integración de DMV, AVM y PVM, con información del estado de actividad del endotelio tumoral, puede proporcionar una valoración más dinámica del comportamiento vascular de los tumores^{139,140}.

El CIAS puede ser introducido como el método más objetivo para la cuantificación de microvasos y eventualmente para realizar selección automática de las áreas "hot spot".

Charpin C y cols. en 1995 Y Belien y cols. en 1999, desarrollaron un programa usando un microscopio monitorizado en interfase con el sistema de análisis de imagen, escaneando la sección tumoral entera para la identificación automática de las zonas "hot spot" y así realizar un contaje microvascular más objetivo, solventando el problema de la subjetividad en la determinación de las áreas "hot spots"^{141,142}.

Aparte del contaje microvascular, la determinación de la medida de la proliferación de células endoteliales (ECP) y del recubrimiento pericítico reflejan el estado funcional del lecho microvascular.

Proliferación de células endoteliales (ECP):

Esta técnica permite la determinación simultánea de células endoteliales y células tumorales proliferantes (TCP) mediante doble inmunomarcaje con anticuerpos directos frente a las células endoteliales y células tumorales proliferantes. La razón TCP/ECP refleja ampliamente el grado de crecimiento tumoral angiogénico independiente. Así, ECP puede ser de interés a la hora de seleccionar los tumores para la aplicación de

esquemas de tratamiento que inhiben el crecimiento de los vasos sanguíneos.

Porcentaje de recubrimiento pericítico:

Eberhard y cols¹⁰², midieron los índices de recubrimiento de los microvasos por los pericitos en seis tipos distintos de tumores malignos en humanos mediante marcaje simultáneo de las células endoteliales (anti CD34 o anti-v-vWF) y de las células musculares (antialfa-actina músculo liso), y observaron índices muy dispares entre los distintos tumores p. ej, del 10% en glioblastomas (valor medio), hasta un 70% en cáncer de colon y un 60% en el corpus rubrum del ovario (una fase de alta actividad angiogénica fisiológica dentro del desarrollo folicular). Encontrando pues, una aparente ausencia de correlación entre la fracción de proliferación de células endoteliales y bajos índices de cobertura de pericitos, probablemente basada en las diferencias pre-existentes en cuanto a los índices de cobertura de pericitos en los tejidos normales circundantes de los distintos tipos de tumores.

Así, los datos de cobertura pericítica deben sólo ser interpretados manteniendo en mente los índices de cobertura del correspondiente parénquima normal¹⁰².

El remodelado de los vasos sanguíneos de la retina es sólo posible en la vida postnatal en ausencia de cobertura pericítica¹⁴³. Esta observación tiene importantes implicaciones para el tratamiento anti-angiogénico.

Benjamin y cols, han comprobado que la ablación androgénica de los tumores de próstata conduce a una disminución de los niveles de VEGF dentro del tumor, induciendo selectiva regresión de los microvasos que no poseían cobertura pericítica¹⁴⁴.

Así, se puede concluir que parámetros de maduración de los vasos sanguíneos pueden predecir la eficacia de un tratamiento anti-VEGF a la hora de reducir la masa tumoral en pacientes considerados individualmente.

4. MÉTODOS COMPLEMENTARIOS

Entre los métodos complementarios para determinar el potencial angiogénico de los tumores disponemos de :

- Marcadores histopatológicos sustitutivos de la actividad angiogénica de los tumores:

+ Focos de fibrosis:

Un foco de fibrosis es definido como un área cicatricial que reemplaza necrosis en el centro de un carcinoma. Fue propuesta en 1996 por Hasebe y cols como un indicador de agresividad tumoral en los carcinomas invasivos ductal infiltrante de mama. Aparece como un centro esclerótico que se expande radialmente y que consta de sueltas, densas, o hialinas bandas de colágeno, y un número variable de fibroblastos. El tejido elástico puede ser muy abundante. Los focos de fibrosis más pequeños de 3 mm de diámetro no suelen contener células tumorales, mientras que los mayores algunas veces. En el cáncer de mama la presencia de un foco de fibrosis se ha visto que predice alta densidad microvascular y una alta fracción de células endoteliales proliferantes¹⁴⁵ y, aunque se requieren estudios confirmatorios, parece que la presencia de un foco de fibrosis está significativamente asociada con recaída precoz a distancia en pacientes con cáncer de mama¹⁴⁶.

+ Patrón de crecimiento de los tumores

Distinguimos entre patrón infiltrativo y expansivo. Se han visto que los distintos patrones de crecimiento presentan distintos perfiles angiogénicos^{146,147,148}.

Otro marcador inmunohistoquímico de grado de crecimiento tumoral dependiente de angiogénesis es la expresión del factor inducible por la hipoxia HIF-1¹⁴⁹.

- Otros marcadores sustitutos de la actividad angiogénica de los tumores:

La principal desventaja de los marcadores sustitutos histológicos es la inherente inter-observador variabilidad. Otros acercamientos más objetivos pueden ser:

- Cuantificación por citometría de flujo de las células endoteliales circulantes¹⁵⁰.

- Cuantificación de la expresión de factores angiogénicos en los tejidos:

En diversos estudios se ha visto que la expresión de altos niveles de VEGF en tejidos tumorales se asocia significativamente a pobre pronóstico y pobre beneficio del tratamiento adyuvante convencional^{151,152,153}.

- Determinación de niveles circulantes de factores angiogénicos:

Como la mayoría de los factores angiogénicos son péptidos solubles y difusibles, los niveles circulantes de factores angiogénicos deberían teóricamente reflejar la actividad angiogénica del tumor. Su determinación tiene potenciales ventajas comparado con la evaluación de la actividad angiogénica en los tejidos tumorales¹⁵⁴.

Determinación de los niveles circulantes VEGF:

Los estudios en los cánceres gastrointestinales han indicado consistentemente el valor pronóstico de los niveles circulantes de VEGF. El cáncer colorrectal ha sido el más ampliamente estudiado en este sentido¹⁵⁵.

Con muy pocas excepciones, los estudios realizados de los niveles circulantes de VEGF en los distintos cánceres muestran una correlación positiva de altos niveles en plasma o suero de VEGF con avanzado estadio tumoral y pobre supervivencia.

Por otra parte, las discrepancias pueden ser debidas, al menos en parte, a la ausencia de estandarización de la fase pre-analítica.

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

La angiogénesis es el proceso de creación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes, que sucede tanto en condiciones fisiológicas como en algunas patologías. Particularmente, el cáncer precisa del proceso de angiogénesis para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento progresivo y también para la diseminación metastásica.

En carcinomas de diverso origen, se ha demostrado que la cantidad de vasos neoformados -medida en términos de densidad vascular- se correlaciona con su agresividad biológica. Tanto la supervivencia libre de enfermedad como con la supervivencia global de pacientes con carcinoma se han relacionado con la capacidad neoangiogénica del carcinoma.

El inicio y el desarrollo de la angiogénesis dependen de la existencia de un desequilibrio entre factores de crecimiento que favorecen la formación de nuevos vasos (proangiogénicos) y los que se oponen a esta acción (antiangiogénicos). En las neoplasias se ha observado un incremento en la producción de factores angiogénicos por parte de las células tumorales.

Entre los factores más involucrados en la angiogénesis se encuentran los Factores de Crecimiento de Endotelio Vacular (VEGF). Se trata de una familia de factores de crecimiento compuesta por: VEGF-A (también conocido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La acción proangiogénica más determinante es llevada a cabo por VEGF-A, que comprende una variedad de proteínas de 121, 145, 165, 189, y 206 aminoácidos, de las que, en el tejido, VEGF165 es la isoforma predominante. VEGF-A, no sólo es secretado por las células tumorales, sino también por células del estroma tumoral, principalmente macrófagos

y fibroblastos. Estudios previos, han puesto de manifiesto la relación de secreción de VEGF con la densidad vascular y el valor pronóstico de VEGF en pacientes con neoplasias de diferentes orígenes.

Relacionada con la angiogénesis, se encuentran además otros elementos involucradas en los procesos inflamatorios. La densidad del infiltrado de macrófagos que acompaña al crecimiento neoplásico se ha relacionado con la progresión del mismo, probablemente a través de la secreción de citocinas y factores de crecimiento que favorecen la migración celular y la angiogénesis. De igual forma, la sobreexpresión de COX-2, asociada con enfermedades inflamatorias crónicas y algunos tipos de neoplasias, muestra un efecto tumorigénico, que depende principalmente de su acción proangiogénica indirecta, a través de la inducción de secreción de factores angiogénicos. Su utilidad como factor pronóstico ha sido puesta de manifiesto en diversos tipos de carcinomas.

En este trabajo hemos estudiado una serie de pacientes con carcinoma de mama analizando su densidad vascular, la secreción de VEGF-A por las células tumorales, la densidad de macrófagos, así como la expresión de COX-2, con los siguientes objetivos:

- Averiguar la relevancia de la densidad vascular y la expresión de VEGF-A, tanto por las células tumorales como por los macrófagos, en la diseminación a ganglios linfáticos, y su relación con otros factores pronósticos establecidos.
- Conocer la expresión de COX-2 en los diferentes tipos y grados histológicos de carcinoma de mama y su relación con la existencia de metástasis ganglionares y otros factores pronósticos

- Establecer la influencia de la densidad de macrófagos en la presencia de afectación ganglionar y su relación con la densidad vascular y la secreción de VEGF-A y COX-2.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. SELECCIÓN DEL MATERIAL

De las biopsias recibidas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria durante el periodo transcurrido entre 1999 y 2002, se seleccionaron aquellos casos correspondientes a patología mamaria.

De los 428 casos revisados se seleccionaron 172 según los siguientes criterios.

- **Criterios de inclusión:**

- a) Carcinomas de mama extirpados mediante mastectomía o tumorectomía.
- b) Primera neoplasia mamaria diagnosticada a la paciente.

- **Criterios de exclusión:**

- a) Lesiones benignas o las de potencial biológico incierto.
- b) Aquellos casos en los que únicamente tuviésemos diagnóstico por biopsia con aguja gruesa, aún cuando el diagnóstico fuera de carcinoma infiltrante.
- c) Pacientes previamente intervenidas por carcinoma mamario.
- d) Tratamiento quimio y/o radioterápico previo a la cirugía.
- e) Sexo masculino.

B. DATOS RECOGIDOS DE CADA CASO

De los informes anatomopatológicos se obtuvieron los siguientes datos:

- + Número de biopsia.
- + Datos clínicos: edad.
- + Tipo de intervención quirúrgica.

+ Diagnóstico anatomopatológico.

C. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

De los casos incluidos en el estudio se reevaluaron los siguientes datos histopatológicos clásicos sobre el material de archivo:

- **Tipo de neoplasia**, utilizando la clasificación de la OMS¹⁵⁶.
- **Tamaño tumoral**. Se consideró como una variable continua y dividido en dos grupos menor y mayor o igual a 2 cm de diámetro máximo postfijación según las recomendaciones del TNM¹⁵⁷.
- **Grado histológico**, utilizando la clasificación de Van Nuys para los carcinomas in situ¹⁵⁸, y la clasificación de Nottingham modificada por Bloom- Richardson¹⁵⁹ para los carcinomas infiltrantes.
- **Afectación ganglionar**, valorando el número de ganglios afectados y el número de ganglios aislados.

D. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La tinción inmunohistoquímica se realizó en un teñidor automático (DAKO TechMate Horizonte). Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- **Receptores de estrógenos**: para su determinación utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón contra RE α , clona 1D5, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona.
- **Receptores de progesterona**: utilizamos el anticuerpo monoclonal de ratón contra RP, clona 1A6, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona.
- **Oncoproteína p53**: utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona D0-7, prediluido, de DakoCytomation, SA, Barcelona, que tiñe tanto p53 natural como mutante.

- **Oncoproteína c-erb-B2:** para la detección inmunohistoquímica del c-erb-B2 utilizamos el kit de farmacodiagnóstico Herceptest™ (DakoCytomation, SA, Barcelona).
- **VEGF:** para la cuantificación de VEGF utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona C-1, SC7269, de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, que se corresponde con los aminoácidos 1-140 de la molécula de VEGF humano. Para este anticuerpo se utilizó una dilución 1:900 y precisó de incubación overnight en una habitación a 4°C.
- **Ciclooxygenasa-2:** para su detección inmunohistoquímica utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, COX-2, diluido a 1:900, de Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux.
- **CD 68:** Es un marcador histiocitario y para su determinación utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona KP1, prediluido, de Dako Cytomation, SA, Barcelona.
- **CD31:** para su determinación utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón, clona JC/70A, prediluido, de de Dako Cytomation, SA, Barcelona, las células marcadas por el anticuerpo muestran predominantemente tinción de la membrana celular, con una tinción más débil del citoplasma.

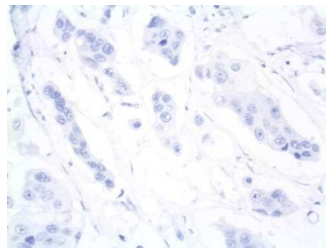
Los cortes se desparafinaron con xilol e hidrataron en gradiente de alcoholes. La recuperación del epitopo se realizó por el método de la olla a presión con buffer de citrato de sodio 0.1mol/l (pH 6). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno y para detectar el anticuerpo se utilizó la técnica de la estreptavidina-biotina inmunoperoxidasa (LASAB, Dako). Como control negativo se sustituyó el anticuerpo primario por un suero no inmune.

Como cromógeno se usó diaminobencidina y las preparaciones se contrastaron con hematoxilina., Techmate™).

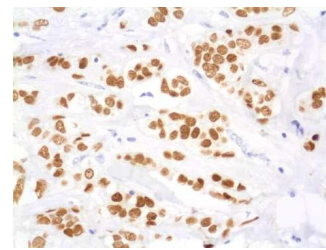
E. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

Receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), para su valoración se consideró (figura 1):

- *Positiva*: cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción igual o superior al 10%.
- *Negativa*: cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción inferior al 10%.



RE y RP negativos

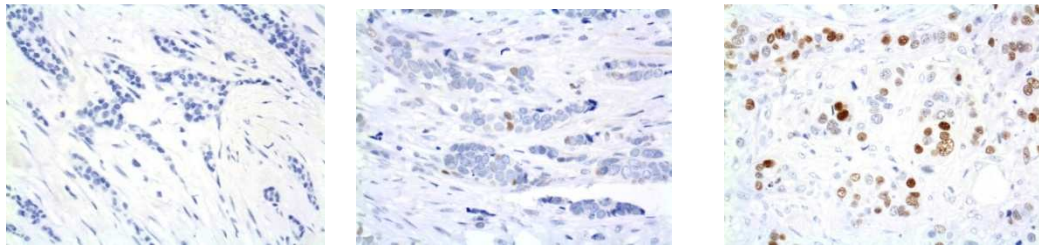


RE y RP positivos

Figura 1: Valoración de los receptores hormonales

Oncoproteína p53: se establecieron tres grupos (figura 2):

- *Negativa*: cuando no se observa ninguna célula neoplásica con tinción nuclear.
- *Positiva menor del 20%*: cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción inferior al 20%.
- *Positiva mayor del 20%*: cuando la tinción es nuclear, cualquiera que fuese su intensidad, y se encuentra presente en un proporción igual o superior al 20%.



p53 negativo

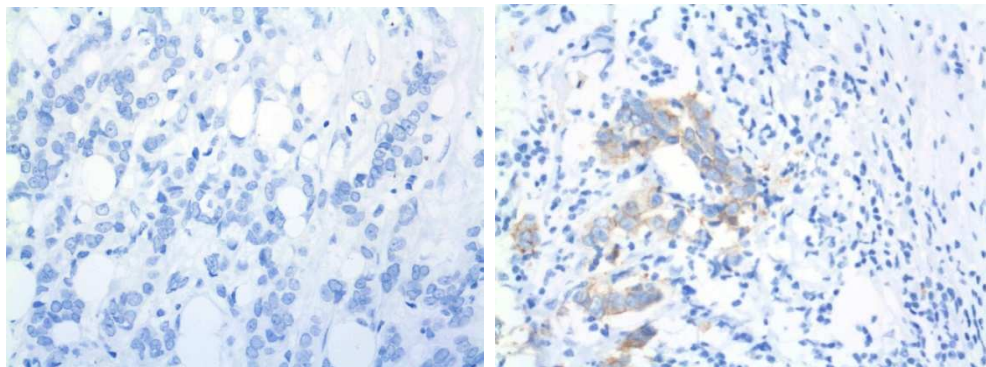
p53 positivo <20%

p53 positivo>20%

Figura 2: Valoración inmunohistoquímica de p53

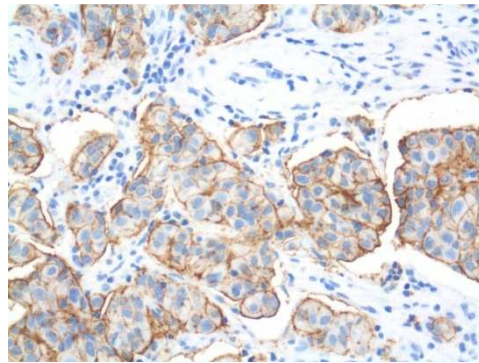
La **oncoproteína c-erbB-B2**: Las células marcadas específicamente por este anticuerpo presentan un patrón de tinción limitado a la membrana celular, utilizando el siguiente criterio para su evaluación (figura 3):

- + 0: Ausencia de tinción o existe en menos del 10%.
- + 1: Tinción de membrana débil o incompleta en más del 10% de las células tumorales
- + 2: Tinción de membrana débil o moderada y completa en más del 10% de las células tumorales
- + 3: Tinción de membrana fuerte y completa en más del 10% de las células tumorales.

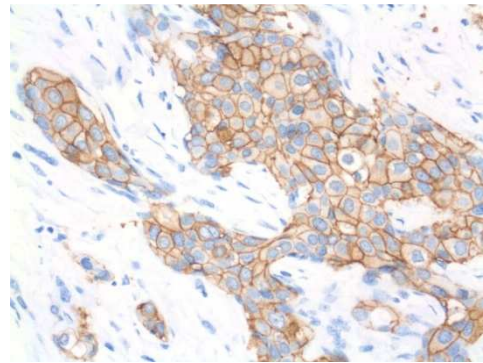


c-erbB-2 0

c-erbB-2 1+



c-erbB-2 2+



c-erbB-2 3+

Figura 3: Valoración inmunohistoquímica de c-erb-B2

Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos.

Los valores 2 y 3 fueron considerados positivos.

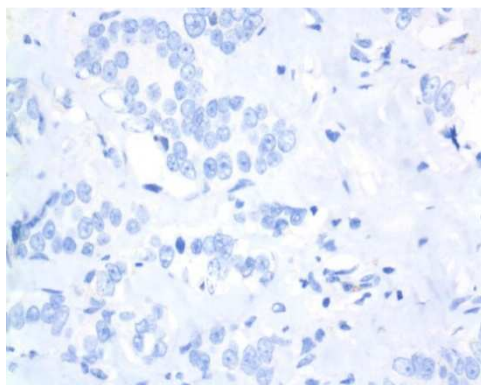
La **expresión de VEGF** se valoró, en las células tumorales, en el estroma y en los macrófagos, de 0 a 3+ (figura 4):

0: ausencia de tinción

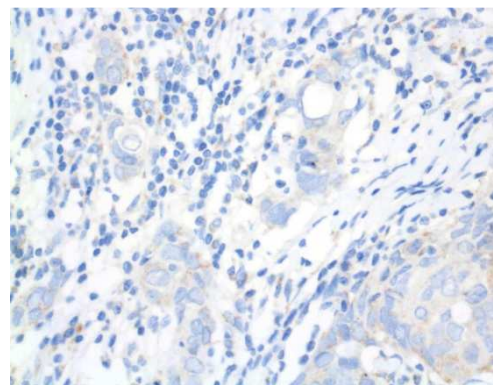
1+: débil tinción

2+: moderada tinción

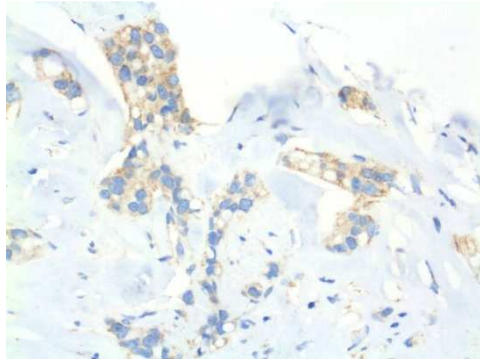
3+: tinción fuerte.



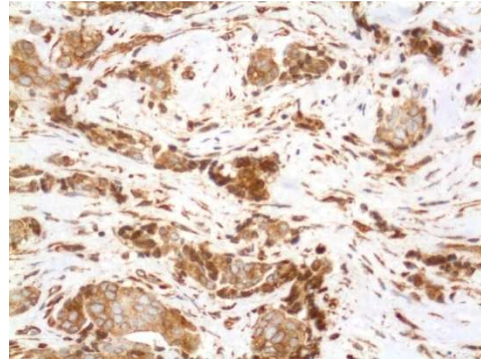
VEGF 0



VEGF 1+



VEGF 2+



VEGF 3+

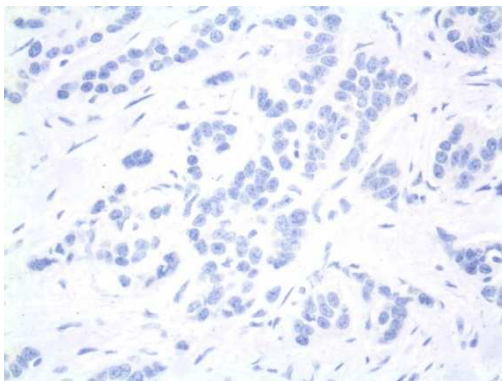
Figura 4: Valoración inmunohistoquímica de VEGF-A

Se consideraron dos grupos:

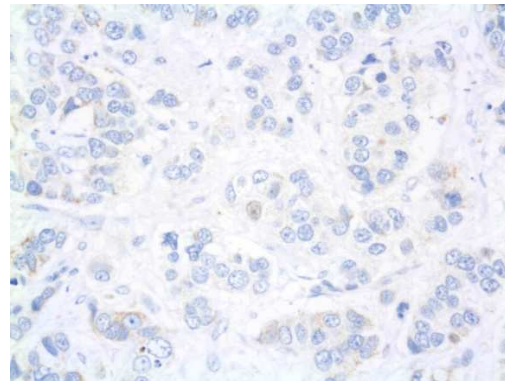
- Ausencia de tinción o tinción débil
- Tinción moderada o intensa

Ciclooxigenasa-2 (COX-2): Para la cuantificación de la COX-2 utilizamos el método descrito Davies y col.¹⁶⁰. La expresión de COX-2 fue evaluada de manera semicuantitativa valorando la intensidad de tinción citoplásmica, que puede ser (figura 5):

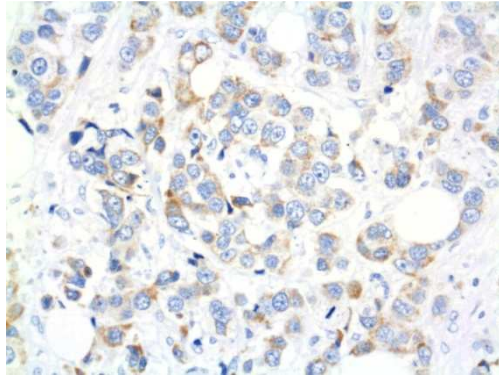
- 0: Ausencia de tinción.
- 1: débil tinción.
- 2: moderada tinción.
- 3: fuerte tinción.



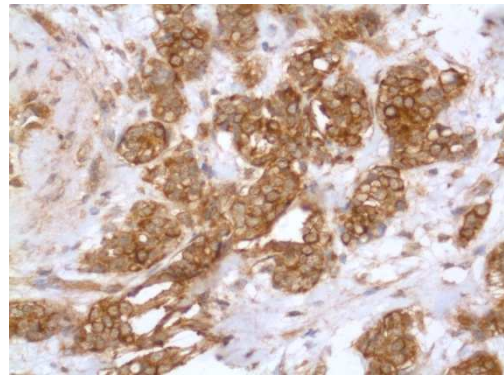
COX-2 valor 0



COX-2 valor 1+



COX-2 valor 2+



COX-2 valor 3+

Figura 5: Valoración inmunohistoquímica de COX-2

Además, se realiza una estimación del porcentaje de células positivas para cada intensidad en 10 campos de gran aumento. Se multiplica el porcentaje de células que presenta cada intensidad de tinción, y el resultado se suma, obteniendo un valor que oscilará de 0 a 300.

Considerándose:

- Negativo: 0 a 100.
- Positivo: 101 a 300.

CD 68 presenta un patrón de tinción granular o difuso del citoplasma (figura 6). Hemos valorado el índice macrófago, cuantificando las células que presentan tinción para CD68 en 5 campos consecutivos de gran aumento (400X), en áreas previamente identificadas como con alta densidad macrofágica.

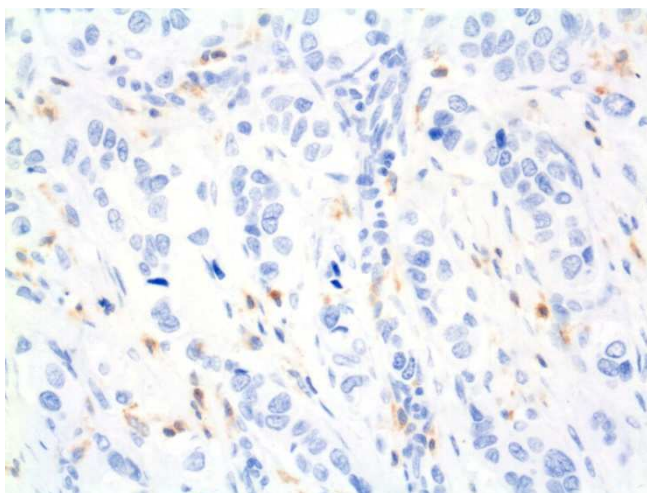


Figura 6: Tinción con CD 68.

CD31 es una proteína transmembranal de tipo 1, de una sola cadena, de 135 kDa, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El CD31 se expresa en todos los endotelios continuos, incluidos los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. Gracias a esta tinción pudimos encontrar en nuestras preparaciones los neovasos tumorales formados durante la carcinogénesis.

Cuantificación de neovasos tumorales asistido por ordenador (figura 7)

Para el estudio de la densidad de microvasos se visualizaron los cortes seleccionados y teñidos con CD 31 (anticuerpo de específico). Se realiza un barrido a pequeño aumento (10X) y se buscan tres puntos calientes o "hot-spots"; estos puntos representan las zonas de mayor densidad vascular tumoral. Estas se buscaban, siempre que era posible, en las periferias tumorales.

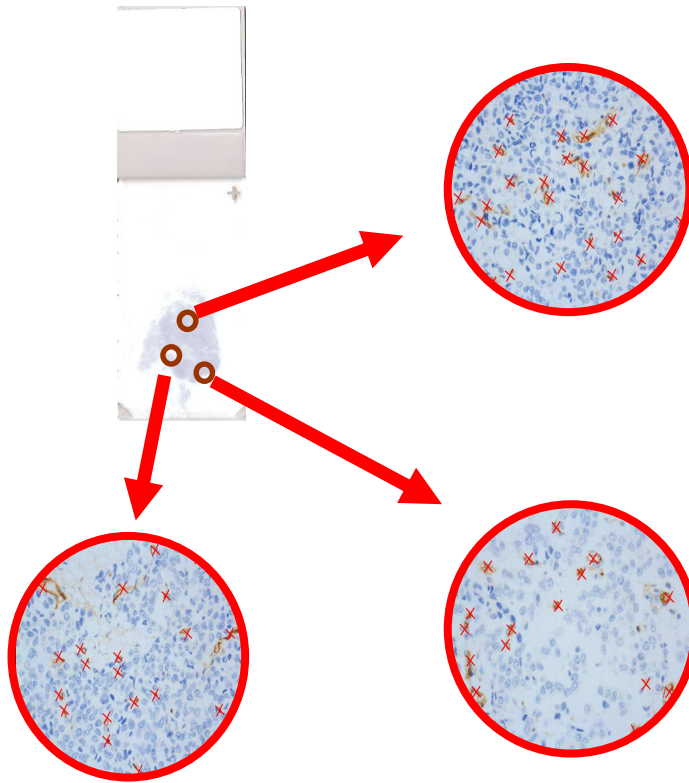


Figura 7: Cuantificación de la densidad de microvasos.

Para digitalizar las muestras se utilizó una cámara Polaroid I DMC y un objetivo macro. Se tomaron imágenes en color de 800x600 píxeles usando el objetivo 10x de un microscopio Nikon Eclipse E400 y posteriormente se analizaron con el software Visilog 6.3 de Noesis (Francia). La imagen resultante ocupó un área de 0.68mm^2 y en ese campo se contabilizaron los vasos presentes (este sería un "hot spot"). Este proceso se repitió tres veces por cada caso.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron recogidos de manera tabulada en una base de datos diseñada en Microsoft Excel. El estudio estadístico posterior, se realizó con la aplicación SPSS 17.0, para Windows XP professional.

Las variables consideradas en el trabajo fueron sometidas, en primer lugar, a un estudio estadístico descriptivo básico. Las variables continuas se evaluaron por su valor numérico real, tomando como valores representativos la media aritmética y la desviación típica.

Las variables nominales cualitativas, distribuidas en dos o más categorías según los casos, se evaluaron mediante el estudio de los recuentos y frecuencias correspondientes.

En un segundo tiempo se realizaron estudios univariantes y multivariantes para determinar cual de todas las variables consideradas tenía mayor significación estadística ($p < 0,05$).

Por último, se efectuó el análisis de supervivencia que incluyó:

1. Tabla de supervivencia general, que nos permitió averiguar la probabilidad de que un paciente afectado de cáncer de mama sobreviviera a un tiempo t determinado, que en nuestro caso fueron 120 meses divididos en periodos de 12 meses.
2. Supervivencia según método de Kaplan-Meier, que permitió construir curvas en la que se describió la evolución del grupo de pacientes desde el principio hasta el final del estudio, con las proporciones de supervivencia para diferentes intervalos de tiempo. La comparación de las curvas de supervivencia de 2 o más grupos de pacientes, para comprobar si existían diferencias significativas entre ellas se realizó mediante el test de log-rank y de Wilcoxon, que calculan las muertes esperadas y las comparan con las observadas.

IV. RESULTADOS

A. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA:

1. PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS:

1.1. Tipo histológico

El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal, que pudo observarse hasta en el 64% de los casos, mientras que los tipos papilar y mucinoso fueron los menos diagnosticados (3,5% y 4,1% respectivamente) (Figura 8 y Tabla 1).

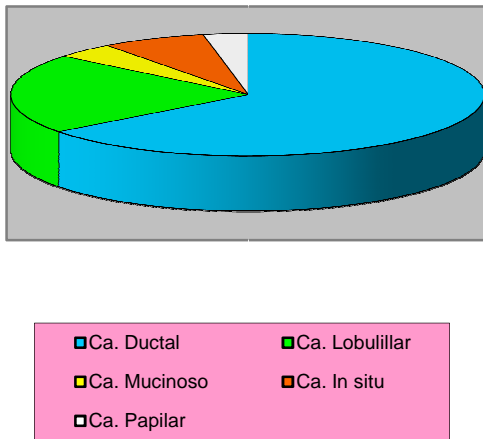


Figura 8: Tipo histológico.

Variable	Nº casos	Porcentaje (%)
<i>Ca. ductal</i>	110	64'0
<i>Ca. lobulillar</i>	37	21'5
<i>Ca. mucinoso</i>	7	4'1
<i>Ca. in situ</i>	12	7'0
<i>Ca. papilar</i>	6	3'5

Tabla 1: Tipo histológico

1.2. Tamaño

El tamaño tumoral, expresado en centímetros, mostró un valor medio de 2'3 cm, oscilando entre 0'3 y 10 cm. (Tablas 2 y 3).

Variable	Nº de casos	Media	D.T	Rango
<i>Tamaño</i>	172	2'31	1'40	0'30-10

Tabla 2: Tamaño tumoral

Tamaño	N° de casos	Porcentaje(%)
<i>Menor de 2 cm.</i>	100	58'1
<i>Mayor o igual a 2 cm.</i>	72	41'9

Tabla 3: Tamaño tumoral

1.3. Grado histológico

El grado histológico, establecido como bajo, intermedio y alto grado, demostró que el mayor número de casos (81) le correspondía al grado intermedio mientras que los grados bajo y alto presentaron un número similar de casos (48 y 43, respectivamente) (Figura 9).

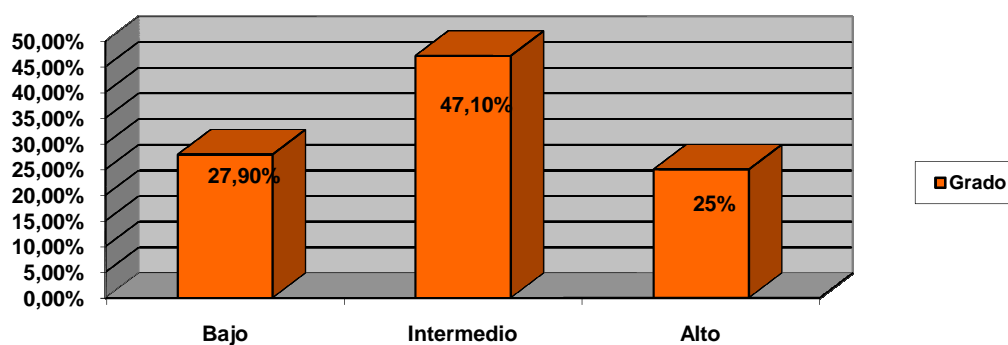


Figura 9: Distribución de la muestra según el grado histológico

1.4. Ganglios afectos

La proporción de casos fue muy similar entre los que presentaron ganglios afectos y ganglios libres de enfermedad, con un discreto mayor número de casos para el grupo con ganglios positivos (Figura 10). Cuando estudiamos el número de ganglios afectos encontramos una media de 6'15 ganglios, con un rango que osciló entre 1 y 28 (Tabla 4).

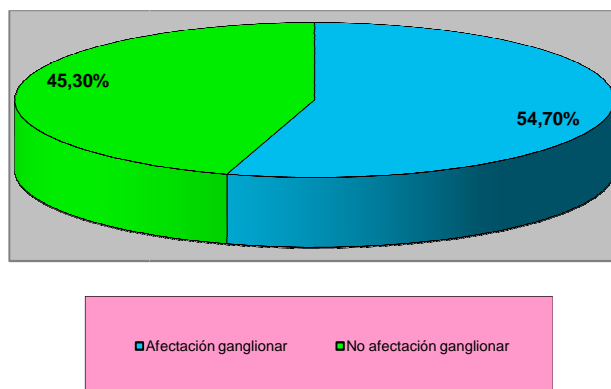


Figura 10: Distribución de los casos según la afectación ganglionar

Variable	Nº de casos	Media	D.T	Rango
Ganglios afectados	78	6'15	6'22	1-28

Tabla 4: Distribución del número de ganglios afectados.

1.5. Receptores hormonales

De los 172 casos estudiados, 128 presentaron receptores de estrógenos positivos y 130 receptores de progesterona positivos. Mientras que, tan solo, 42 casos mostraron positividad para c-erb-B2 (Figura 11).

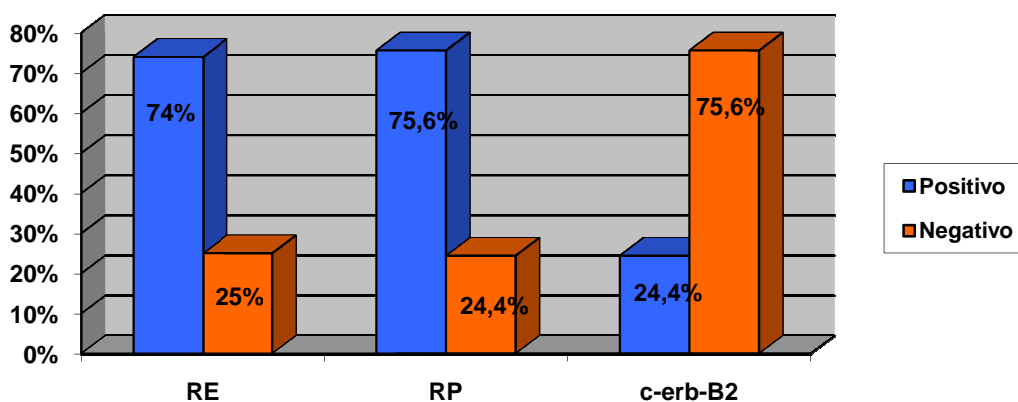


Figura 11: Distribución de los casos según los receptores hormonales y c-erb-B2

1.6. Expresión de p53

La expresión de p53 fue preferentemente negativa (71,5% de los casos), mientras que en los casos positivos la distribución fue similar entre los que presentaban tinción inferior (12,2%) o superior (16,3%) al 20% de las células (Tabla 5).

p53	Nº de casos	Porcentaje(%)
<i>Negativo</i>	123	71'5
<i>Positivo <20%</i>	21	12'2
<i>Positivo >20%</i>	28	16'3

Tabla 5: Distribución p53

2. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA ANGIOGÉNESIS

2.1. Expresión de VEGF en células tumorales y células macrofágicas

Cuando se valoró la expresión de VEGF en las células tumorales se observaron frecuencias similares entre los casos con tinción débil o ausente y tinción moderada o intensa. Pero cuando dicha expresión se estudió en los macrófagos peritumorales se pudo constatar que la mayor parte de los casos (76,7%) no expresaban VEGF (Figura 12).

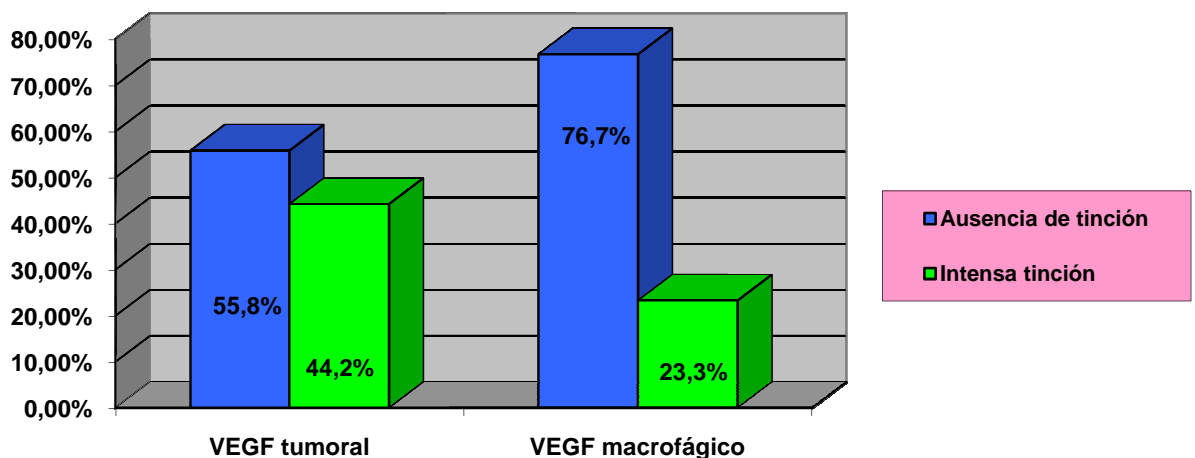


Figura 12: Expresión de VEGF en células tumorales y macrófagos

2.2. Densidad de microvasos

La densidad de microvasos, cuantificada en las tres áreas peritumorales de mayor densidad, mostró una media de 16'65 vasos (desviación típica de 8,3) (Tabla 6).

Variable	Nº de casos	Media	D.T	Rango
<i>Densidad de microvasos</i>	172	16'658	8'375	1-46'33

Tabla 6: Distribución según la densidad de microvasos

2.3. Expresión de COX-2

Los niveles de COX-2 oscilaron entre 0 y 300, dividiéndose en dos grupos, siendo discretamente más elevado el grupo considerado como negativo (Tabla 7)

COX-2	Nº de casos	Porcentaje (%)
<i>Negativo (0-100)</i>	90	52'3
<i>Positivo (101-300)</i>	82	47'7

Tabla 7: Expresión de COX-2

3. EXPRESIÓN DE CD68

Al valorar el índice macrofágico, cuantificando células teñidas con CD68 en cinco campos de gran aumento, se observó una media de 59'98 macrófagos, con un rango de entre 0 y 404 (Tabla 8).

Variable	Nº de casos	Media	Desviación típica	Rango
<i>CD 68</i>	172	59'98	60'345	0-404

Tabla 8: Distribución según CD 68

B. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

1. RELACIÓN DEL VEGF EN CÉLULAS TUMORALES CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

1.1 VEGF en las células tumorales y el tamaño tumoral (cm)

Al valorar el tamaño de las neoplasias estudiadas y los niveles de VEGF tumoral, vemos que éstos se correlacionan de manera inversa; aquellos casos con ausencia o tinción débil para VEGF tumoral presentan un tamaño tumoral mayor que aquellos con tinción moderada o intensa, siendo este resultado estadísticamente significativo (Tabla 9).

Tamaño tumoral (cm)	VEGF en células tumorales	Nº casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	96	2'61	1'55	p=0'002
	<i>Tinción moderada/Intensa</i>	76	1'92	1'92	

Tabla 9: Relación de VEGF en células tumorales y el tamaño tumoral.

1.2 VEGF en las células tumorales y el tipo histológico

Hemos constatado que, en los carcinomas ductales y los carcinomas in situ no se observan grandes diferencias en la expresión de VEGF en las células tumorales. Sin embargo, los carcinomas lobulillares presentaban, hasta en el 67,6% de los casos, tinción débil o ausente, mientras que los carcinomas papilares y los mucinosos mostraban, preferentemente, tinción moderada o intensa en el 83,3% y el 85,7% de los casos, respectivamente (p=0,03) (Tabla 10).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)					Sig.
	<i>Ca. ductal</i>	<i>Carcinoma lobulillar</i>	<i>Carcinoma mucinoso</i>	<i>Ca. in situ</i>	<i>Ca. papilar</i>	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	62(56'4)	25(67'6)	1(14'3)	7(58'3)	1(16'7)	p=0'03
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	48(43'6)	12(32'4)	6(85'7)	5(41'7)	5(83'3)	

Tabla 10: Relación de VEGF en células tumorales y el tipo histológico.

1.3 VEGF en las células tumorales y el grado histológico

Al estudiar la relación entre el VEGF tumoral y el grado histológico de la lesión no se han advertido diferencias significativas (Tabla 11).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)			Sig.
	Bajo grado	Grado intermedio	Alto grado	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	22 (45'8)	53 (65'4)	21 (48'8)	p=0'54
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	26 (54'2)	28 (34'6)	22 (51'2)	

Tabla 11: Relación del VEGF en células tumorales con el grado histológico.

1.4 VEGF en las células tumorales y afectación ganglionar

En la relación entre la afectación ganglionar y el nivel de expresión de VEGF en las células tumorales hemos podido observar que, en los casos con afectación ganglionar, hasta el 69,2% de los casos presentaban una tinción débil o ausente ($p= 0,002$), mientras que los casos sin afectación ganglionar no mostraron diferencias significativas en dicha expresión (Tabla 12).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)		Sig.
	Sin afectación ganglionar	Con afectación ganglionar	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	42 (44'7)	54 (69'2)	p=0'002
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	52 (55'3)	24 (30'8)	

Tabla 12: VEGF en las células tumorales y afectación ganglionar

Al estudiar el número de ganglios afectados y compararlos con la expresión de VEGF en las células tumorales, vemos que la expresión de VEGF tumoral es independiente del número de ganglios metastásicos (Tabla 13).

	VEGF en células tumorales	Nº de casos	Media	DT	Sig.
Ganglios afectados	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	54	6'17	6'83	p=0'26
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	24	6'13	4'68	

Tabla 13: VEGF en las células tumorales y nº de ganglios afectados

2. RELACIÓN DE VEGF EN CÉLULAS TUMORALES CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

2.1 VEGF en las células tumorales y los receptores hormonales

Al cuantificar el VEGF en las células tumorales y relacionarlos con la expresión de receptores hormonales, hemos observado que los casos con tinción de VEGF débil o ausente eran preferentemente RE positivos (58,6%), mientras que los casos con tinción moderada o intensa de VEGF eran con mayor frecuencia RE negativos (52,3%). Esta diferencia alcanza

valores con significación estadística ($p= 0,03$) al comparar la expresión de VEGF en las células tumorales con la expresión de los receptores de progesterona, siendo mayoritariamente moderada o intensa en los casos con RP negativos (57,1%) y ausente o débil en los casos con RP positivos (Tabla 14).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)		Sig	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	75 (58'6)	21 (47'7)	p=0'21	78 (60)	18 (42'9)	p=0'03
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	53 (41'4)	23 (52'3)		52 (40)	24 (57'1)	

Tabla 14: VEGF en las células tumorales y receptores hormonales

2.2 VEGF en las células tumorales y c-erb-B2

Cuando estudiamos la expresión de VEGF en las células tumorales en relación con la expresión de c-erb-B2 no observamos diferencias entre los casos negativos y positivos, siendo para los dos grupos preferentemente ausente o débil (56,2% y 54,8% respectivamente) (Tabla 15).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)		Sig.
	c-erb-B2 positivos	c-erb-B2 negativos	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	23 (54'8)	73 (56'2)	p=0'5
<i>Tinción moderada/intensa</i>	19 (45'2)	57 (43'8)	

Tabla 15: VEGF en las células tumorales y c-erb-B2.

2.3 VEGF en las células tumorales y p53

Al relacionar el VEGF tumoral con la expresión de p53, apreciamos que aquellos casos p53 negativos y los positivos <20% presentaban con más frecuencia ausencia de tinción o tinción débil (57,7% y 57,1% respectivamente), mientras que en los casos p53 positivos >20%, la tinción es mayoritariamente moderada o intensa (53,6%), aunque estas diferencias no alcanzan niveles de significación estadística (Tabla 16).

VEGF en células tumorales	Nº de casos (%)			Sig.
	p53 negativo	p53 positivo <20%	p53 positivo >20%	
Ausencia/Tinción débil	71(57'7)	12(57'1)	13(46'4)	p=0'5
Tinción moderada/intensa	52(42'3)	9(42'9)	15(53'6)	

Tabla 16: VEGF en las células tumorales y expresión de p53

2.4 VEGF en las células tumorales y COX-2

Los niveles de COX-2 observados el grupo de casos con ausencia o tinción débil de VEGF en células tumorales tienden a ser negativos, mientras que en el grupo con tinción moderada/intensa de VEGF en células tumorales hay un mayor número de casos positivos (Tabla 17).

VEGF en células tumorales	COX-2		Sig.
	Nº de casos (%)		
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	<i>Tinción moderada/intensa</i>	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	57(63'3)	39(47'6)	p=0'037
<i>Tinción moderada/intensa</i>	33(36'7)	43(52'4)	

Tabla 17: VEGF en las células tumorales y expresión de COX-2

2.5 VEGF en las células tumorales y CD 68

Los casos con tinción débil o ausente de VEGF en las células tumorales presentaron un índice macrofágico superior frente a aquellos casos con tinción moderada o intensa (Tabla 18).

CD68	VEGF en células tumorales	Nº de casos	Media	DT	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	96	62'25	69'09	p=0'23
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	76	57'12	47'33	

Tabla 18: VEGF en las células tumorales y expresión de CD68

2.6 VEGF en las células tumorales y densidad de microvasos

Cuando relacionamos la densidad de microvasos con la expresión de VEGF por parte de las células tumorales no observamos diferencias significativas entre los casos con tinción débil o ausente y los casos con tinción moderada o intensa, tan sólo un discreto mayor número de vasos

en los casos con ausencia de tinción o tinción débil de VEGF en la células tumorales (Tabla 19).

Densidad de microvasos	VEGF en células tumorales	Nº de casos	Media	DT	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	96	17'59	8'42	p=0'86
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	76	15'47	8'22	

Tabla 19: VEGF en las células tumorales y la densidad de microvasos

2.7 VEGF en las células tumorales y VEGF en los macrófagos

Hemos observado relación estadísticamente significativa entre la expresión de VEGF en las células tumorales y en los macrófagos. Cuando la expresión de VEGF era moderada o intensa en las células tumorales, también lo fue en los macrófagos hasta en el 65% de los casos mientras que cuando fue débil o ausente, también lo fue en los macrófagos hasta en el 62,1% de los casos (Tabla 20).

VEGF en células tumorales	VEGF en macrófagos		Sig.
	Nº de casos (%)		
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	<i>Tinción moderada/intensa</i>	p=0'002
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	82(62'1)	14(35'0)	
<i>Tinción moderada/intensa</i>	50(37'9)	26(65'0)	

Tabla 20: VEGF en las células tumorales y VEGF en los macrófagos

3. RELACIÓN DEL VEGF EN MACRÓFAGOS CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

3.1 VEGF en los macrófagos y el tamaño tumoral

El tamaño medio de las neoplasias estudiadas es discretamente mayor en los casos con tinción de VEGF en macrófagos moderada o intensa que en aquellos con ausencia o tinción débil (Tabla 21).

Tamaño tumoral (cm)	VEGF en macrófagos	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	132	2'28	1'21	p=0'81
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	40	2'38	1'92	

Tabla 21: VEGF en macrófagos y tamaño tumoral (cm)

3.2 VEGF en los macrófagos y el tipo histológico

No hemos encontrado relación entre el tipo histológico y la tinción de VEGF macrofágico, ya que independientemente del tipo histológico, en todos los casos el porcentaje mayor se encuentra en el grupo con ausencia de tinción o tinción débil (Tabla 22).

VEGF en macrófagos	Nº de casos (%)					Sig.
	Ca. ductal	Ca. lobulillar	Ca. mucinoso	Ca. in situ	Ca. papilar	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	79(71'4)	30(81'1)	7(100)	10(83'3)	6(100)	p=0'19
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	31(28'2)	7(18'9)	0(0)	2(16'7)	0(0)	

Tabla 22: VEGF en macrófagos y tipo histológico.

3.3 VEGF en los macrófagos y el grado histológico

No hemos encontrado relación entre el VEGF macrofágico y el grado histológico, en todos los casos hay tendencia la ausencia de tinción o tinción débil para VEGF en los macrófagos (Tabla 23).

VEGF en macrófagos	Nº de casos (%)			Sig.
	Bajo grado	Grado intermedio	Alto grado	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	41 (85'4)	63 (77'8)	28 (65'1)	p=0'07
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	7 (14'6)	18 (22'2)	15 (34'9)	

Tabla 23: VEGF en macrófagos y grado histológico.

3.4 VEGF en los macrófagos y afectación ganglionar

Tanto en los casos con afectación ganglionar, como en los que no presentan afectación ganglionar, existe un mayor número de casos con ausencia de tinción o tinción débil para VEGF en las células macrofágicas. (Tabla 24). Pero al estudiar los casos con ganglios positivos observamos que, en el grupo con expresión moderada/intensa de VEGF en los macrófagos, el número de ganglios afectados es mayor que en el grupo con tinción débil o ausente (p=0,005) (Tabla 25)

VEGF en macrófagos	Nº de casos (%)		Sig.
	Sin afectación ganglionar	Con afectación ganglionar	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	71 (75'5)	61 (78'2)	P=0'6
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	23 (24'5)	17 (21'8)	

Tabla 24: VEGF en los macrófagos y afectación ganglionar.

Ganglios afectos	VEGF en macrófagos	Nº de casos	Media	DT	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	61	5'70	5'67	p=0'05
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	17	7'76	7'82	

Tabla 25: VEGF en los macrófagos y nº de ganglios afectados

4. RELACIÓN DEL VEGF EN MACRÓFAGOS CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

4.1 VEGF en los macrófagos y los receptores hormonales

Al comparar los receptores hormonales con el VEGF en los macrófagos, observamos que tanto en RE como en RP positivos existe una notable tendencia a la ausencia de tinción o tinción débil para VEGF en los macrófagos, que se hace menos manifiesta en los casos RE y RP negativos. (Tabla 26).

VEGF en macrófagos	<i>Nº de casos (%)</i>		Sig.	<i>Nº de casos (%)</i>		Sig.
	RE positivos	RE negativos		RP positivos	RP negativos	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	106(82'8)	26(59'1)	p=0'002	105(80'8)	27(64'3)	p=0'02
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	22(17'2)	18(40'9)		25(19'2)	15(35'7)	

Tabla 26: VEGF en los macrófagos y receptores hormonales

4.2 VEGF en los macrófagos y c-erb-B2

Al cuantificar el VEGF en macrófagos, y relacionarla con la expresión de c-erb-B2, se observa que presentan, preferentemente, una tinción débil o ausente independientemente de la expresión de c-erb-B2 (Tabla 27).

VEGF en macrófagos	Nº de casos (%)		Sig.
	c-erb-B2 negativo	c-erb-B2 positivo	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	104 (80)	28 (66'7)	p=0'75
<i>Tinción moderada/Intensa</i>	26 (20)	14 (33'3)	

Tabla 27: VEGF en los macrófagos y expresión de c-erb-B2

4.3 VEGF en los macrófagos y p53

Hemos observado que, conforme aumenta la expresión de p53 en las células tumorales aumenta el número de casos con expresión moderada o intensa de VEGF en los macrófagos, hasta el 46,4% cuando la p53 era mayor del 20%. Esta diferencia ha resultado ser estadísticamente significativa (p=0,002) (Tabla 28).

VEGF en macrófagos	Nº de casos (%)			Sig.
	p53 negativo	p53 positivo <20%	p53 positivo >20%	
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	103(83'7)	14(66'7)	15(53'6)	p=0'002
<i>Tinción moderada/intensa</i>	20(16'3)	7(33'3)	13(46'4)	

Tabla 28: VEGF en los macrófagos y expresión de p53

4.4 VEGF en los macrófagos y COX-2

Apreciamos que los niveles de COX-2 son mayores en los casos con tinción moderada o intensa para VEGF en macrófagos que en aquellos con ausencia o tinción débil (Tabla 29).

VEGF en macrófagos	COX-2		Sig.
	Nº de casos (%)		
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	<i>Tinción moderada/intensa</i>	p=0'04
<i>Ausencia/Tinción débil</i>	75 (83'3)	57 (69'5)	
<i>Tinción moderada/intensa</i>	15 (16'7)	25 (30'5)	

Tabla 29: VEGF en los macrófagos y expresión de COX-2

4.5 VEGF en los macrófagos y CD 68

Al comparar la expresión de VEGF en macrófagos y el índice macrofágico (CD68) podemos ver que, los casos con tinción moderada o intensa presentan un mayor índice macrofágico que aquellos en los que la expresión de VEGF en los macrófagos es débil o ausente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p= 0,03) (Tabla 29).

CD68	VEGF en macrófagos	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	132	48'24	48'62	p=0'03
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	40	98'73	77'58	

Tabla 29: VEGF en los macrófagos y expresión de CD68

4.6 VEGF en los macrófagos y densidad de microvasos

Cuando estudiamos la densidad de microvasos advertimos que es discretamente superior en los casos con tinción de VEGF en macrófagos moderada o intensa que en los que presentan una tinción débil o ausente. (Tabla 30).

Densidad de microvasos	VEGF en macrófagos	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Ausencia/Tinción débil</i>	132	16'55	8'50	p=0'98
	<i>Tinción moderada/intensa</i>	40	17'01	8'03	

Tabla 30: VEGF en los macrófagos y densidad de microvasos

5. RELACIÓN DE COX-2 CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

5.1 COX-2 y tamaño tumoral

No se ha encontrado relación entre los niveles de COX-2 y el tamaño tumoral (Tabla 31).

COX-2	Tamaño		Sig.
	<i>Nº de casos (%)</i>		
	Menor de 2 cm.	Mayor de 2 cm.	
Negativa (0-100)	53(53)	37(51'4)	p=0'87
Positiva (101-300)	47(47)	35(48'6)	

Tabla 31: Relación de COX-2 y el tamaño tumoral

5.2 COX-2 y el tipo histológico

Al estudiar el valor de COX-2 en los diferentes tipos histológicos, solo en el grupo de los carcinomas lobulillares, hay un mayor número de casos con valores de COX-2 positivos. No encontrándose ningún caso de carcinoma papilar con valores de COX-2 positivos. (Tabla 32)

COX-2	Tipo histológico					Sig.
	Nº de casos (%)					p=0'07
	Ductal	Lobulillar	Mucinoso	In situ	Papilar	
Negativa (0-100)	57(51'8)	13(35'1)	6(85'7)	8(66'7)	6(100)	
Positiva (101-300)	53(48'2)	24(64'9)	1(14'3)	4(33'3)	0(0)	

Tabla 32 : Relación de COX-2 y el tipo histológico

5.3 COX-2 y grado histológico

Al relacionar los valores de COX-2 con los distintos tipos histológicos observamos como casi no existen diferencias en el grupo de grado intermedio. En los grupos extremos (bajo y alto grado) se observa una relación directa, puesto que, en el grupo de bajo grado existe un mayor número de casos con negatividad para COX-2, mientras que se observa más positividad para COX-2 en los casos de alto grado. Esta relación es estadísticamente significativa (Tabla 33).

COX-2	Grado histológico			Sig.
	Nº de casos (%)			p=0'001
	Bajo	Intermedio	Alto	
Negativa (0-100)	34 (70'8)	42 (51'9)	14 (32'6)	
Positiva (101-300)	14 (29'2)	39 (48'1)	29 (67'4)	

Tabla 33: Relación de COX-2 y el grado histológico

5.4 COX-2 y afectación ganglionar

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de COX-2 y la afectación ganglionar. Sólo reseñar que en el grupo con afectación ganglionar, se ha observado un número mayor de casos que presentan negatividad para COX-2. Sin embargo, la distribución de los casos según la positividad o negatividad para COX-2, en los casos sin afectación ganglionar, es exactamente la misma (Tabla 34).

COX-2	Nº de casos (%)		Sig.
	Sin afectación ganglionar	Con afectación ganglionar	
Negativa (0-100)	47 (50)	43 (55'1)	p=0'5
Positiva (101-300)	47 (50)	35 (44'9)	

Tabla 34: Relación de COX-2 y la afectación ganglionar

6. RELACIÓN DEL COX-2 CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

6.1 COX-2 y receptores hormonales

Al cuantificar los niveles de COX-2 en las neoplasias según sean receptores hormonales positivos o negativos, se obtiene mayor número de casos COX-2 positivos en aquellos casos receptores de estrógenos y progesterona negativos. Mientras, que en los casos receptores de estrógenos y progesterona positivos, es mayor el número de casos negativos para COX-2, siendo ambos resultados estadísticamente significativo (Tablas 35 y 36).

COX-2	Nº de casos (%)		Sig.
	RE positivos	RE negativos	
Negativa (0-100)	75 (58'6)	15 (34'1)	p=0'004
Positiva (101-300)	53 (41'4)	29 (65'9)	

Tabla 35: Relación de COX-2 y receptores hormonales (estrógenos)

COX-2	Nº de casos (%)		Sig.
	RP positivos	RP negativos	
Negativa (0-100)	76 (58'5)	14 (33'3)	p=0'004
Positiva (101-300)	54 (41'5)	28 (66'7)	

Tabla 36 : Relación de COX-2 y receptores hormonales (progesterona).

6.2 COX-2 y c-erb-B2

La mayoría de los casos c-erb-B2 negativos muestran negatividad para COX-2 y dentro del grupo de los c-erb-B2 positivos son más numerosos aquellos con positividad para COX-2, no siendo este resultado estadísticamente significativo (Tabla 37).

COX-2	Nº de casos (%)		Sig.
	Positivos	Negativos	
Negativa (0-100)	18 (42'9)	72 (55'4)	p=0'158
Positiva (101-300)	24 (57'1)	58 (44'6)	

Tabla 37: Relación de COX-2 y c-erb-B2

6.3 COX-2 y p53

En los casos con expresión para p53 mayor del 20% existe un mayor número de casos con positividad para COX-2 y en los casos con negatividad para p53 se observa un mayor número de casos que muestran negatividad para COX-2, siendo este resultado estadísticamente significativo.

COX-2	Nº de casos (%)			Sig.
	p53 negativa	p53 positiva <20%	p53 positiva >20%	
Negativa (0-100)	71 (57'7)	13 (61'9)	6 (21'4)	p=0'002
Positiva (101-300)	52 (42'3)	8 (38'1)	22 (78'6)	

Tabla 38: Relación de COX-2 y p53.

6.4 COX-2 y CD 68

Se ha encontrado una relación directa entre los valores de COX-2 y de CD 68, los valores de CD 68 son menores en el grupo de COX-2 negativo, mientras que en el grupo de COX-2 positivos dichos valores son superiores, siendo estos resultados estadísticamente significativo (Tabla 39).

	COX-2	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD 68	Negativa (0-100)	90	51'48	59'28	p=0'05
	Positiva (101-300)	82	69'32	60'47	

Tabla 39: Relación de expresión de COX-2 y expresión de CD68.

6.5 COX-2 y densidad de microvasos

No se ha encontrado relación entre los valores de COX-2 y la densidad de microvasos (Tabla 40).

Densidad de microvasos	COX-2	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	Negativa (0-100)	90	16	8'8	p=0'5
	Positiva (101-300)	82	17	7'9	

Tabla 40: Relación de expresión de COX-2 y la densidad de microvasos.

7. RELACIÓN DEL ÍNDICE MACROFÁGICO (CD 68) CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

7.1 Índice macrofágico (CD 68) y tamaño tumoral

Existe una correlación directa entre la expresión de CD 68 y el tamaño de la neoplasia, que es estadísticamente significativa ($p=0'03$). (Tabla 41)

CD68	Tamaño tumoral (cm)		
	Nº de casos	C. de Pearson	Sig.
	172	0'158	p=0'03

Tabla 41: Relación de expresión de CD 68 y el tamaño tumoral

7.2 Índice macrofágico (CD 68) y el tipo histológico

Al estudiar el índice macrofágico en los diferentes tipos histológicos hemos observado que la media varía de un tipo a otro, siendo el carcinoma mucinoso el que presentaba valores más bajos mientras que el carcinoma ductal los más altos. Los tipos lobulillar y papilar y el carcinoma in situ presentaban valores muy similares (Tabla 42).

	Tipo histológico	Nº de casos	Media	D.T
CD 68	<i>Ca. ductal</i>	110	70'90	64'93
	<i>Ca. lobulillar</i>	37	45'59	38'84
	<i>Ca. mucinoso</i>	7	24'29	32'13
	<i>Ca. in situ</i>	12	36'58	73'02
	<i>Ca. papilar</i>	6	37'00	29'89

Tabla 42: Relación de expresión de CD 68 y el tipo histológico.

El test de comparaciones múltiples, muestra que la mayor diferencia de expresión de CD68, se obtiene al comparar los carcinomas ductales con los lobulillares. Así mismo se obtuvo un resultado estadísticamente significativo al comparar los carcinomas ductales con los mucinosos. (Tabla 43)

Tipo histológico		Sig.
<i>Ca ductal</i>	<i>Ca lobulillar</i>	p=0'02
	<i>Ca mucinoso</i>	p=0'04
	<i>Ca in situ</i>	p=0'05
	<i>Ca papilar</i>	p=0'17

Tabla 43: Expresión de CD 68 entre carcinomas ductales y los otros tipos histológicos.

7.3 Índice macrofágico (CD 68) y el grado histológico

El índice macrofágico mostró una clara relación con el grado tumoral, siendo más alto a mayor grado histológico de la lesión, estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 44).

	Grado histológico	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD68	<i>Bajo grado</i>	48	45'60	49'54	p=0'03
	<i>Grado intermedio</i>	81	58'9	52'47	
	<i>Alto grado</i>	43	78'00	79'14	

Tabla 44: Relación de expresión de CD 68 y el grado histológico.

7.4 Índice macrofágico (CD 68) y la afectación ganglionar

La expresión de CD68 fue ligeramente superior en los casos con afectación ganglionar que en los casos sin afectación, sin llegar a alcanzar valores estadísticamente significativos (Tablas 45 y 46).

	Afectación ganglionar	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD68	<i>Sin afectación ganglionar</i>	94	55'34	58'98	p=0'78
	<i>Con afectación ganglionar</i>	78	65'58	61'86	

Tabla 45: Relación de expresión de CD 68 y la afectación ganglionar.

CD68	<i>Ganglios afectos</i>		
	Nº de casos	C. de Pearson	Signif.
	78	0'157	p=0'16

Tabla 46: Relación de expresión de CD 68 y los ganglios afectos.

8. RELACIÓN DEL ÍNDICE MACROFÁGICO CON LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

8.1 Índice macrofágico (CD 68) y los receptores hormonales

En los casos con RE positivos se pudo constatar un menor índice macrofágico (media de 51,57) que en aquellos que no expresaban RE (media de 84,45), alcanzando esta diferencia niveles de significación estadística (Tabla 47). Sin embargo, al estudiar la expresión de los RP y relacionarlo con los valores de CD68, no se observaron diferencias entre los casos positivos y negativos (Tabla 48).

	RE	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD68	<i>Positivo</i>	128	51'57	47'37	p=0'002
	<i>Negativo</i>	44	84'45	83'84	

Tabla 47 : Relación de expresión de CD 68 y RE.

	RP	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD68	<i>Positivo</i>	130	59'77	62'13	p=0'7
	<i>Negativo</i>	42	60'64	55'12	

Tabla48: Relación de expresión de CD 68 y RP.

8.2 Índice macrofágico (CD 68) y c-erb-B2

Al estudiar c-erb-2 hemos advertido una media de indice macrofágico, discretamente superior en los casos con expresión positiva en comparación con los negativos, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 49).

	c-erb-B2	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
CD68	<i>Positivo</i>	42	66'31	75'31	p=0'121
	<i>Negativo</i>	130	57'94	54'83	

Tabla 49: Relación de expresión de CD 68 y c-erb-B2.

8.3 Índice macrofágico (CD 68) y p53

La mayor diferencia entre los valores medios de CD68 en los distintos grupos de p53 se encuentra en aquellos casos negativos con los positivos, tanto <20% como >20%, siendo estadísticamente significativo (Tabla 50 y 51).

	p53	Nº de casos	Media	D.T
CD68	<i>Negativo</i>	123	49'63	54'51
	<i>Positivo <20%</i>	21	93'00	87'94
	<i>Positivo >20%</i>	28	80'71	46'08

Tabla 50 : Relación de expresión de CD 68 y p53.

p53		Sig.
<i>Negativo</i>	<i>Positivo <20%</i>	p=0'002
	<i>Positivo >20%</i>	p=0'01

Tabla 51 : Relación de expresión de CD 68 y p53 positivos.

8.4 Índice macrofágico (CD 68) y densidad de microvasos

Al estudiar la correlación de CD 68 con la densidad de microvasos, hemos obtenido una correlación directa positiva, pero no significativa (Tabla 52).

CD68	<i>Densidad de microvasos</i>		
	Nº de casos	C. de Pearson	Sig.
	172	0'10	p=0'16

Tabla 52: Relación de expresión de CD 68 y densidad de microvasos.

9. RELACIÓN DE LA DENSIDAD DE MICROVASOS CON FACTORES HISTOPATOLÓGICOS

9.1 Densidad de microvasos y el tipo histológico

Al analizar la densidad de microvasos en los distintos tipos histológicos, encontramos que la media más elevada se encontraba en los carcinomas ductales y lobulillares, mientras que los otros tipos (mucinoso, papilar e "in situ") era discretamente menor, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 53).

Densidad de microvasos	Tipo histológico	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Ca. ductal</i>	110	17'46	8'84	p=0'382
	<i>Ca. lobulillar</i>	37	17'31	7'31	
	<i>Ca. mucinoso</i>	7	11'42	6'57	
	<i>Ca. in situ</i>	12	11'66	6'46	
	<i>Ca. papilar</i>	6	13'94	6'48	

Tabla 53: Relación de la densidad de microvasos y el tipo histológico.

9.2 Densidad de microvasos y el tipo histológico y la afectación ganglionar

Al estudiar la densidad de microvasos e intentar estudiar su relación con el estado de los ganglios (afectos por la neoplasia o no) observamos que en el grupo de ganglios negativos la densidad de microvasos es

discretamente menor que en el grupo con afectación ganglionar, no presentando estos resultados significación estadística (Tabla 54 y 55).

Densidad de microvasos	Afectación ganglionar	Nº de casos	Media	D.T	Sig.
	<i>Sin afectación ganglionar</i>	94	15'90	8'45	0'82
	<i>Con afectación ganglionar</i>	78	17'57	8'23	

Tabla 54: Relación de expresión de la densidad de microvasos y la afectación ganglionar.

CD68	<i>Ganglios afectados</i>		
	Nº de casos	C. de Pearson	Signif.
	78	0'25	p=0'82

Tabla 55: Relación de la densidad de microvasos y los ganglios afectados.

C. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA EN RELACIÓN CON FACTORES ANGIOGÉNICOS

1. SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE

Gracias a la colaboración del Registro Hospitalario de Tumores del Hospital Universitario Virgen Victoria de Málaga, obtuvimos los datos de supervivencia de 167 de las 172 pacientes incluidas en nuestra serie (gráfico 1)

Al estudiar la curva de supervivencia general de las pacientes de nuestra serie observamos que la mayoría de las pacientes fallecen entre los 20 y los 78 meses, y esta curva se mantiene casi estabilizada en el tiempo, con

una tasa de supervivencia del 83% a los 120 meses de seguimiento (gráfico 1).

SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE

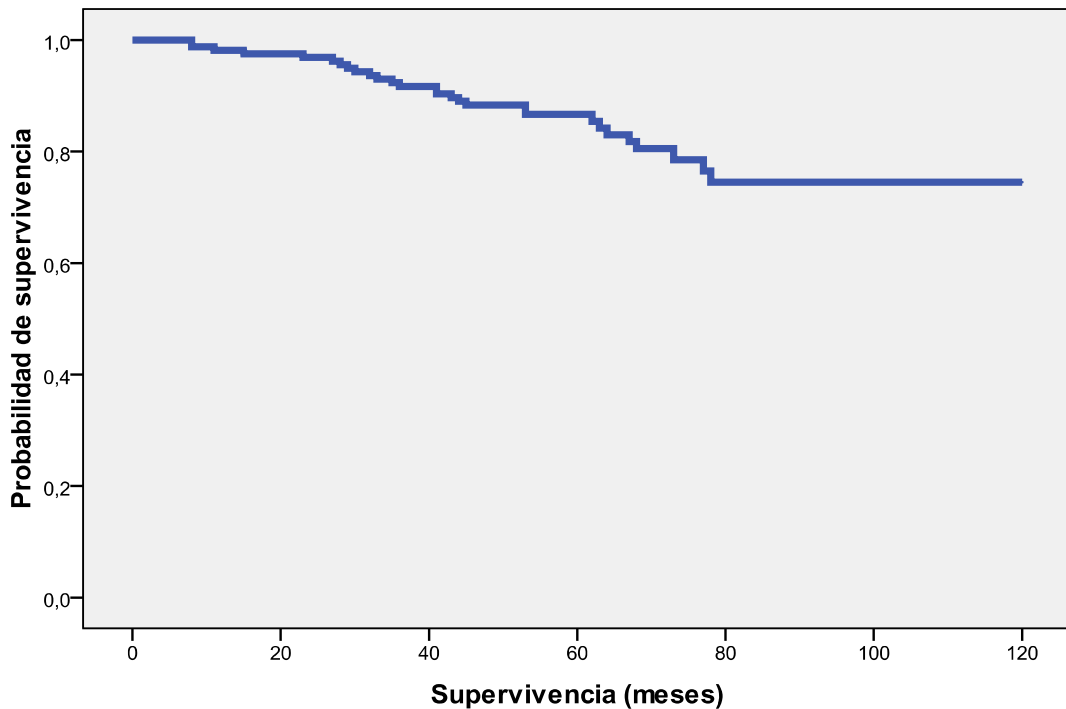


Gráfico 1: Supervivencia global de la serie.

2. SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE SEGÚN LOS NÍVELES DE VEGF EN CÉLULAS TUMORALES

Al estudiar supervivencia de nuestros casos según los niveles de VEGF en las células tumorales, observamos que entre los 20 y los 60 meses existe unas mayores tasas de supervivencia en el grupo con tinción de VEGF en las células tumorales moderada o intensa que en aquellos con niveles de VEGF débiles o ausentes. Entre los 60 y los 74 meses la tasa de supervivencia desciende en un valor cercano al 78%. A partir de entonces se mantiene estable en ambos grupos, siendo discretamente más elevada

en el grupo con tinción para VEGF débil o ausente, no siendo estos resultados estadísticamente significativo (Log Rank=0'557) (Gráfico 2).

VEGF EN LAS CÉLULAS TUMORALES

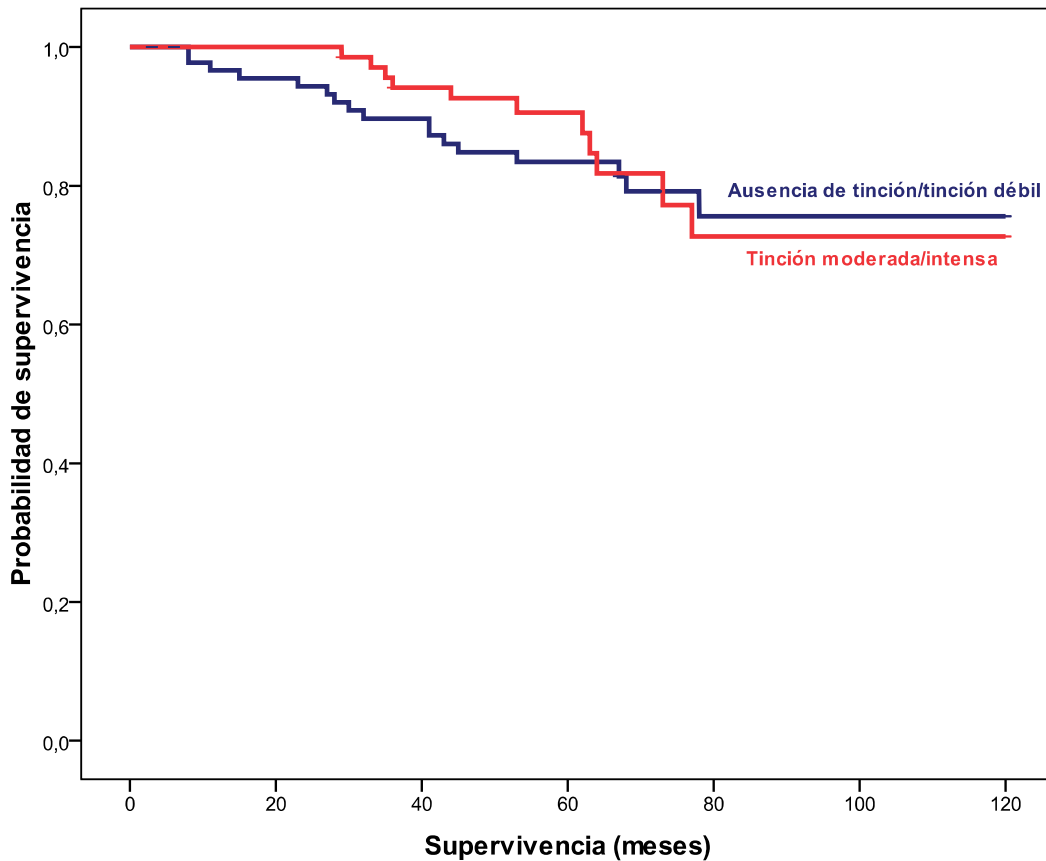


Gráfico 2: Relación de la expresión del VEGF en las células tumorales con la supervivencia.

3. SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE SEGÚN LOS NÍVELES DE VEGF EN LOS MACRÓFAGOS

Al estudiar la relación de los valores de VEGF en macrófagos con la tasa de supervivencia fallecen de forma progresiva, mientras que en el grupo con tinción moderada o intensa ocurre de forma escalonada, estabilizándose dichos valores a partir del mes 76 y quedándose con una tasa de supervivencia en torno del 80% para el grupo con tinción ausente

o débil para VEGF en los macrófagos y del 78% para el grupo con tinción moderada o intensa para VEGF en macrófagos (gráfico 3), estas diferencias no son significativas (Log Rank= 0'734).

VEGF EN LOS MACRÓFAGOS:

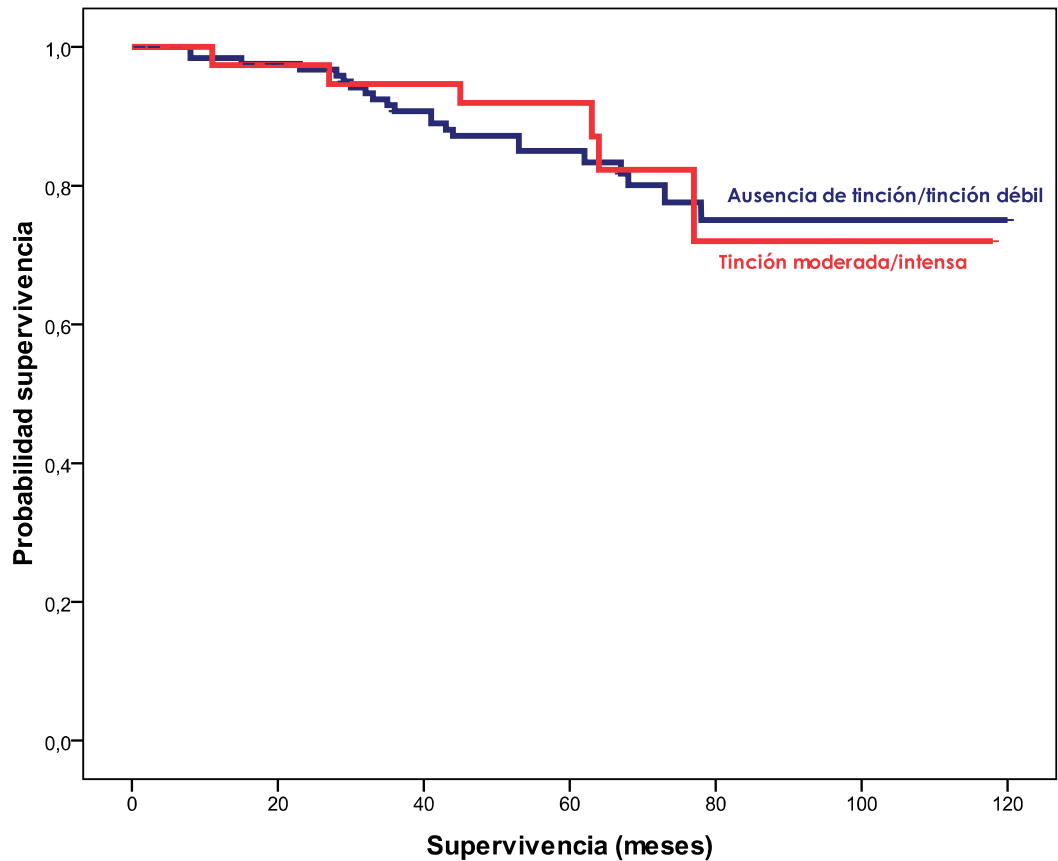


Gráfico 3: Relación de la expresión del VEGF en macrófagos con la supervivencia.

4. SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE SEGÚN LOS NÍVELES DE COX-2

Al estudiar la relación entre la tinción para COX-2 y las tasas de supervivencia, observamos como los dos grupos se comportan casi en paralelo, existiendo un mayor número de fallecimientos entre los meses 30 al 80 y estabilizándose a partir del mes 80 de seguimiento, con una

tasa de supervivencia similar en el grupo COX-2 negativo y en el grupo COX-2 positivo, no siendo estos resultados estadísticamente significativo (Log Rank=0'884) (gráfico 4).

COX2

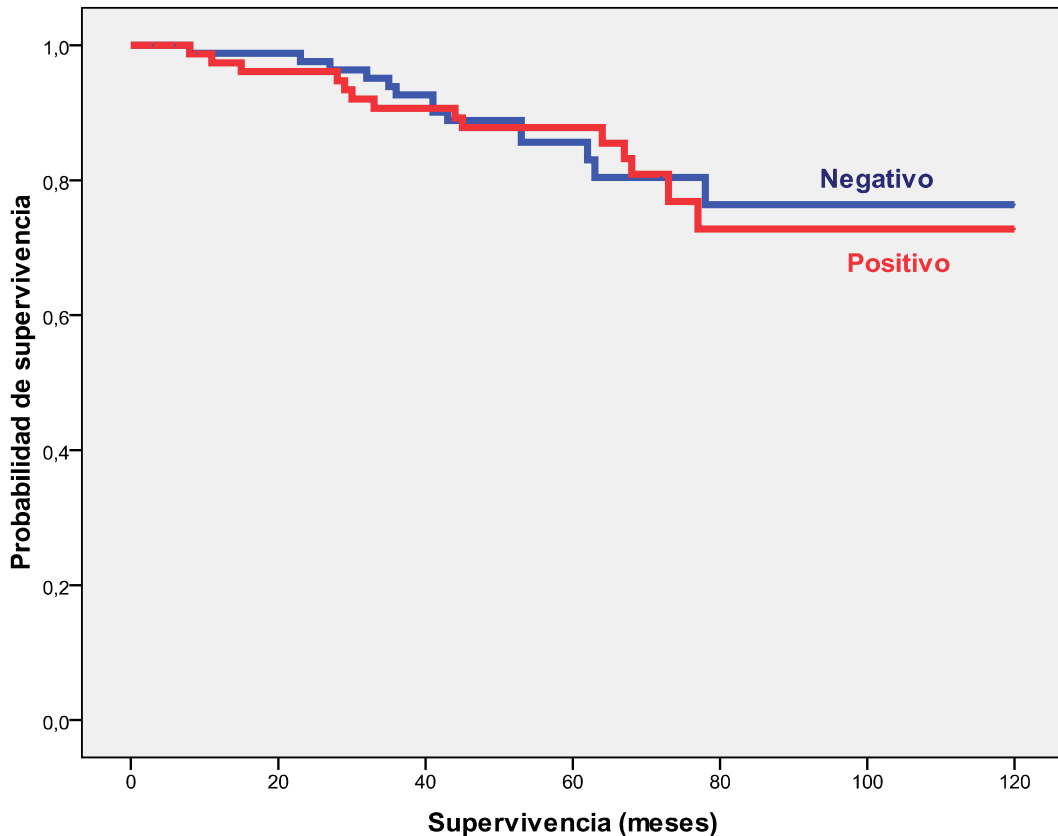


Gráfico 4: Relación de la expresión de COX-2 con la supervivencia.

5. SUPERVIVENCIA SEGÚN EL ÍNDICE MACROFÁGICO

Al estudiar la relación entre el índice macrofágico y las tasas de supervivencia, las mayores diferencias las observamos a partir del mes 70 de seguimiento, en donde se estabilizan ambos grupos, pero con diferentes tasas. Mientras que en el grupo con un índice macrofágico menor de 60 las tasas de supervivencia son del 82%, en el grupo con

índice macrofágico mayor de 60 es del 62%, no siendo estos resultados estadísticamente significativo (Log Rank=0'257) (gráfico 5).

ÍNDICE MACROFÁGICO (CD 68):

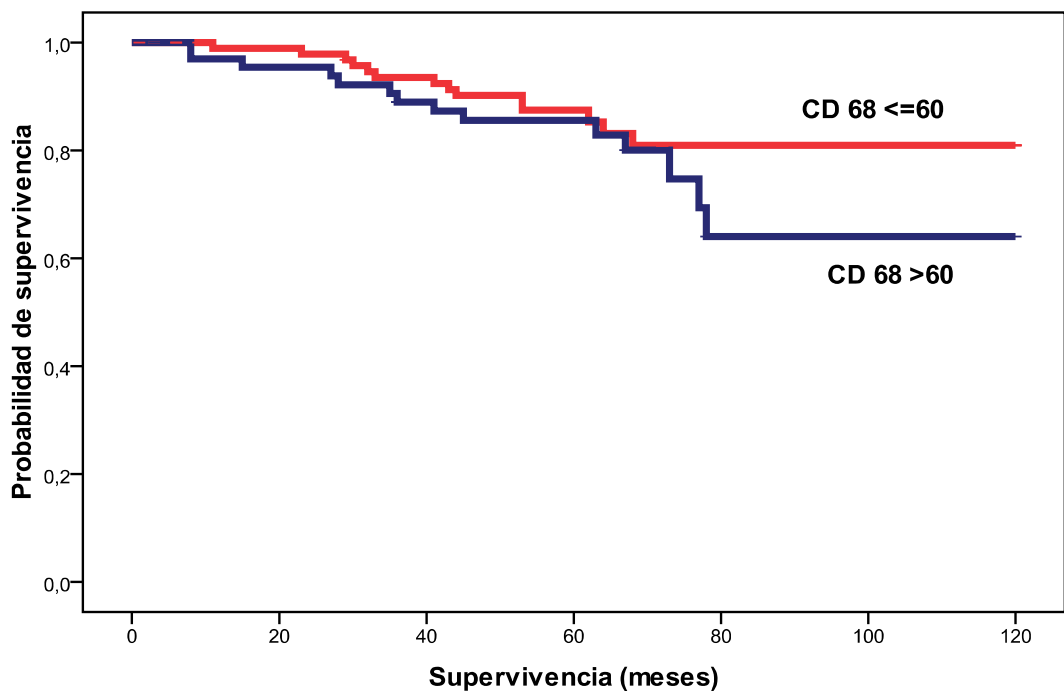


Gráfico 5: Relación de la expresión de índice macrofágico (CD68) con la supervivencia.

6. SUPERVIVENCIA SEGÚN LA DENSIDAD DE MICROVASOS

Al estudiar la supervivencia de nuestros casos en relación a la densidad de microvasos hemos considerado dos grupos: menor que la media y mayor que la media; observando que en aquellos casos con menor densidad de microvasos, la supervivencia hasta el mes 62 de seguimiento es discretamente mayor, unificándose en este punto, para posteriormente volver a ser discretamente mayor, hecho que se mantiene estable en el

tiempo, sin ser estos resultados estadísticamente significativos (Log Rank= 0'358) (gráfico 6).

Densidad de microvasos:

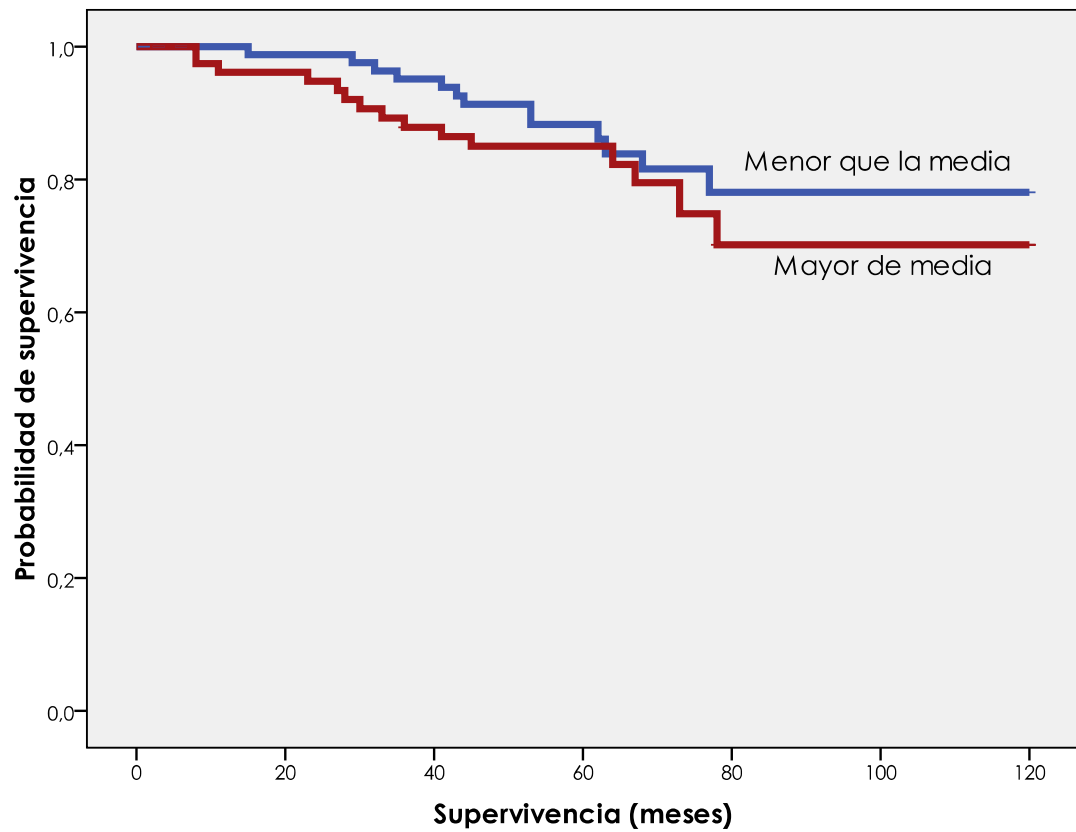


Gráfico 6: Relación de la densidad de microvasos con la supervivencia.

V. DISCUSIÓN

El crecimiento de los tumores sólidos y su diseminación metastásica es dependiente de la angiogénesis¹⁶¹. La angiogénesis que da lugar a la microvascularización tumoral es un requisito ampliamente reconocido tanto para el crecimiento del tumor como para su diseminación¹⁶². Tras ponerse de manifiesto la importancia que tiene la angiogénesis en la progresión tumoral, se buscó el método de cuantificarla, para así poder establecer comparaciones. La forma más generalizada ha sido el conteo de los microvasos asociados al crecimiento neoplásico que, aunque de modo grosero y estático, no deja de ser un reflejo de la capacidad del tumor para crear neovascularización. Para ello se han utilizado diferentes marcadores endoteliales con técnica inmunohistoquímica, con lo que se consigue resaltar los vasos al diferenciarlos del resto del tejido.

Los marcadores vasculares más utilizados han sido Factor VIII (localizado en el citoplasma del endotelio vascular y con importante papel en la adhesión y agregación plaquetaria), CD31/PECAM-1 (glicoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular), y CD34 (antígeno glicoproteico de superficie de célula progenitora del sistema hematopoyético humano). Todos ellos son suficientemente válidos, pero no específicos de vasos neoformados, por lo que se han de asumir errores por inclusión en el conteo de vasos preexistentes en los tejidos.

Recientemente, se ha introducido, como nuevo marcador endotelial, CD105, un antígeno de membrana que funciona como receptor de TGF β 1, también conocido como endoglina, y cuyo atractivo es su mayor especificidad por el endotelio de los neovasos¹⁶³.

La técnica más comúnmente utilizada para evaluar vascularización intratumoral en el cáncer de mama humanos fue desarrollada por Weidner y cols.¹³³ y consiste en el uso de marcadores

inmunohistoquímicos panendoteliales para resaltar los microvasos sanguíneos. El primer paso del método es la identificación de la zona de mayor neovascularización, llamada "punto caliente " o "hot spot" mediante el escaneo de todo el tumor a bajo aumento y contar posteriormente los microvasos en un área determinada, incluyendo cualquier marcaje endotelial de células o grupos de células separadas de microvasos adyacentes, sin necesidad de que exista luz vascular. También, se han probado en cáncer de mama otras técnicas para la evaluación de la vascularización del tumor, incluyendo el método Chalkley y sistemas de análisis de imagen computarizado. La utilidad de los diferentes métodos para cuantificar la vascularización del tumor, los pros y contras de cada método, han sido ampliamente revisado por Vermeulen y cols.¹⁶⁴. Tanto el sistema de contaje Chalkley como el análisis de imágenes tienen el objetivo de reducir al mínimo la subjetividad de la evaluación en la cuantificación del recuento de microvasos, mientras que el análisis de imagen permite también realizar análisis multiparamétrico (área y perímetro vasculares, la intensidad de la tinción, etc.). En nuestro caso hemos considerado que la técnica de contaje más apropiada para nuestros objetivos era la cuantificación de microvasos sumando la objetividad del análisis de imagen al sistema tradicional de Weidner.

La determinación de la densidad vascular (DMV) es un marcador indirecto bastante grosero de la angiogénesis con algunas ventajas relacionadas con la simplicidad de la metodología, pero también con importantes debilidades, quizás la mayor de ellas sea el no proporcionar información funcional sobre las vías pro y antiangiogénicas que participan en la actividad angiogénica de cada tumor. Se han propuesto varias modificaciones del método original de Weidner para mejorar los resultados de la evaluación de DMV, como el uso de diversos marcadores

panendoteliales o de otros anticuerpos específicos para células endoteliales activadas¹⁶⁴, determinación de la expresión de molécula de adhesión endotelial, tales como la integrina $\alpha_v\beta_3$ ¹⁶⁵ o E-cadherina¹⁶⁶ y otros. Debido a que existen pocos estudios comparativos que analicen prospectivamente los diferentes métodos, no se ha identificado todavía el método de elección para evaluar vascularización del tumor. Además, antes del uso rutinario de marcadores indirectos de la angiogénesis para fines pronósticos o predictivos, es necesario su normalización con programas de control de calidad y la realización de estudios multicéntricos.

El cáncer de mama fue objeto del estudio pionero de Weidner y cols.¹³³ (1991) sobre el significado de la angiogénesis en la evolución clínica, y posteriormente ha sido uno de los tumores más estudiados en este aspecto. La mayor parte de los estudios ha encontrado relación entre un nivel elevado de vascularización y la existencia de metástasis en ganglios linfáticos y a distancia, confirmando el carácter predictor de metástasis de DMV. Asimismo, la gran mayoría de las series encuentran una relación positiva entre DMV y la evolución de los pacientes, tanto en cuanto a supervivencia libre de enfermedad como a supervivencia global. Además, si se compara con otras variables, en gran parte de los estudios se ha observado un carácter de pronóstico independiente^{167,168}. No obstante, el valor pronóstico es más evidente en pacientes con ganglios no afectados, ya que cuando se consideran los carcinomas de mama en su conjunto los resultados son más contradictorios. Un reciente meta-análisis confirma la existencia de una relación inversa entre angiogénesis, valorada mediante DMV, y supervivencia, concluyendo que el cáncer de mama es angiogénico-dependiente¹⁶⁹.

El cambio en el fenotipo angiogénico puede ser debido a la sobre-expresión de un número de factores de crecimiento endotelial, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹⁶¹. VEGF es el principal mediador de la angiogénesis normal y patológica¹⁷⁰ y es secretado por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo los neutrófilos, las plaquetas y las células tumorales^{171,172}. VEGF comprende una variedad de proteínas de 121, 145, 165, 189, y 206 aminoácidos^{65,173}, de las que, en el tejido, VEGF165 es la isoforma predominante, y VEGF121 y VEGF165 son secretadas a la circulación¹⁷⁴.

Actualmente, VEGF es el factor angiogénico más estudiado en cuanto a su significado clínico. VEGF es secretada por las células tumorales, pero también por las células del huésped (es decir, monocitos, macrófagos, células del parénquima, etc) reclutadas por el tumor pueden producir este factor de crecimiento en respuesta a estímulos del medio ambiente, principalmente la hipoxia, ciertas citoquinas y estradiol^{175,176}.

VEGF es un mitógeno específico para el endotelial vascular que promueve la proliferación y migración, pero inhibe la apoptosis¹⁷⁷. In vivo VEGF es necesario para la vasculogénesis, la angiogénesis y también regula la permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Los factores capaces de inducir la expresión de VEGF son: hipoxia, factores de crecimiento como el factor crecimiento insulínico-1, ciertas citoquinas (interleuquinas-1, 3, 6 y 10), así como p53 mutado y alteraciones del gen VHL.

Se han identificado y secuenciado cinco isoformas del VEGF: VEGF-A; VEGF-B; VEGF-C; VEGF-D y PlGF. Las isoformas solubles de la proteína VEGF se unen a dos receptores tirosina quinasa específicos: VEGF-1 (flt-1) y VEGF-R (KDR: FLK-1) que se expresan casi exclusivamente en las

células endoteliales activadas. VEGF-C es un factor de crecimiento específico para endotelio de los vasos linfáticos .

Estudios previos, han puesto de manifiesto el valor pronóstico de VEGF en pacientes con neoplasias diferentes, por ejemplo, carcinomas del tracto genital⁷⁴, próstata¹⁷⁸, colon⁷¹, la vejiga urinaria¹⁷⁹, de células renales⁷⁹ y de la glándula tiroides¹⁸⁰.

El valor pronóstico de VEGF también se ha evaluado en el cáncer de mama invasor en estudios previos retrospectivos^{99,181,182,183}.

Toi y cols.¹⁸⁴ fueron los primeros en desarrollar un método para determinar los niveles de VEGF en el tejido tumoral. Adoptaron un original inmunoensayo enzimático colorimétrico, basado en un anticuerpo policlonal anti-humano VEGF que reacciona con las isoformas solubles de la proteína VEGF, principalmente VEGF121. Posteriormente, el método fue modificado por Gasparini y cols¹⁸⁵. para detectar la proteína VEGF en el citosol de tejido congelado, con la ventaja de evaluar VEGF en las muestras con similares procedimientos a los utilizados para la determinación de receptores hormonales. Su relevancia clínica fue evaluada por primera vez por Gasparini y col. en dos estudios publicados en 1997. En el primero¹⁸¹ evaluaron la proteína VEGF en 260 pacientes consecutivos con ganglios negativos no tratados con terapia adyuvante y este factor angiogénico no se asoció a ningún indicador pronóstico convencional. Tanto en el análisis univariante como multivariante para la SLEy la SG, VEGF mantuvo un valor pronóstico independiente.

Posteriormente, se han publicado otros nueve estudios independientes sobre la importancia pronóstica de la VEGF en el cáncer de mama. En ellos se usan diferentes métodos de determinación de VEGF (inmunohistoquímica, inmunoabsorción enzimática y quimioluminiscencia) y

las características de los pacientes es heterogénea entre las distintas series analizadas, así como los tratamientos posquirúrgicos. En cualquier caso, ocho de los nueve estudios confirmaron la importancia pronóstica de VEGF¹⁸⁵.

Algunos autores¹⁸⁶ no encuentran correlación entre la sobreexpresión de VEGF con otros parámetros clínicos o patológicos como el estado de receptores hormonales, el estado de triple negativo, estado ganglionar o edad. Esta falta de correlación de VEGF con factores pronósticos convencionales del cáncer de mama ha sido puesta de manifiesto anteriormente. El valor pronóstico de VEGF suele ocurrir en poblaciones de pacientes muy heterogéneos.

En nuestro estudio hemos observado una relación inversa de la expresión de VEGF con el tamaño tumoral, que muestra una mayor expresión en tumores pequeños (menor de 2 cm.) que en tumores de mayor tamaño. En la bibliografía consultada, la expresión de VEGF o bien no se correlaciona con el tamaño o, como en nuestros casos, lo hace de forma inversa¹⁸⁷. Ello podría atribuirse a una mayor necesidad de angiogénesis cuando el crecimiento tumoral se encuentra en sus primeras fases, pero también es posible que, en la propia evolución de la neoplasia, las vías de inducción de angiogénesis se diversifiquen, seleccionándose clonas celulares que favorezcan la secreción de otros factores angiogénicos en lugar de VEGF.

La expresión de VEGF es frecuente en los carcinomas ductales de tipo común, en los que, según diversos estudios, se correlaciona con la densidad de microvasos intratumoral. Sin embargo, hemos advertido que también tipos especiales como mucinosos y papilares muestran una elevada expresión de este factor angiogénico, a pesar de no

caracterizarse por una destacada densidad de microvasos. En acuerdo con otros autores^{188,189}, nuestros resultados apoyan que la secreción de VEGF depende del tipo histológico de cáncer de mama. Los carcinomas lobulillares muestran una tinción escasa o ausente de VEGF, característica que acompaña a otras diferencias biológicas con los carcinomas de tipo ductal como falta de expresión de Cadherina-E. Esta ausencia de VEGF puede explicar en parte su patrón de crecimiento con relativa escasez de desmoplasia o estroma vascularizado. El conteo de microvasos es, en general, similar en los tipos ductal y lobulillar, lo que sugiere que, en ausencia de VEGF, otros factores angiogénicos son importantes en este tipo de carcinoma.

Existen pruebas experimentales de que la expresión de VEGF puede promocionarse a través de RE, lo que implicaría un efecto antiangiogénico del tratamiento antiestrogénico^{190,191}. Nuestro estudio demuestra una menor expresión de VEGF en tumores con positividad para receptores estrogénicos, lo que parece contrario a esta hipótesis. Sin embargo, según otros autores, el VEGF tumoral no se correlaciona, o lo hace inversamente, con el tipo α de RE, mientras que sí lo hace con el tipo β , sugiriendo un papel principal de este tipo de receptor^{192,193}.

Al relacionar el VEGF tumoral con la expresión de p53, apreciamos que aquellos casos p53 negativos o con escasa positividad presentaban con más frecuencia ausencia de tinción o tinción débil que en los casos p53 positivos aunque estas diferencias no alcanzaron niveles de significación estadística.

Estos resultados, coincidentes con el de otros estudios¹⁹², sugieren una asociación entre la pérdida de p53 (wild-type) y el aumento de la

expresión de VEGF, lo que indica que la actividad angiogénica puede depender, al menos en parte, de la alteración de la función de p53.

Nuestro hallazgo de una relación inversa entre VEGF y afectación ganglionar es cuando menos llamativa. Varios estudios apoyan el carácter pronóstico del VEGF tumoral en el carcinoma de mama, si bien principalmente en grupos de pacientes sin afectación ganglionar^{72,192,194}.

Por otro lado, la relación entre VEGF (tipo A) y ganglios positivos es controvertida. Ello puede atribuirse a que VEGF-A promueve la formación de vasos hemáticos mientras que otros tipos de VEGF (C y D principalmente) inducen la formación de vasos linfáticos, por lo que su valor pronóstico puede deberse principalmente a facilitar la invasión hemática más que linfática.

Mediadores inflamatorios como las citoquinas, eicosanoides, y factores de crecimiento se cree que juegan un papel crítico en la iniciación y mantenimiento de la supervivencia del cáncer y el crecimiento celular¹⁹⁵. Uno de estos mediadores, PGE_2 , se produce en grandes cantidades por los tumores. PGE_2 se produce a partir del ácido araquidónico por cualquiera de las dos enzimas: la COX-1 o COX-2. COX-1 es expresada constitutivamente en la mayoría de los tejidos, mientras que COX-2 se induce en las células inflamatorias y en tumores humanos por citocinas y promotores tumorales¹⁹⁶. Las isoenzimas COX pueden inhibirse por los AINEs tradicionales, como la aspirina y la indometacina. Varios estudios muestran que la ingesta regular de aspirina u otros convencionales AINEs proporciona una reducción del 40-50% en el riesgo relativo de muerte por cáncer de colon, lo que indica que la inhibición de la COX en el ser humano tiene un efecto quimiopreventivo. En conjunto, existe un notable

evidencia de la importancia de la actividad de la enzima COX-2 en la oncogénesis. Uno de los mecanismos por los que la PGE₂ estimula el crecimiento del tumor es mediante la inducción de la angiogénesis necesaria para el suministro de oxígeno y nutrientes a los tumores¹⁹⁷. La expresión de COX-2 en vasos sanguíneos neoformados dentro de tumores se ha documentado en animales, mientras que en condiciones fisiológicas normales los vasos sólo expresan la forma constitutiva de la enzima COX-1. Esta observación, junto con estudios que muestran la expresión de la enzima en células neoplásicas, sugiere un papel predominante para la COX-2 en regulación de la angiogénesis tumoral.

Se piensa que COX-2 favorece el fenotipo maligno a través de la promoción de la angiogénesis¹²³. La expresión de COX-2 en tumores se ha correlacionado con una mayor microdensidad vascular en cánceres de colon, pulmón y estómago^{198,199}.

Además, diversos estudios han relacionado la producción, en particular, de PGE₂, con un aumento de la angiogenesis en estómago^{198,199,200}.

Otros estudios indican un papel de la COX-2 en la producción de factores angiogénicos por las células neoplásicas, el aumento de la proliferación celular, la prevención de la apoptosis, el aumento de potencial metastásico, y la inhibición de la vigilancia inmunológica²⁰¹.

Se ha sugerido una relación entre COX-2 y el aumento de factores de crecimiento pro-angiogénico, en particular, de VEGF. VEGF se correlaciona con los niveles de COX-2 en el carcinoma de esófago, colon, estómago y pulmón^{198,199,202,203,204}. Nosotros hemos podido observar un incremento tanto de VEGF-A tumoral como en macrófagos asociados a la

expresión de COX-2 en la células tumorales. Sin embargo, no hemos podido demostrar una relación con la densidad de microvasos.

Existen evidencias de que la COX-2 puede estar directamente involucrada en la carcinogénesis mamaria. La inhibición selectiva de la COX-2 suprime la tumorigénesis en modelos de cáncer de mama en ratones, y la expresión de COX-2, se ha demostrado suficiente para la formación de cáncer de mama en ratones transgénicos²⁰⁵.

En los pacientes con cáncer de mama, la expresión de ARNm y proteína de COX-2 se encuentra elevada. Además, otros estudios indican que la expresión COX-2 es exclusivamente una característica de tumores malignos de mama, no observándose en el epitelio de tumores benigno²⁰⁶.

Por el contrario, la expresión de COX-1 no se aprecia elevada en las células de cáncer de mama en comparación con sus homólogos no malignos. En tumores de otros orígenes como los gastrointestinales, la expresión de COX-2 se asocia con el estadio tumoral avanzado, pobre diferenciación y reducción de la supervivencia²⁰⁷.

Ristimäki y cols.¹²⁰ obtuvieron, por primera vez, la evidencia de expresión de la proteína COX-2 en una gran serie de carcinomas de mama. Según sus datos, la expresión elevada de COX-2 fue más común en los cánceres de mama con marcadores de mal pronóstico y se correlacionó significativamente con la reducción de la supervivencia. Se encontraron niveles elevados de expresión de proteínas de COX-2 en el 37,4% de los carcinomas. Una fuerte expresión de COX-2 se observó localizada exclusivamente en las células neoplásicas, mientras que el estroma era negativo o débilmente positivo. La positividad de la COX-2 se

correlacionó con varios parámetros que caracterizan a los tipos agresivos de cáncer de mama, tales como el tamaño, presencia de metástasis en los ganglios axilares, grado histológico elevado, estado de los receptores hormonales negativos, alta tasa de proliferación, expresión de p53 elevada, y amplificación de HER-2. En este sentido, en nuestra serie hemos podido observar que los carcinomas COX-2 positivos se asociaban a un alto grado histológico, negatividad de receptores hormonales y positividad para p53, en la línea de la correlación entre expresión de COX-2 y características de agresividad advertida en otros estudios. No obstante, no hemos encontrado relación con el tamaño, afectación ganglionar ni positividad de c-erb-B2.

El mecanismo por el cual la COX-2 está suprarregulado en el cáncer de mama es desconocida, pero una posibilidad es que las células cancerosas sean intrínsecamente más activas en la expresión de COX-2, que la no neoplásicas. En este sentido, tanto la inactivación de supresores de tumores genes, como p53, como la activación de oncogenes, como HER-2, han sido implicadas en la inducción de la expresión COX-2¹¹¹. No obstante, una elevada expresión de COX-2 no se limita a los tumores p53 y HER-2 positivos, por lo que otros factores (tales como activación de ras, sobreexpresión de src, y la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico) pueden ser también responsables de expresión elevada de COX-2¹¹⁰. Es interesante advertir que el efecto antineoplásico de los inhibidores, tanto de HER-2 como del receptor de factor de crecimiento epidérmico, se ve reforzada por su combinación con inhibidores de la COX.

Los niveles elevados de expresión COX-2 se han asociado a una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama¹²⁰, lo que no ocurre en nuestro grupo de pacientes. Curiosamente, el valor pronóstico de la

expresión de COX-2 tiende a ser más marcada en ciertos subgrupos de pacientes, por ejemplo, en los cánceres con positividad para RE, sin sobreexpresión de p53, y sin amplificación del oncogén HER-2. Ello puede indicar que el efecto procarcinógeno de la COX-2 no se distribuye uniformemente en el cáncer de mama. Sin embargo, la expresión COX-2 se asocia con una supervivencia significativamente menor tanto en cáncer con ganglios negativos como positivos lo que puede ser un reflejo de la capacidad de COX-2 para inducir la metástasis, por ejemplo, mediante la inducción de la producción y la activación de metaloproteinasas de matriz¹¹¹. El hecho de que la expresión elevada de la COX-2 se asocia con la menor supervivencia en tumores RE-positivos es de especial interés. Ya que los derivados prostanoideos de COX-2 han sido implicados en la inducción de la expresión de aromatasa de las células del estroma, es posible que la elevación de la expresión COX-2 en los cánceres RE-positivos facilite la formación de un microambiente que promueva el crecimiento de las células tumorales induciendo la producción de estrógenos a través de la vía de la aromatasa en las células del estroma.

En muchos cánceres humanos, la abundancia de macrófagos en el microambiente tumoral se correlaciona con mal pronóstico. La evidencia experimental de la relación causal entre los macrófagos y el pronóstico procede de modelos de ratón de cáncer de mama en los que la ablación genética de los macrófagos dio lugar a la disminución de la progresión tumoral y las metástasis.

Los macrófagos son reclutados al frente invasivo mediante factores quimiotácticos derivados del tumor. Los macrófagos mejoran la migración de células tumorales y la invasión a través de la secreción de factores quimiotácticos y quimiocinas como el factor de crecimiento epidérmico

(EGF). También promueven la angiogénesis mediante la síntesis de factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y la remodelación de la matriz extracelular y, en particular, la regulación de la fibrinogénesis de colágeno.

Experimentalmente, se ha demostrado que la ablación genética de los macrófagos en ratones del modelo PYMT de cáncer de mama, se traduce en una menor tasa de progresión del tumor y una inhibición considerable de la metástasis, y que este proceso implica, en parte, la síntesis de los macrófagos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹²⁴.

Los estudios clínicos han tratado de identificar las correlaciones entre la densidad de macrófagos y el pronóstico. Una revisión reciente de Bingle y cols.¹²⁵, usando un meta-análisis, mostró que en más del 80% de los casos, un aumento de la densidad de macrófagos se asocia con mal pronóstico, y el 20% restante se dividió entre los que no tienen efecto y los que tienen buen pronóstico.

La participación de los macrófagos en el proceso angiogénico ha sido analizada en diversos estudios.

En los cánceres de mama, distintos autores han demostrado una correlación de los macrófagos asociados a tumores de mal pronóstico, sobre todo si se asocia con la densidad microvascular²⁰⁸. Sin embargo, otros estudios clínicos sugieren que la acción negativa de los macrófagos no es tan clara, ya que hay casos en que los macrófagos se asocian con buen pronóstico¹²⁵.

Leek y cols.²⁰⁹, cuantificaron macrófagos usando la retícula de Chalkley en una serie de carcinomas de mama invasivos para investigar la relación entre la infiltración de macrófagos asociada al tumor, la angiogénesis y el

pronóstico. Encontraron una correlación positiva significativa entre el aumento de los macrófagos y una elevada densidad vascular, así como con una disminución de la supervivencia libre de recidiva y de la supervivencia general independiente. Sin embargo, en la comparación con otras variables pronósticas del tumor, incluyendo la edad, tamaño, estado ganglionar, grado, RE, y EGFR, no se observó correlación.

Para estos autores, la infiltración de macrófagos puede ser un importante factor pronóstico en el carcinoma invasor de la mama, incluso más potente que el estado ganglionar, sugiriendo que los macrófagos pueden jugar un papel directo en la progresión de la enfermedad.

Hemos advertido, en nuestro estudio, correlación entre el índice macrofágico y el tamaño y el grado histológico. En este sentido, coincidimos con Lee y cols.²¹⁰, en cuya serie una infiltración difusa de macrófagos, se asocia con tumores de grado alto, necrosis tumoral, tamaño tumoral, y expresión de c-erbB-2. Sin embargo, también se encontró una débil correlación entre la intensidad de la inflamación y la vascularización, aunque principalmente debida a las células T y no a los macrófagos. Estos autores no consideran que exista una relación muy relevante entre inflamación, o infiltración macrofágica, y angiogénesis, lo que también apoya nuestros resultados.

La ausencia de una clara asociación entre la intensidad de la inflamación y vascularización no excluye un posible papel de la inflamación en la angiogénesis. Por ejemplo, el marcador utilizado, CD68, es un panmarcador de macrófagos, que no distingue su localización ni su posible diferente función²¹¹. Por lo tanto, no distingue macrófagos en reposo, presentadores de antígeno, en fagocitosis, o con actividad angiogénica. Existen evidencias de que los macrófagos necesitan ser activados antes

de que puedan inducir la angiogénesis²¹² y por lo tanto sólo una parte de los macrófagos tendrían un fenotipo angiogénico.

Otros estudios han encontrado asociaciones entre los niveles altos de la infiltración de macrófagos y marcadores de mal pronóstico como el Ki-67²¹³, o han descrito una correlación positiva entre la infiltración de macrófagos y c-erbB2, y alto grado²¹⁴.

Uno de los problemas que existe para considerar la cuantificación de macrófagos eficaz como valor pronóstico es la variabilidad de su localización y densidad dentro de un tumor.

Aunque en algunos casos, sobre todo en cánceres de mama, puede representar más del 50% de la masa tumoral, en general, representan una pequeña parte del tumor y se encuentran en espacios específicos²¹⁵. Se han demostrado al menos tres poblaciones separadas. La mayoría de los macrófagos se encuentran en el estroma que rodea el tumor, principalmente en el frente invasivo y también en las zonas avasculares¹²⁴. Otra población está asociada con áreas de necrosis en tumores avanzados, donde tienden a acumularse alrededor de los bordes de las células que mueren. Una tercera población está alineada a lo largo de los vasos²¹⁵. Para Lee y cols. la distribución de los macrófagos es generalmente difusa en todo el tumor, y es difícil encontrar los hot spots. Esta uniformidad de la distribución de los macrófagos en la mayoría de los tumores de su estudio, y en el de Kelly y cols.^{210,216}, sugiere que la densidad media de macrófagos (en lugar del conteo en hot spots) es una medida más razonable de la intensidad de infiltración de los macrófagos.

También es necesario tener en cuenta que la cuantificación de macrófagos en un tumor extirpado representa una "foto fija" de ese

momento en la evolución de la neoplasia. En el estudio de Leek y cols²⁰⁹, una minoría de los tumores con baja angiogénesis se consideró que tenían un elevado recuento de los macrófagos y viceversa. Esto demuestra que los macrófagos no son una influencia necesaria en todos los tumores muy vasculares. Los tumores con alta densidad de macrófagos y baja angiogénesis pueden corresponder con los que aún no han desarrollado aumento de vascularización. Cuando existe una baja proporción de macrófagos y baja densidad vascular, posiblemente se trate de una etapa temprana en la inducción de angiogénesis, en tumores que posiblemente estén altamente vascularizados en una etapa posterior, cuando exista una densidad mayor de macrófagos.

Por otro lado, la densidad de macrófagos en un tumor depende también de su agregación o dispersión. Los factores que inducen a la formación de agregados de macrófagos o "puntos calientes" no están claras, pero puede incluir necrosis e hipoxia. La angiogénesis ocurre en los puntos calientes¹³⁶, lo que resulta biológicamente importante porque proporcionan una ruta a través del cual las células tumorales pueden hacer metástasis. Las células del tumor en las regiones no vasculares experimentan estrés hipóxico y/o pueden sucumbir a la muerte celular. A continuación, los macrófagos pueden migrar a estas áreas, quimiotácticamente siguiendo un gradiente de sustancias liberadas por las células con estrés, como VEGF, producidas por las propias células tumorales hipóxicas. Una vez en estas zonas de hipoxia, pueden llegar a ser angiogénicamente activos, y se ha demostrado experimentalmente que la hipoxia puede inducir la liberación de bFGF por los monocitos *in vitro*²¹⁷.

El frente invasivo de los tumores es también proclive a la angiogénesis. Es sabido que los tumores de crecimiento por encima de un cierto tamaño requieren el establecimiento de un sistema vascular para proporcionar la nutrición y la eliminación de desechos tóxicos. De hecho, existen muchas evidencias de que hay un aumento dramático en la densidad de los vasos durante la transición benigno a maligno.

Estudios experimentales en los que se produce un agotamiento de los macrófagos, se observa una reducción de aproximadamente un 40% en la densidad de vasos, incluso en los carcinomas avanzados. Este efecto sugiere que los macrófagos no sólo están involucrados en el inicio de la formación de los vasos en las zonas malignas del tumor, sino también en la remodelación de los vasos una vez formado¹²⁴.

Todos estos estudios refuerzan la idea de que los miembros del linaje de los monocitos y macrófagos juegan un papel importante en la angiogénesis tumoral. Los macrófagos producen VEGF-A en los cánceres de mama humanos, así como en varios modelos de ratones transgénicos de cáncer²¹⁷.

Así, una función de los macrófagos en los tumores es secretar VEGF-A, ya sea directamente o través de la MMP9 que libera VEGF a la matriz extracelular, además de otros factores angiogénicos temporal y espacialmente que promueven la angiogénesis. Además, la localización de los macrófagos en el frente invasivo marcado por la angiogénesis sugiere que estas funciones de los macrófagos contribuirían a promover la difusión de las células tumorales a través de la formación de vasos más que ser el objetivo de intravasación de células tumorales²¹⁸.

VI.CONCLUSIONES

- 1ª) El incremento de la densidad de microvasos en el carcinoma de mama no es atribuible, al menos exclusivamente, a la secreción de VEGF-A por las células tumorales o por los macrófagos, o a la expresión de COX-2.
- 2ª) La expresión de VEGF-A, tanto en células tumorales como macrófagos, está relacionada con la secreción de COX-2 por las células tumorales.
- 3ª) La expresión de VEGF-A en células tumorales de carcinoma de mama, o en macrófagos asociados al tumor, o de COX-2, se encuentra escasamente relacionada con factores pronósticos adversos como la presencia de afectación ganglionar, el tamaño o el grado histopatológico.
- 4ª) El tipo histológico de carcinoma de mama determina la expresión de algunos factores angiogénicos. Particularmente, los carcinomas de tipo lobulillar muestran escasa secreción de VEGF-A y, por el contrario, mayor expresión de COX-2, comparados con los carcinomas de tipo ductal común.
- 5ª) Los hallazgos de nuestro estudio apoyan la existencia de una regulación hormonal de la secreción de factores angiogénicos en sentido negativo, basándonos en una menor expresión de VEGF-A en células tumorales o macrófagos, o de COX-2, en carcinomas de mama con receptores hormonales positivos.

- 6ª) La alteración molecular de p53, determinada por su expresión inmunohistoquímica, está presente principalmente en carcinomas con mayor expresión de VEGF-A en células tumorales y macrófagos, así como de COX-2, aunque se desconoce el mecanismo patogénico que pudiera subyacer en dicha asociación.
- 7ª) La densidad de macrófagos asociados al tumor es dependiente de la secreción tanto de VEGF-A, tumoral o macrofágica, como de COX-2, y está incrementada en aquellos carcinomas con parámetros histopatológicos y estado de marcadores inmunohistoquímicos asociados a mayor agresividad, aunque no se ha demostrado una relación con la afectación ganglionar.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Boneberg EM, Legler DF, Hofer MM, Ohlschlegel C, Steininger H, Füzési L, Beer GM, Dupont-Lampert V, Otto F, Senn HJ, Fürstenberger G. Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2009;101:605-614.
- 2.- Vicioso L, Gonzalez FJ, Alvarez M, Ribelles N, Molina M, Marquez A, Perez L, Matilla A, Alba E. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor are associated with tumor-associated macrophages in primary breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:111-118.
- 3.- Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*. 2006;7:41-45.
- 4.- Ana Rodriguez Quesada, Miguel Angel Medina Torres, Ramón Muñoz- Chápuli Oriol. El proceso angiogénico: En *Angiogenesis*: 41-83.
- 5.- Brazil DP, Park J, Henmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*. 2002;111:293-303
- 6.- Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*. 1999; 274:10002-10007.
- 7.- Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. Roles of the two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*. 2000;19:2138-2146.
- 8.- Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Ozes ON, Warren RS, Donner DB. VARP is an adaptator protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem*. 2000;275:6059-6062.
- 9.- Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*. 1997;110:2293-22302.
- 10.- Fang J, Shing Y, Wiederschain D, Yan L, Butterfield C, Jackson G, Harper J, Tamvakopoulos G, Moses MA. Matriz metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3884-3889.
- 11.- Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 1996;85:683-693.
- 12.- Bazzoni G, Dejana E, Lampugnani MG. Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:573-581.
- 13.- Drake CJ, Cheresh DA, Little CD. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci*. 1995;108:2655-2661.
- 14.- Form DM, Pratt BM, Madri JA. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest*. 1986;55:521-530.

- 15.- Hirschi KK, Rohovsky Sa, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol.*1998;141:805-814.
- 16.- Lafleur MA, Forsyth PA, Atkinson SJ, Murphy G, Edwards DR. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282:463-473.
- 17.- Hellström M, Kaln M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999;126:3047-3055.
- 18.- Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Dupla C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res.* 1999;58:128-136.
- 19.- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1998;282:468-471.
- 20.- Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak H. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor Biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993;12:303-324.
- 21.- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer* 1996;32A:2413-2422.
- 22.- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Res Commun* 1989;161:851-859.
- 23.- Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
- 24.- Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer.* 2010 31;9:320.
- 25.- Gallego E, Vicioso L, Alvarez M, Hierro I, Pérez-Villa L, Blanes A, Matilla A. Stromal expression of vascular endothelial growth factor C is relevant to predict sentinel lymph node status in melanomas. *Virchows Arch.* 2011;458:621-630.
- 26.- Suri C, Jones PF, Patan S et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-1180.
- 27.- Thurston G, Suri C, Smith K et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999;286:2511-2514.
- 28.- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos N. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-5362.
- 29.- Shing Y, Folkman, 1984 Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 1984;223:1296-1299.

- 30.- Coulier F, Pontarotti P, Roubin R, Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D. Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J Mol Evol.* 1997;44:43-56.
- 31.- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* 1999;98:641-650.
- 32.- Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *Cell Biol.* 1994;127:1783-1787.
- 33.- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* 1991;251:802-804.
- 34.- Galimi F, Brizzi MF, Comoglio PM. The hepatocyte growth factor and its receptor. *Stem Cells.* 1993; 11 Suppl 2:22-30. Review.
- 35.- Van Cruijssen H, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer.* 2005;117:883-888.
- 36.- Wiseman DM, Polverini PJ, Kamp DW, Leibovich SJ. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;157:793-800.
- 37.- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell.* 1996;87:1153-1155.
- 38.- Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Susuki H, et al. Involvement of interleukin-8; vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4015-4023.
- 39.- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258:1798-1801.
- 40.- Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol.* 1990;111:765-772.
- 41.- Hanford HA, Wong CA, Kassan H, Cundiff DL, Chandel N, Underwood S, Mitchell CA, Soff GA. Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 2003;63:4275-4280.
- 42.- Folkman J. The intestine as an organ culture. En: Burdette WJ, ed. *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium.* Springfield IL, Charles C Thomas 1970;113-127.
- 43.- Rao M et al. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2004;19:1-11.
- 44.- Gimbrone MA, Gullino PM. Neovascularization induced by intraocular xenografts of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1976;56:305-318.
- 45.- Li Z, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Kawabe A, Mori A, Itami A, Kano M, Watanabe G, Imamura M. TGF-beta as well as VEGF, PD-ECGF and bFGF contribute

- to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2000;17:453-460.
- 46.- Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitor in tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90:1609-1620 (Review).
- 47.- Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis *Annu Rev Med* 1998;49: 407-427.
- 48.- Folkman J. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.* *N Engl J Med.* 1995;333:1757-1763. Review.
- 49.- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995; 2:149-153.
- 50.- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 18:1182-1186. Review.
- 51.- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours? What is it not for? *J Pathol.* 2003;201:173-180.
- 52.- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989; 49:6449-6465.
- 53.- Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156:361-381.
- 54.- Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:1326-1329.
- 55.- Bausero P, Cavall, F, M, duri G, Freitas S, Perrot-Appanat M. Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis.* 1998;2:167-182.
- 56.- Joseph IB, Nelson JB, Denmeade SR, Isaacs JT. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res.* 1997;12:2507-11.
- 57.- Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. COX-2, NOS and p53 as play markers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med.* 1998;2:715-719.
- 58.- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
- 59.- Aiello LP, Avery R, Arrigg R, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994;331:1480-1487.
- 60.- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, Mignatti P, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:9709-9716.

- 61.- Dvorak HF. Tumours: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N Eng J Med* 1986;315:1650-1658.
- 62.- Roberts WG, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
- 63.- Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of VEGF on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:838-844.
- 64.- Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-11954.
- 65.- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
- 66.- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037.
- 67.- Park JE, Keller G-A, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms. Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326.
- 68.- Keyt B, Berleau L, Nguyen H, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl terminal domain (111-165) of VEGF is critical for mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271:7788-7795.
- 69.- Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P, Flaumenhaft R, Mignatti P. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Devel* 1990;32:313-318.
- 70.- Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol*. 2001;19:577-583.
- 71.- Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer*. 1999;81:845-850.
- 72.- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*. 1995;26:86-91.
- 73.- Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms *J Clin Invest*. 1993;91:153-159.
- 74.- Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:506-516.

- 75.- Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. J Natl Cancer Inst. 1995 Aug 16;87(16):1237-45. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst. 1995;87:1237-1245.
- 76.- O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP, Gatter K, Harris AL. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer.Br J Cancer. 2000;82:1427-1432.
- 77.- Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 1996;56:3004-3009.
- 78.- Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg. 1997;174:513-517.
- 79.- Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Ljungberg B. Different isoform patterns for vascular endothelial growth factor between clear cell and papillary renal cell carcinoma. BJU Int. 2006;97:1102-1108.
- 80.- Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T, Terada M. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. Cancer Res. 1994;54:4233-4237.
- 81.- Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. Am J Hematol. 2002;69:247-254.
- 82.- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer Res. 1995;55:3964-3968.
- 83.- Amaya H, Tanigawa N, Lu C, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. Cancer Lett. 1997;119:227-235.
- 84.- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O'Byrne K, Scott PA, Pezzella F, Georgoulas V, Harris AL, Gatter KC. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 1998;4:3017-3024.
- 85.- Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, Asimakopoulos B, Polychronidis A, Anagnostoulis S, Simopoulos C. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. Cancer Lett. 2003;194:119-124.
- 86.- Minagawa N, Nakayama Y, Hirata K, Onitsuka K, Inoue Y, Nagata N, Itoh H. Correlation of plasma level and immunohistochemical expression of vascular

endothelial growth factor in patients with advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002;22:2957-2963.

- 87.- Kondo S, Asano M, Suzuki H. Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194:1234-1241.
- 88.- Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA, Curiel DT. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:8795-8800.
- 89.- Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Shuman M. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol.* 1999;161:960-963.
- 90.- Borgström P, Gold DP, Hillan KJ, Ferrara N. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res.* 1999;19:4203-4214.
- 91.- Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14765-14770.
- 92.- Pham CD, Roberts TP, van Bruggen N, Melnyk O, Mann J, Ferrara N, Cohen RL, Brasch RC. Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cancer Invest.* 1998;16:225-230.
- 93.- Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo *Cancer Res.* 2001;61:6020-6024.
- 94.- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-4613.
- 95.- Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):13333-13340.
- 96.- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002;20:4368-4380. Review.
- 97.- Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol.* 2003;170:588-592.
- 98.- Neufeld G, Kessler O, Vadasz Z, Gluzman-Poltorak Z. The contribution of proangiogenic factors to the progression of malignant disease: role of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001;10:339-356, ix. Review.

- 99.- Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:2256-2260.
- 100.- Vikhanskaya F, Bani MR, Borsotti P, Ghilardi C, Ceruti R, Ghisleni G, Marabese M, Giavazzi R, Broggin M, Taraboletti G. p73 Overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2001;20:7293-7300.
- 101.- Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marm, D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1995;270:25915-25919.
- 102.- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000;60:1388-1393. Erratum in: *Cancer Res* 2000, 1;60:3668.
- 103.- Viens P, Jacquemier J, Bardou VJ, Bertucci F, Penault-Llorca F, Puig B, Gravis G, Oziel-Ta<eb S, Resbeut M, Houvenaeghel G, Camerlo J, Birbaum D, Hassoun J, Maraninchi D. Association of angiogenesis and poor prognosis in node-positive patients receiving anthracycline-based adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;54:205-212.
- 104.- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29:15-18. Review.
- 105.-Beecken WD, Fernandez A, Jousseaume AM, Achilles EG, Flynn E, Lo KM, Gillies SD, Javaherian K, Folkman J, Shing Y. Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:382-387.
- 106.- Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Travelin B, Bergh J, Grankvist K, Henriksson R. The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and associations to first metastasis site in 1307 patients with primary breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2003;4:340-347.
- 107.- Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastasis breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 1721-1726.
- 108.- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;91:125-132.
- 109.- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:429-434.
- 110.- Tsuji S, Tsujii M, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 upregulation as a perigenetic change in carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001;20:117-129. Review.

- 111.- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8:97-114. Review.
- 112.- Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, LaVail MM. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and Basic fibroblast growth factor mRNA expression in culture rats Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:581-591.
- 113.- Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000;19:19-27.
- 114.- Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathways correlatos with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
- 115.- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H.. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-138.
- 116.- Denkert C, Winzer KJ, M Iler BM, Weichert W, Pest S, K"bel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97:2978-2987.
- 117.- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer and adyacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002;62:1676-1681.
- 118.- Soslow RA, Dannenberg AJ, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mamary tumor. *Cancer* 2000;89:2637-2645.
- 119.- Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol*. 2003;16:1199-1204.
- 120.- Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62:632-635.
- 121.- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997;91:197-208.
- 122.- Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross, MS; Clausen, KP; Robertson, FM. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 1997;10: 503-507.
- 123.- Wang D, Dubois RN. Cyclooxygenase-2: A potencial target in breast cancer. *Sem Oncol* 2004;31:64-73. Review.
- 124.- Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., Pollard, J. W. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2006;.66:11238-11246.

- 125.- Bingle, L., Brown, N. J., Lewis, C. E. (2002) The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 2002;196:254-265.
- 126.- Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJ, Greaves MF, Denekamp J, Ruiter DJ. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest.* 1990;62:690-696.
- 127.- Wang JM., Kumar S, Pye D, Van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer.*1993;54:363-370.
- 128.- Vermeulen PB, Verhoeven D, Fierens H, Hubens G, Goovaerts G, Van Marck E, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Br J Cancer.*1995;71:340-343.
- 129.- Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76:1046-1054.
- 130.- Ahlgren J, Risberg B, Villman K, Berg J. Angiogenesis en carcinoma invasivo de mama: un estudio prospectivo de heterogenicidad tumoral. *Eur J Cancer (ed esp)* 2002;2:169-174.
- 131.- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999;59:856-861.
- 132.- Behrme S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD 31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J.* 2005;46:417-422.
- 133.- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 1991;324:1-8.
- 134.- Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:1875-1887.
- 135.- Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:614-619.
- 136.- Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol.* 1995;177:275-283.
- 137.- Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol.* 1994;74:762-766.
- 138.- Gasparini G, Fox SB, Verderio P, Bonoldi E, Bevilacqua P, Boracchi P, Dante S, Marubini E, Harris AL. Determination of angiogenesis adds information to estrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1191-1198.

- 139.- Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Andrac L, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C. CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinoma: correlation with patient follow-up. *Am J Clin Pathol* 1997;107: 534-541.
- 140.- Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM. Endothelial area as a prognostic indicator for the invasive breast carcinoma. *Cancer*. 1996;77:2077-2085.
- 141.- Charpin C, Devictor B, Bergeret D, Andrac L, Boulat J, Horschowski N, Lavaut MN, Piana L. CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 1995;103:443-448.
- 142.- Beliën JA, Somi S, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol*. 1999;52:184-192.
- 143.- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998;125:1591-1598.
- 144.- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*. 1999;103:159-165.
- 145.- Jitsuiki Y, Hasebe T, Tsuda H, Imoto S, Tsubono Y, Sasaki S, Mukai K. Optimizing microvessel counts according to tumor zone in invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol*. 1999;12:492-498.
- 146.- Colpaert C, Vermeulen P, Van Marck E, Dirix L. Am The presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early metastasis in lymph node-negative breast cancer patients. *J Surg Pathol*. 2001;25:1557-1558.
- 147.- Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151:1417-1423.
- 148.- Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol*. 2001;195:336-342.
- 149.- Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouyss.gur J, Berra E. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer*. 2007;120:1451-1458.
- 150.- Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Dell' Agnola C, Gobbi A, Martinelli G, Bertolini F. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res*. 2001;61:4341-4344.
- 151.- Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E, Morabito A, Fanelli M, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T, Dirix LY, Gion M. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am*. 1999;5:101-111.

- 152.- Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1998;16:3129-3136.
- 153.- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer.* 1999;81:727-732.
- 154.- Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19:1207-1225. Review.
- 155.- Takeda A, Shimada H, Imaseki H, Okazumi S, Natsume T, Suzuki T, Ochiai T. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in colorectal cancer patients: correlation with clinicopathological factors and tumor markers. *Oncol Rep.* 2000;7:333-338.
- 156.- Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of tumors: Tumors of the breast and female genital organs. IARC Press. 2003:18-19.
- 157.- Wittekind C, Greene FL, Hutter RVP, Klimpfinger M, Sobin LH. En *TNM Atlas*, 5ed: 209-223.
- 158.- Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, Colburn WJ, Barth A, Gierson ED, Lewinsky B, Gamagami P, Slamon DJ. Prognostic classification of breast ductal carcinoma in situ. *Lancet.* 1995;345:1154-1157
- 159.- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359.
- 160.- Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2651-2656.
- 161.- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995;1:27-31.
- 162.- Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996;32A:2451-2460.
- 163.- Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer.* 2002;87:772-778.
- 164.- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB y cols. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996;14:2474-2484.
- 165.- Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Vascular integrin avb3: A new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2625-2634.
- 166.- Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 2000;60:298-304.

- 167.- Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol.* 1995;13:765-782.
- 168.- Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;37:97-114.
- 169.- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004;64:2941-2955.
- 170.- Ferrara N, Davis-Smyth TD. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4 -25.
- 171.- Senger DR, Water L van de, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1993;12:303-324.
- 172.- Taichman NS, Young S, Cruchley AT, Taylor P, Paleolog E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol.* 1997;62:397-400.
- 173.- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60:202-212.
- 174.- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch P, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.
- 175.- Ferrara N, Alitalo K. Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999;5:1359-1356.
- 176.- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor:vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.
- 177.- Shalaby F, Ho J, Stanford, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981-990.
- 178.- Bok RA, Halabi S, Fei DT, Rodriguez CR, Hayes DF, Vogelzang NJ, Kantoff P, Shuman MA, Small EJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001;61:2533-2536.
- 179.- Sato K, Sasaki R, Ogura Y, Shimoda N, Togashi H, Terada K, Sugiyama T, Kakinuma H, Ogawa O, Kato T. Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J Exp Med.* 1998;185:173-184.
- 180.- Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, Tuman C, Fenton C, Blair E, Francis GL, Tuttle RM. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery.* 2000;129:552-558.
- 181.- Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:139-147.

- 182.- Gasparini G, Toi M, Biganzoli E, Dittadi R, Fanelli M, Morabito A, Boracchi P, Gion M. Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: Correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin D, hormone receptors and prognosis. *Oncology*. 2001;60:72-80.
- 183.- Coradini D, Boracchi P, Daidone MG, Pellizzaro C, Miodini P, Ammatuna M, Tomasic G, Biganzoli E. Contribution of vascular endothelial growth factor to the Nottingham prognostic index in node-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2001;85:795-797.
- 184.- Toi M, Gion M, Biganzoli E, et al. Co-determination of the angiogenic factors thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in node-negative breast cancer: prognostic implications. *Angiogenesis* 1997;1:71-83.
- 185.- Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer *Critical Reviews in Oncology:Hematology*, 2001. 37:97-114.
- 186.- Moran MS, Yang Q, Goyal S, Harris L, Chung G, Haffty BG. Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor as a Prognostic Marker for Local Relapse in Early-Stage Breast Cancer Patients Treated with Breast-Conserving Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Nov 17.
- 187.- Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000;60:2898-2905.
- 188.- Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulson, Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol*. 1998;185:394-401.
- 189.- Coradini D, Pelizaro C, Veneroni S, Ventura L, Daidone MG. Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Br J Cancer* 2002;87:1105-1111.
- 190.- Kawai H, Li H, Chun P, Avraham S, Avraham HK. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:7730-7739.
- 191.- Bogin L, Degani H. Hormonal regulation of VEGF in orthotopic MCF7 human breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62:1948-1951.
- 192.- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3121-3128.
- 193.- Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Appianat M. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 2002;62:4977-4984.
- 194.- Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:37-44.

- 195.- Seed, M. P. Angiogenesis inhibition as a drug target for disease: an update. In *Exp.Opin. Invest. Drugs* 1996;5:1617-1637.
- 196.- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:69-102.
- 197.- Form, D. M., and Auerbach, R. PGE2 and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1983;172:214-218.
- 198.- Kim HS, Youm HR, Lee JS, Min KW, Chung JH, Park CS. Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2003;42:163-170.
- 199.- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest.* 2000;105:1589-1594.
- 200.- Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, Richmond A, Strieter R, Dey SK, DuBois RN. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med.* 2006;203:941-951.
- 201.- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000;60:1306-1311.
- 202.- Von Rahden BH, Stein HJ, Pühringer F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M. Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2005;65:5038-5044.
- 203.- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2001;121:1339-1347.
- 204.- Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci.* 2005;12:229-241.
- 205.- Liu, C. H., Chang, S. H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M. T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. F., and Hla, T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2001;267:18563-18569.
- 206.- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., and Levine, E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90:455-460.
- 207.- Van Rees, B. P., and Ristimäki, A. Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001;36:897-903.
- 208.- Leek, R. D., Harris, A. L. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2002;7:177-189.
- 209.- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:4625-4629.

- 210.- Lee AHS, Happerfield LC, Bobrow LG, Millis RR. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 1997;50:669-673.
- 211.- O'Laughlin S, Braverman M, Smith-Jefferies M, Buckley P. Macrophages (histiocytes) in various reactive and inflammatory conditions express different antigenic phenotypes. *Hum Pathol* 1992;23:1410-1418.
- 212.- Gottlinger HG, Rieber P, Gokel JM, Lohe KJ, Riethmuller G. Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4+ monocytic cells in the tumor stroma. *IntJ Cancer* 1985;35:199-205.
- 213.-Hildenbrand, R., Dilger, I., Horlin, A., and Stutte H. J. Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br. J. Cancer* 1995;72:818-823,
- 214.- Pupa, S. M., Bufalino, R., Invernizzi, A. M., Andreola, S., Rilke, F., Lomardi, L., Colnaghi, M. I., and Menard, S. Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2-overexpressing breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 1996;14:85-94.
- 215.- Lewis, C. E., Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66:605-612.
- 216.- Kelly PMA, Davison RS, Bliss E, McGee JO. Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *BrJ Cancer* 1988;57:174-177.
- 217.- Leek, R. D., Hunt, N. C., Landers, R. J., Lewis, C. E., Royds, J. A., Harris, A. L. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* 2000;190:430-436.
- 218.- Pollard J. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of Leukocyte Biology.* 2008;84:623-630.

VIII. ANEXO

Elevated Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor Are Associated With Tumor-Associated Macrophages in Primary Breast Cancer

Luis Vicioso, MD, PhD,^{1,2} Francisco J. Gonzalez, PhD,³ Martina Alvarez, PhD,² Nuria Ribelles, MD, PhD,³ Manuel Molina, MD,⁴ Antonia Marquez, MD, PhD,³ Lidia Perez, MD,¹ Alfredo Matilla, MD, PhD,^{1,2} and Emilio Alba, MD, PhD,³

Key Words: Angiogenesis; Breast cancer; Circulating angiogenic factors; p53; Tumor-associated macrophages; Vascular endothelial growth factor

DOI: 10.1309/0664AF2U3LGPCF3J

Abstract

We analyzed serum and tumor samples from 133 patients with operable primary breast cancer to determine the possible relationship between presurgery and postsurgery circulating serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and tumor-associated macrophage (TAM) numbers, tumor VEGF expression, and other immunohistochemical parameters. A significant positive correlation was observed between the number of TAM and postsurgery circulating VEGF values ($P < .05$). Moreover, patients with a p53+ tumor had higher postsurgery serum VEGF levels than those with a p53- tumor ($P < .05$), and tumor p53 overexpression correlated significantly with TAM number ($P = .007$). We observed no significant association between serum values and tumor VEGF expression. Although the macrophage index was higher in VEGF+ than in VEGF- tumors, the differences were not statistically significant. Our data show a positive interrelation between high circulating VEGF levels, the number of TAM, and p53 overexpression, a relationship that might have an important role in the enhanced angiogenesis processes in breast cancer.

Angiogenesis, the development of new blood vessels from existing vasculature, is essential for tumor growth and metastasis. Angiogenesis is regulated by multiple molecules that are released from tumor cells and stromal cells, including fibroblasts, endothelial cells, and locally infiltrating leukocytes. Tumor neovascularization increases the probability that tumor cells will enter the circulation and allow metastatic processes and tumor progression.¹ Angiogenesis has been implicated as a prognostic factor in various solid tumors such as gastric cancer, non-small cell lung cancer, colorectal cancer, and prostate cancer.^{2,3} An increase in tumor angiogenesis measured by microvascular vessel density has been associated with a poor prognosis in breast cancer.²

In recent years, several stimulatory and inhibitory angiogenic growth factors have been identified as potential regulators of angiogenesis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated as the main angiogenic molecule in the regulation of neovascularization processes in solid tumors. The 121 and 165 isoforms are soluble and usually are the predominant forms. VEGF was shown to induce the proliferation and migration of endothelial cells and to increase vascular permeability.⁴ Although tumor cells are the main source of VEGF, other cells in the tumoral microenvironment such as migratory monocytes/macrophages can release this proangiogenic factor in hypoxic areas of the tumor.⁵ Overexpression of VEGF in tumor tissue has been observed in various solid tumors and is associated with a poor prognosis in patients with cancer,² including those with breast cancer.^{6,7} Furthermore, an increase in circulating VEGF levels has been observed in patients with breast cancer,^{8,9} although its prognostic value has not been established.¹⁰⁻¹²

In the tumor microenvironment, macrophages derived from circulating monocytes represent a major component of infiltrating leukocytes. An increase in tumor-associated macrophages (TAMs) has been observed in poorly vascularized areas of breast carcinoma. These cells migrate preferentially to hypoxic areas, where VEGF expression is elevated.^{5,13} Besides their connection with inflammatory activity, TAMs have been associated with increased angiogenesis through the release of proangiogenic growth factors such as VEGF, basic fibroblast growth factor, interleukin-8, and platelet-derived growth factor.¹⁴ An increase in TAM density correlates with a poor prognosis in breast cancer.¹⁵ Moreover, Lewis et al⁵ observed an increase in VEGF expression by TAM in poorly vascularized areas, suggesting a role in the regulation of macrophage VEGF production and release of hypoxic stimuli such as hypoxia-inducible factor-2 α .¹⁶ Although an association between TAMs and tumoral expression of VEGF has been shown in patients with breast cancer, to our knowledge, the possible relationship between the number of TAMs and circulating VEGF levels has not been determined.

The present study addressed the hypothesis that circulating VEGF levels may be related to tumor-infiltrating macrophages. To evaluate the relative contributions of tumor and TAM cells to circulating VEGF levels in patients with operable primary breast cancer, we looked for correlations between serum VEGF levels before and after surgery for tumor resection and clinicopathologic variables of breast tumors, including expression of VEGF and p53 and the number of TAMs.

Materials and Methods

Patients

We studied 133 women recruited consecutively among patients who had undergone surgery for breast cancer at the Virgen de la Victoria University Hospital, Málaga (southern Spain) between October 1998 and February 2002. Mean age was 58 years (range, 24-87 years). There were 40 premenopausal women and 93 postmenopausal women. Inclusion criteria were histologic diagnosis of breast cancer and no treatment (chemotherapy or radiation therapy) or blood transfusions before surgery. Primary treatment of these patients was mastectomy or conservative surgery with resection of wide margins free of tumor. The study was approved by the Ethics Committee of our hospital, and informed consent was obtained from all patients before entry into the study.

All surgical specimens were cut fresh and fixed in formalin for 24 hours before embedding in paraffin wax. From the pathologic analyses, we recorded tumor size, histologic grade (Bloom and Richardson, modified by Elston), and number of lymph nodes involved.

Immunohistochemical Staining

Consecutive sections of paraffin-embedded breast cancer tissue were cut, mounted on xylan-coated slides, deparaffinized in xylene, and rehydrated in a graded series of alcohols. Heat-induced epitope retrieval was done with the pressure cooker method in 0.1 mol/L sodium citrate buffer (pH 6). Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxide, and an avidin-biotin immunoperoxidase technique was used to detect the antibody. Negative control experiments were carried out routinely by substituting tris(hydroxymethyl)aminomethane-buffered saline for the primary antibody. As the chromogen we used 3,3'-diaminobenzidine, and slides were counterstained with hematoxylin.

The following antibodies (all supplied prediluted from DAKO, Carpinteria, CA) were used: CD68 (clone KP1), estrogen receptor (ER; clone 1D5), progesterone receptor (PR; clone 1A6), p53 (clone DO-7), and c-erbB-2 (HerceptTest). Immunohistochemical assays with these antibodies were done with an automated staining system (Techmate, DAKO). For VEGF immunohistochemical detection, a mouse monoclonal antibody against amino acids 1 to 140 of human VEGF (clone C-1, sc-7269; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used at a dilution of 1:100 with incubation overnight at 4°C in a humidified chamber.

A cutoff of 10% stained nuclei was used to establish positivity for ER and PR. To score p53 immunoreactivity, we used the criteria of Esrig et al¹⁷: cases with more than 10% of the nuclei stained were considered p53-mutated or p53+. Immunostaining for c-erbB-2 was considered positive when there was moderate to strong staining of the entire cell membrane. The macrophage index was determined by counting CD68-stained cells in 5 consecutive high-power fields ($\times 400$) in areas identified previously at $\times 100$ as having a higher density of macrophages ("hot spots"). Expression of VEGF in tumor cells was scored from 0 to 3+ (Image 1). The expression of VEGF in inflammatory cells also was recorded and scored as low (only a few positive inflammatory cells), moderate, or high (numerous positively stained inflammatory cells).

VEGF Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Blood samples were obtained just before surgery and at 8 hours after tumor removal. After coagulation (30 minutes) at room temperature, the serum was separated and stored at -80°C until assay. Serum concentrations of VEGF were measured in duplicate with a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's guidelines. This system uses a solid-phase monoclonal and an enzyme-linked polyclonal antibody raised against human VEGF. Recombinant human VEGF₁₆₅ protein was included

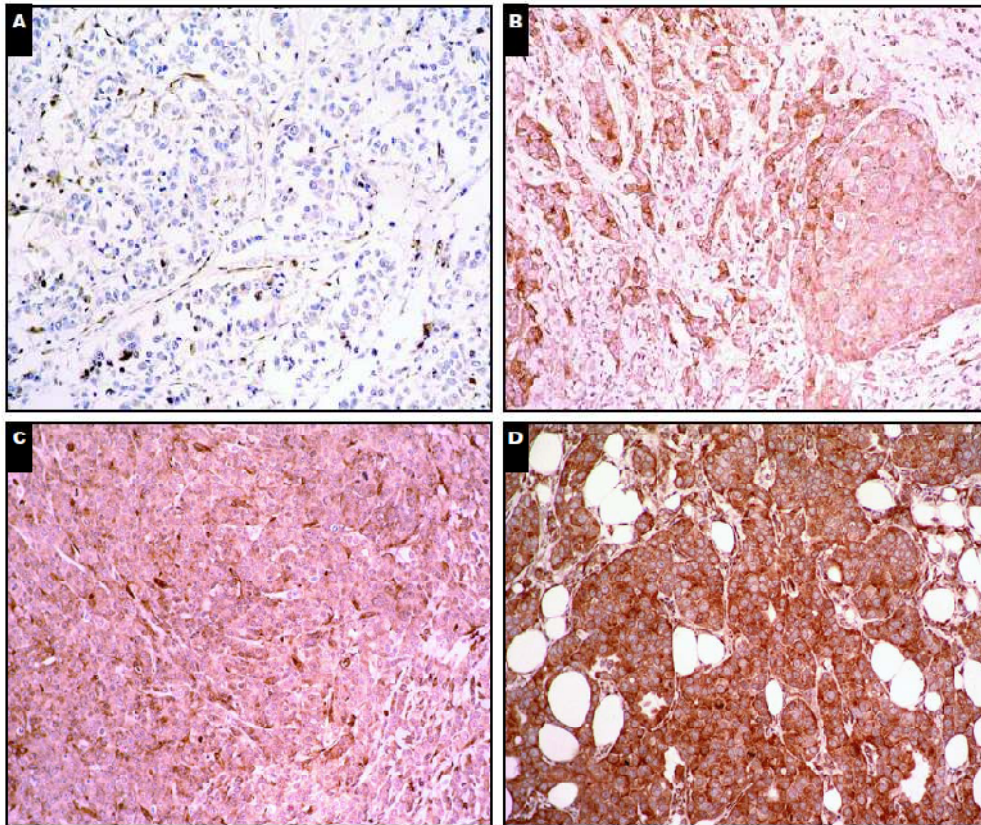


Image 1 Interpretation of immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. **A**, No staining of tumor cells (score, 0). **B**, Faint positivity (score, 1). **C**, Moderate positivity (score, 2). **D**, Strong positivity (score, 3) (A-D, diaminobenzidine, $\times 200$).

as a standard. The limits of sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay were 9 and 2,000 pg/mL.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done with the SPSS for Windows (version 11.0; SPSS, Chicago, IL). Nonparametric tests were used in this study. The Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis test was used to compare categorical with continuous variables; the Wilcoxon signed rank test was used to compare 2 sets of paired continuous variables; and the χ^2 and Fisher exact tests were used to compare 2 sets of categorical variables. Spearman rank correlation was used to assess the degree of correlation between 2 sets of continuous variables. A *P* value of less than .05 was considered statistically significant.

Results

Relationship Between Tumor Cell Expression of VEGF and Clinicopathologic Variables

Expression of VEGF in tumor cells was observed in 85 (63.9%) of 133 cases: 61 (64.9%) of 94 cases of ductal-type carcinoma (not otherwise specified), 13 (46.4%) of 28 cases of lobular carcinoma, and all cases of mucinous ($n = 8$) or papillary carcinoma ($n = 3$) showed some degree of VEGF positivity (Table 1). Tumors of ductal origin showed moderate (2+) or strong (3+) staining intensity more frequently than lobular carcinomas (42.5% vs. 25.0%).

Staining for VEGF in tumor cells correlated inversely with size and nodal involvement (Table 2). Median size was

Table 11
Clinicopathologic Characteristics of 133 Breast Cancer Patients and Tumor Tissue and TAM VEGF Expression

	VEGF Expression												
	Tumor						TAM						
	0	1	2	3	ND	%*	0	1	2	3	ND	%*	
Stage													
I (n = 45)	6	8	14	17	—	96.7	18	13	6	8	—	60.0	
II (n = 81)	40	17	14	10	—	50.6	55	13	7	5	1	31.3	
III (n = 7)	2	3	1	1	—	71.4	4	1	1	1	—	42.8	
Histologic features													
Ductal (n = 94)	33	21	20	20	—	64.9	48	22	12	11	1	48.4	
Lobular (n = 23)	15	6	5	2	—	46.4	19	4	2	3	—	32.1	
Mucinous (n = 8)	0	1	3	4	—	100.0	7	1	0	0	—	12.5	
Papillary (n = 3)	0	0	1	2	—	100.0	3	0	0	0	—	0.0	
Grade													
I (n = 39)	11	7	9	12	—	71.3	21	11	2	2	—	38.6	
II (n = 64)	32	14	11	7	—	50.0	43	10	6	5	—	32.8	
III (n = 30)	5	7	9	9	—	83.3	10	6	6	7	1	65.6	
tumor size (INM [†])													
pT1 (n = 71)	19	15	17	20	—	73.2	38	10	8	9	—	40.5	
pT2 (n = 58)	28	12	10	8	—	51.7	37	11	6	4	—	36.2	
pT3-4 (n = 3)	1	1	1	0	—	66.7	1	0	0	1	1	50.0	
Unknown (n = 1)	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	
Node status													
Positive (n = 65)	29	16	12	8	—	55.4	40	12	4	8	1	37.5	
Negative (n = 62)	17	11	15	19	—	72.6	31	15	10	6	—	50.0	
Unknown (n = 6)	—	—	—	—	6	—	—	—	—	—	6	—	
ER status													
Positive (n = 96)	39	20	19	18	—	59.3	62	21	7	6	—	35.4	
Negative (n = 34)	8	7	10	9	—	76.4	13	6	7	7	1	60.6	
ND (n = 3)	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	3	—	
PR status													
Positive (n = 97)	38	21	18	20	—	60.8	61	23	7	6	—	37.1	
Negative (n = 33)	9	6	11	7	—	72.7	16	4	7	5	1	50.0	
ND (n = 3)	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	3	—	
c-erbB-2 status													
Positive (n = 27)	9	5	7	6	—	66.7	14	5	4	3	1	46.2	
Negative (n = 92)	33	19	20	20	—	64.1	54	21	7	10	—	41.3	
ND (n = 14)	—	—	—	—	14	—	—	—	—	—	14	—	
p53 status													
Positive (n = 27)	7	7	8	5	—	74.1	13	2	7	5	—	51.9	
Negative (n = 94)	35	18	19	22	—	62.9	56	22	7	8	1	39.8	
ND (n = 12)	—	—	—	—	12	—	—	—	—	—	12	—	

ER, estrogen receptor; ND, not done; PR, progesterone receptor; TAM, tumor-associated macrophage; VEGF, vascular endothelial growth factor.
* Percentage of VEGF positivity (1-3 values).
† According to the International Union Against Cancer.

2.5 cm for VEGF- tumors and 2.2 cm for VEGF+ tumors. Positive staining was observed in 72.5% of node-negative carcinomas and 55.3% of the cases in which the lymph nodes were involved. In terms of VEGF score, node-negative cases were distributed evenly across the 4 degrees of expression, whereas the number of node-positive carcinomas decreased as the score rose from 0 to 3. In accordance with this inverse association between VEGF expression and size and nodal involvement, immunohistochemical VEGF expression in tumor cells also showed a significant inverse correlation with stage. The majority (67.7%) of stage I carcinomas showed moderate to strong staining (score 2+ to 3+), and conversely, carcinomas in stages II and III more frequently showed no staining (70.4%) or weak staining (score 0 or 1+). There was

no relationship between grade, ER, PR, c-erbB-2, or p53 status and VEGF score in tumor cells.

Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Its Association With VEGF and p53 Expression in Tumor Tissue

The median macrophage index was greater in VEGF+ tumors than in VEGF- tumors, but the difference did not reach statistical significance. In macrophages, cytoplasmic VEGF staining intensity frequently was similar to that in tumor cells, and the 2 parameters showed a direct correlation (P = .001). A higher VEGF score in macrophages was significantly more frequent in carcinomas of high grade and ER- tumors (Table 2).

Table 2
Correlation Between Clinicopathologic Variables and TAM, VEGF Tissue Expression, and Circulating VEGF Levels

	TAM	VEGF			
		Tumor	TAM	Presurgery	Postsurgery
Stage	NS	-0.372; $P < .001$	-0.236; $P = .006$	NS	NS
Grade	0.300; $P = .001$	NS	0.224; $P = .010$	NS	NS
Tumor size	NS	-0.241; $P = .005$	NS	0.186; $P = .033$	0.212; $P = .048$
Node status	NS	-0.251; $P = .004$	NS	NS	NS
ER	-0.208; $P = .019$	NS	-0.274; $P = .002$	NS	NS
PR	NS	NS	NS	NS	NS
c-erbB-2	NS	NS	NS	NS	NS
p53	0.245; $P = .007$	NS	NS	NS	0.224; $P = .046$
TAM	—	NS	0.391; $P < .001$	NS	0.286; $P = .007$
VEGF					
Tumor	NS	—	0.288; $P = .001$	NS	NS
TAM	0.384; $P < .001$	0.288; $P = .001$	—	NS	NS
Presurgery	NS	NS	NS	—	0.742; $P < .001$
Postsurgery	0.286; $P = .007$	NS	NS	0.742; $P < .001$	—

NS, not significant; TAM, tumor-associated macrophage; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Positivity for the p53 tumor suppressor gene was observed in 27 (22.3%) of 121 breast cancer cases. This positivity was significantly more frequent in carcinomas with a high macrophage index ($P = .007$).

Circulating VEGF Levels and Breast Cancer Surgery

Presurgery VEGF values ($n = 133$; median and interquartile ranges) were 280 pg/mL (148-414 pg/mL), and postsurgery values ($n = 83$) were 239 pg/mL (148-377 pg/mL). A significant relationship was found between presurgery and postsurgery serum VEGF values ($r = 0.742$; $P < .001$). Nonsignificant differences were observed in circulating VEGF levels according to menopausal status (data not shown).

Patients diagnosed as having primary breast cancer in clinical TNM stage II ($n = 81$) had higher presurgery serum VEGF values (336 pg/mL; range, 159-464 pg/mL) than patients diagnosed as having clinical TNM stage I disease ($n = 45$; 221 pg/mL; range, 146-333 pg/mL; $P = .034$; Mann-Whitney U Test). No significant differences were observed between patients diagnosed as having TNM stage III disease and cancer in other stages, although the number of patients classified as having TNM III disease was low ($n = 7$).

Relationships Between Serum VEGF Levels and Immunohistochemical Parameters

Serum VEGF levels were not associated with tumor histologic type, axillary node status, histologic grade, ER or PR status, or c-erbB2 status (Table 2). However, our data showed a tendency toward an association between presurgery serum VEGF levels and p53 alteration ($P = .074$) and a significant association between postsurgery serum values and the presence of p53 alterations ($P < .05$). Postsurgery serum VEGF levels were significantly higher in patients with primary breast

cancer who had a p53 alteration ($n = 18$) than in patients whose tumor expressed the wild-type p53 gene ($n = 62$; $P = .046$) (Figure 1).

A significant association was found between presurgery or postsurgery circulating VEGF levels and tumor size (Table 2; $P < .05$). Before surgery, VEGF levels in patients whose

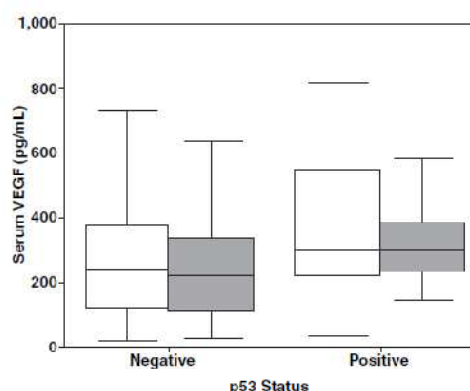


Figure 1 Relation between tumor p53 positivity and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels. Postsurgery (gray bars) serum VEGF levels were higher in patients with p53 positivity than in patients with wild-type p53 (negative) ($P < .05$). A tendency toward increased presurgery (white bars) values was observed in patients with p53 positivity ($P = .074$). Data for VEGF represent the median and interquartile ranges and were analyzed with the Mann-Whitney U test.

tumor was larger than 2 cm ($n = 61$; 341 pg/mL; range, 205-463 pg/mL) were significantly higher than in patients whose tumor was 2 cm or smaller ($n = 71$; 243 pg/mL; range, 126-385 pg/mL; $P = .021$). A similar association ($P < .05$) was observed for VEGF levels measured after surgery ($n = 41$; 292 pg/mL; range, 176-396 pg/mL vs $n = 47$; 219 pg/mL; range, 117-299 pg/mL; $P = .032$). Eight hours after tumor removal, a significant relationship was found between serum VEGF levels and the number of TAMs (Table 2). No significant relationship was observed between circulating VEGF levels and VEGF expression in tissue or tumor infiltration-associated macrophages.

Discussion

In breast cancer, angiogenesis is an important process related to tumor growth and progression. Several studies have shown a significant correlation between microvascular vessel density and metastasis¹⁸ and an association with clinical outcome.¹⁹ Tumor VEGF expression correlates significantly with angiogenic activity and survival in human breast cancer.^{6,20} In our patients we observed an inverse correlation between VEGF and tumor size and nodal status (Table 2). Although this may seem surprising, the relation between VEGF and these conventional prognostic factors is not well defined, and the results of different studies have been discordant.²¹⁻²³ Our results also show differences in the expression of VEGF between ductal carcinomas and lobular carcinomas, as previously reported^{24,25}: the former frequently were positive, whereas almost all lobular carcinomas were negative or only weakly positive.

In this study we focused our attention on TAMs and their relation to VEGF production in patients with breast cancer. TAMs represent a major component of the inflammatory infiltrate in breast cancer. Several cytokines have been implicated in the recruitment of macrophages into the tumors, and the most important among them seem to be monocyte chemoattractant protein-1, macrophage colony-stimulating factor, and VEGF. All of them may be expressed by tumor cells and have been associated positively with macrophage content in tumors of various origins.²⁶ TAMs are related in complex ways to tumor biology, and these relationships involve stimulatory and inhibitory functions of neoplastic growth.²⁷ One activity of TAMs that may promote tumor survival and growth is the secretion of angiogenic factors such as VEGF, which are able to stimulate angiogenesis. Thus, it is apparent that VEGF may regulate angiogenesis not only by acting directly on endothelial cells, but also by attracting macrophages into the tumor.

Some studies of breast carcinoma have found an association between VEGF secreted by tumor cells and macrophage density, suggesting that VEGF expression may be an important

factor in the recruitment of TAMs into breast carcinoma tissue.^{5,28} Although we found a higher macrophage index in VEGF+ tumors than in VEGF- tumors, the difference did not reach statistical significance. But it is clear that the attraction of TAMs to the tumor depends on multiple factors and not only on VEGF secretion by tumor cells. Leek et al¹³ observed a positive association between VEGF expression and macrophage index in epidermal growth factor receptor (EGFR)- tumors but not in EGFR+ tumors, suggesting that macrophages may be attracted to the tumor via other pathways.

In our study, overexpression of the cell cycle suppressor gene *p53* correlated with an increase in the number of TAMs (Table 2). This has been reported previously in endometrial carcinoma²⁹ but not in breast cancer. The explanation for this association may be related to angiogenesis, because mutated *p53* may indirectly promote angiogenesis in breast tumors by increasing VEGF expression in tumor cells.^{7,20} The *p53* molecule thus may be related to VEGF-mediated TAM recruitment. Recent *in vitro* studies have shown that the *p53* tumor suppressor like molecule *p73* can induce the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in human thymic epithelial cells.³⁰ These cytokines can stimulate and activate macrophages next to these cells to express *p73*, increasing angiogenic activity. In addition, some authors have suggested that the wild-type *p53* gene may be inactivated functionally by macrophage migration inhibitory factor, a proinflammatory cytokine released by macrophages and T cells at sites of inflammation such as tumors.³¹ Thus, mutations in the *p53* gene may act synergistically with TAMs to promote new vessel formation.

The role of macrophages in angiogenesis may be more relevant than expected, as suggested by recent experimental studies. Authors who studied a model of inflammatory neovascularization in the cornea reported significant inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after depletion of the macrophage infiltrate and concluded that macrophages might have a crucial role in inflammatory neoangiogenesis mediated by VEGF.³² In addition, *in vitro* experiments in which macrophages and tumor cells were cocultured demonstrated that the presence of tumor cells was associated with increased VEGF secretion by macrophages and that the amount of VEGF secreted by macrophages was 2- to 3-fold as great as the amount secreted by tumor cells.³³ This supports the relevance of TAMs as a source of VEGF in tumors. Although the secretion of VEGF by macrophages is regulated by several tumor-related factors that remain to be elucidated fully, we found a significant correlation between levels of VEGF in tumor cells and in macrophages, as previously described.^{5,13} In addition, hypoxia is known to up-regulate the expression of VEGF by tumor cells, and there is evidence of increased VEGF production by TAMs in breast cancer.³⁴

Thus, 2 hypotheses may be formulated: (1) Neoplastic cells interact with TAMs and directly promote the secretion of VEGF by these cells. (2) VEGF expression by the 2 cell types may be regulated by the same microenvironmental stimuli, eg, hypoxia. More research will be needed to discern which of these 2 hypotheses accounts for VEGF expression by tumors.

The increase in circulating VEGF levels in patients with cancer requires sources of VEGF production. Although the tumor cell is proposed as the main source of VEGF released into peripheral blood, other sources, including circulating platelets and leukocytes (such as monocytes and T lymphocytes), also can release VEGF to the circulation and contribute to the increase in circulating levels of VEGF.³⁵ Peripheral blood monocytes are the main source of TAMs recruited into hypoxic areas of the tumor mass,²⁷ and it is known that VEGF can induce migration and activation of peripheral monocytes through its receptor flt-1, which is expressed on the monocyte membrane.³⁶

To study the possible relationship between TAMs and circulating VEGF levels, we measured presurgery and post-surgery serum levels of VEGF. Because VEGF has a half-life of 3 minutes in circulation,³⁷ the samples we obtained 8 hours after tumor removal should be devoid of VEGF originating from the tumor. Although we did not observe a significant correlation between presurgery serum VEGF values and the number of TAMs, when the main source of VEGF production (the tumor) was removed, we observed a correlation between serum VEGF levels and the number of TAMs (Table 2). To our knowledge, this is the first time that this result has been reported. Thus, the correlation observed between the number of TAMs and postsurgery serum VEGF values may be attributed, at least in part, to VEGF released by circulating monocytes/macrophages; these cells can be primed to produce angiogenic factors after surgery by cytokines previously released by the tumor²⁷ or induced by tissue hypoxia.

In addition to inhibiting tumoral proliferation by negative regulation of the cell cycle, the *p53* gene is known to indirectly curtail tumor progression by inhibiting tumor angiogenesis and reducing the expression of VEGF messenger RNA.³⁸ In the present study, 22.3% of the cases showed *p53* overexpression, a rate previously observed by other authors.³⁹ We found no relationship between *p53* overexpression and VEGF expression in tumor cells. Although the number of *p53*+ cases was low, we observed a significant correlation between *p53* overexpression and postsurgery serum VEGF levels in our patients (Table 2). Consistent with our results are the findings reported by Nishimura et al,¹¹ who observed a correlation between plasma VEGF levels and *p53* overexpression in patients with breast cancer. The fact that cases that expressed the mutant *p53* had higher serum VEGF levels than cases expressing the wild-type *p53* (Figure 1) supports the idea that *p53* is involved in the regulation of tumor angiogenesis and

that this regulation is mediated, at least in part, by the production of circulating VEGF.

We observed a connection between TAMs, *p53*, and serum VEGF levels in primary breast cancer. Our results suggest that postsurgery serum VEGF levels are directly dependent on macrophage infiltration of the tumor and the presence of mutations in the wild-type *p53* gene, rather than on increased VEGF expression by tumor cells. This study documented a strong interrelation between tumor macrophage infiltration, *p53* overexpression, and circulating VEGF levels—an interrelation that might have an important role in the angiogenic activity of breast cancer.

From the Departments of Pathology, ¹Virgen de la Victoria University Hospital and ²University of Malaga; and ³Medical Oncology Service and ⁴Breast Surgery Unit, Virgen de la Victoria University Hospital, Málaga, Spain.

Supported by grants FIS 99/1070 and 00/1112 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health, Madrid.

Address reprint requests to Dr Vicioso: Dept of Pathology, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Campus de Teatinos s/n, 29010-Málaga, Spain.

Acknowledgments: We thank Maria Jose Lozano and Vanessa De Luque for technical assistance, and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

References

1. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*. 1996;32A:2451-2460.
2. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*. 2001;2:278-289.
3. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57:591-597.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.
5. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, et al. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*. 2000;192:150-158.
6. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000;5:37-44.
7. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, et al. *p53* and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2000;89:51-62.
8. Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, et al. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53:161-166.
9. Heer K, Kumar H, Read JR, et al. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3491-3494.
10. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001;19:1207-1225.

11. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, et al. Higher plasma vascular endothelial growth factor levels correlate with menopause, overexpression of p53, and recurrence of breast cancer. *Breast Cancer*. 2003;10:120-128.
12. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003;88:1721-1726.
13. Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, et al. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol*. 2000;190:430-436.
14. Yu JL, Rak JW. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res*. 2003;5:83-88.
15. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56:4625-4629.
16. Leek RD, Talks KL, Pezella F, et al. Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in human breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62:1326-1329.
17. Esrig D, Spruck CH III, Nichols PW, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*. 1993;143:1389-1397.
18. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8.
19. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*. 1995;13:765-782.
20. Lee JS, Kim HS, Jung JJ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in invasive ductal carcinoma of the breast and the relation to angiogenesis and p53 and HER-2/neu protein expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10:289-295.
21. Gasparini G, Toi M, Gion M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:139-147.
22. Balsari A, Maier JA, Colnaghi M, et al. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab Invest*. 1999;79:897-902.
23. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer*. 2002;87:772-778.
24. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LC, et al. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol*. 1998;185:394-401.
25. Coradini D, Pelizzaro C, Veneroni S, et al. Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Br J Cancer*. 2002;87:1105-1111.
26. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196:254-265.
27. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992;13:265-270.
28. Valkovic I, Dobrila E, Melato M, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2002;140:583-588.
29. Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer*. 1999;84:538-543.
30. Kikuchi T, Ichimiya S, Kojima T, et al. Expression profiles and functional implications of p53-like transcription factors in thymic epithelial cell subtypes. *Int Immunol*. 2004;16:831-841.
31. Hudson JD, Shraibeh MA, Maestro R, et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*. 1999;190:1375-1382.
32. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*. 2004;113:1040-1050.
33. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, et al. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*. 2002;62:7042-7049.
34. Herney JH, Dimitriadis E, Kay E, et al. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann Surg Oncol*. 1998;5:271-278.
35. Salvei P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 1999;5:487-491.
36. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87:3336-3343.
37. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
38. Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61:6952-6957.
39. Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, et al. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. *J Clin Pathol*. 2004;57:755-761.