

Original

Angiogénesis tumoral: estudio morfométrico comparativo en sarcomas de tejidos blandos y hueso*

R. Wong Navarro**, S. Navarro, D. Contreras Barrionuevo,
J.E. Fernández-Britto Rodríguez y A. Llombart Bosch

*Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Dr. C.J. Finlay, Ciudad de La Habana, Cuba;
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, España.*

SUMMARY

Background: Angiogenesis is essential for neoplasms to grow and develop: its amount and density have been studied in malignant neoplasms to predict their biological behavior and prognosis. Materials and methods: We studied biopsy specimens of 37 round cell sarcomas and 22 spindle cell sarcomas of soft tissue and bone. Blood vessels were identified with the use of MoAb CD34 contrasted with methyl green. The morphometric study was performed by digital image processing with an Olympus CUE-2 system. In this analysis, number and area of blood vessels, percent of area occupied by vessels and vascular density were determined. Results: The mean blood vessel count in round cell sarcomas was lower (126.35) than in spindle cell sarcomas (157.22). The mean area occupied by blood vessels was much higher in spindle cell (272.70) than in round cell sarcomas and showed statistical significance in the Student's t-test ($p=0.026$). Vascular density was also higher in spindle cell ($26,231 \times 10^{-4}$) than in round cell sarcomas ($20,959 \times 10^{-4}$). Conclusion: In our specimens a higher degree of angiogenesis was shown to be present in soft tissue and bone spindle cell sarcomas. The amount of angiogenesis should be considered of prognostic value in these lesions. Rev Esp Patol 2000; 33(1): 25-30.

Key words: Angiogenesis - CD34 - Spindle cell sarcomas - Round cell tumors

RESUMEN

Planteamiento: La angiogénesis es un proceso esencial para el desarrollo y crecimiento de las neoplasias. La cuantificación y densidad de su desarrollo en diversas variedades de neoplasias malignas ha sido estudiada con el objeto de predecir el comportamiento biológico y pronóstico de las mismas. Material y Método: Se estudian 37 especímenes de biopsia de sarcomas de células redondas y 22 de sarcomas fusocelulares de los tejidos blandos y hueso, que conforman los dos grupos de análisis. El estudio de la vascularización se realiza con el análisis de la expresión de CD34. El estudio morfométrico se efectuó mediante procesamiento digital de imágenes, determinándose el número de vasos sanguíneos, el área de vasos sanguíneos, el porcentaje de área ocupada por vasos y la densidad vascular. Resultados: El número de vasos sanguíneos promedio en el grupo de sarcomas de células redondas fue menor (126,35) que en el de células fusiformes (157,22); la media del área ocupada por vasos sanguíneos fue mucho mayor en los sarcomas fusiformes (272,70) que en los de células redondas (188,79), con significación estadística en la prueba t de Student ($p=0.026$). Igualmente la densidad vascular fue mucho mayor en el grupo de sarcomas fusocelulares (26.231×10^{-4}) que en el de células redon-

*Este trabajo ha sido realizado gracias a la beca FISs Nº 98/0600 (Madrid).

**Becario del Programa: Uná Nau de Solidaritat de la Universitat de Valencia.

das (20.959×10^{-4}). *Conclusión:* Existe un desarrollo mayor de angiogénesis en el grupo de sarcomas fusocelulares de los tejidos blandos y hueso. Hipotetizamos el posible valor pronóstico que pudiera tener la cuantificación de la angiogénesis en estas lesiones. **Rev Esp Patol 2000; 33(1): 25-30.**

Palabras clave: Angiogénesis - CD34 - Sarcomas fusocelulares - Tumores de células redondas

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es fundamental para la reproducción, el desarrollo y la reparación de los tejidos (1). Las neoplasias no se excluyen de este principio biológico, por lo que, en particular, las formas malignas sólidas dependen de la neovascularización para su crecimiento progresivo y diseminación metastásica (2-4). Esta angiogénesis o neovascularización es regulada por varios mediadores que son conocidos como factores angiogénicos. En los últimos 15 años se han descrito numerosos factores que se han dividido en inhibidores y favorecedores de la angiogénesis (1, 4-13). El proceso de la angiogénesis depende del equilibrio entre los factores reguladores positivos y negativos (1, 3-5).

La cuantificación y densidad de la angiogénesis en diversas variedades de neoplasias malignas ha sido estudiada con el objetivo de predecir el comportamiento biológico y pronóstico de las mismas (14-17). Varios estudios señalan que un alto grado de angiogénesis (aumento del número de vasos sanguíneos y mayor densidad vascular) está asociado con un incremento de la proliferación celular, mayor riesgo de metástasis, recurrencia y pronóstico fatal en pacientes con cáncer de mama, colorrectal, próstata, esófago, estómago, vejiga, melanoma, neuroblastoma, etc. (18-26). Por esto, en los últimos años, la determinación del grado de vascularización ha adquirido importancia como un factor pronóstico independiente en varias de estas neoplasias (14, 17, 20, 21, 26).

Los sarcomas de partes blandas y hueso conforman un grupo heterogéneo de neoplasias que poseen diversa morfología, distinta localización anatómica y variada agresividad clínica. Aunque de relativa poca frecuencia, resulta importante determinar los elementos pronóstico que permitan conocer la posible evolución de estos tumores. La predicción del comportamiento biológico de estas lesiones de forma tradicional se basa fundamentalmente en el tipo histopatológico del tumor y el grado de malignidad, determinado según criterios morfológi-

cos establecidos como el tamaño, la celularidad, el pleomorfismo, la actividad mitótica, la presencia de necrosis, infiltración, metástasis, etc. Más recientemente se ha añadido la aplicación de nuevas técnicas de inmunohistoquímica, citogenética y biología molecular que, aunque hoy por hoy no todas tienen la sensibilidad y especificidad bien establecidas, ofrecen un futuro esperanzador, no sólo para el diagnóstico anatomopatológico sino también para el establecimiento de criterios pronóstico de uso clínico (27).

Considerando el valor pronóstico que ha demostrado tener la determinación del desarrollo de la angiogénesis en tumores malignos de diversas localizaciones, el presente estudio tiene como objetivo comparar el grado de angiogénesis entre los sarcomas de células redondas y de células fusiformes de tejidos blandos y hueso, utilizando como marcador de células endoteliales el anticuerpo monoclonal anti-CD34, con el propósito de buscar nuevos elementos que ayuden a establecer criterios pronóstico en estas lesiones.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudian 37 especímenes de biopsia de sarcomas de células redondas (28 sarcomas de Ewing y 9 tumores neuroectodérmicos periféricos) y 22 de sarcomas fusocelulares (11 sarcomas sinoviales, 5 fibrohistiocitomas malignos, 3 dermatofibrosarcomas, 2 sarcomas primitivos con diferenciación neural y 1 rhabdomyosarcoma) de los tejidos blandos y hueso, que conforman los dos grupos de análisis.

El estudio histopatológico se realizó en cortes incluidos en parafina, coloración de hematoxilina-eosina, técnicas histoquímicas (PAS, reticulina, tricrómico de Masson) e inmunohistoquímicas utilizando el método del complejo avidina-biotina (ABC) con diferentes marcadores que permitieron la tipificación de los tumores (vimentina, actina, desmina, HBA-71, enolasa neuronal es-

Tabla 1. Media y desviación estándar de las variables estudiadas para el grupo sarcoma de células redondas (n=37).

Variabes	Media	Desviación estándar
Área de vasos	188.7908	96.5596
Nº de vasos	126.3513	64.1011
Densidad vascular	2.0959E-04	1.0830E-04
Área de vasos (%)	3.2437	1.2965

pecífica, proteína S-100, HNK-1, CD68, citoqueratina) y CD34 contrastado con verde metilo como marcador de células endoteliales para la mejor identificación de los vasos sanguíneos.

El estudio morfométrico se realizó por procesamiento digital de imágenes con el Sistema Olympus CUE-2, calibración 0.7978. Se analizaron 10 campos microscópicos de 200x en cada preparación y se determinó el número de vasos sanguíneos, el área de vasos sanguíneos, el porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos y la densidad vascular.

Se aplicaron análisis estadísticos descriptivos: media de número de vasos, media de área de vasos sanguíneos, media del porcentaje de área ocupada por vasos sanguí-

Tabla 2. Media y desviación estándar de las variables estudiadas para el grupo sarcoma de células fusiformes (n=22).

Variabes	Media	Desviación estándar
Área de vasos	272.7067	151.6042
Nº de vasos	157.2273	133.9054
Densidad vascular	2.6231E-04	2.2394E-04
Área de vasos (%)	4.8872	2.4902

neos y densidad vascular media para cada grupo en estudio; y el estudio comparativo *t* de Student, utilizando el paquete estadístico NCSS (*Number Cruncher Statistical System Ver. 5.0*).

RESULTADOS

En el grupo de sarcomas de células redondas la media del número de vasos sanguíneos es de 126,35 (desviación estándar 64,10) (Tabla 1), mientras que en los sarcomas fusocelulares es de 157,22 (desviación estándar 133,90) (Tabla 2). En el test de comparación de Student no se aprecia significación estadística ($p=0.3193$) en este aspecto entre ambos grupos (Fig. 1).

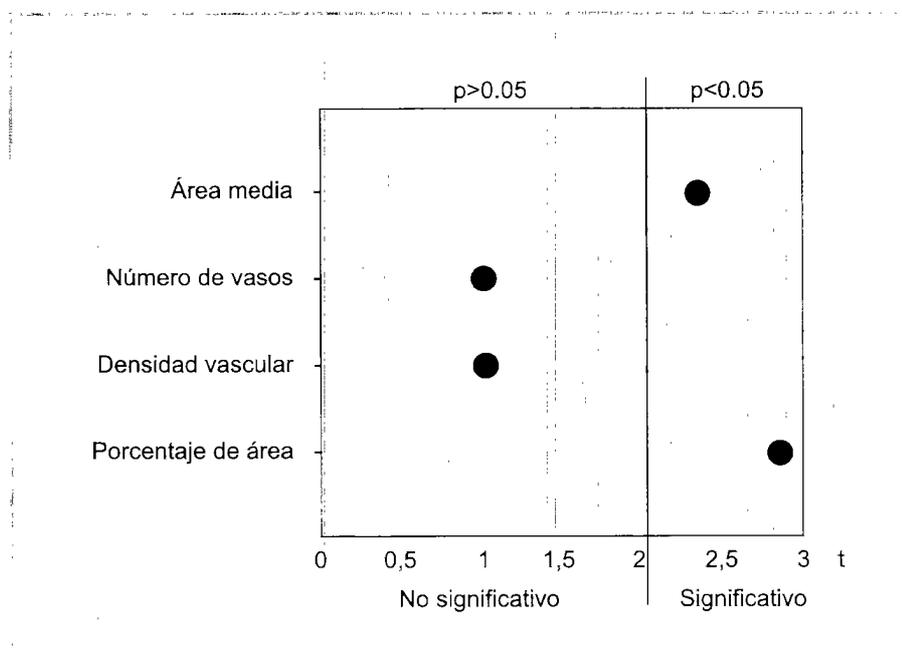


Figura 1. Resultados de la prueba *t* de Student entre los sarcomas de células redondas y células fusiformes.

La media del área ocupada por los vasos sanguíneos en el grupo de sarcomas de células fusiformes es de 272,70 (desviación estándar 151,60) (Tabla 2), y en el de células redondas de 188,79 (desviación estándar 96,55) (Tabla 1), con significación estadística en el test de comparación ($p=0.0263$) (Fig. 1).

El porcentaje promedio de área ocupada por vasos sanguíneos en los sarcomas fusocelulares es de 4,88 (Tabla 2) y en los de células redondas de 3,24 (Tabla 1); se observa también significación estadística ($p=0.0075$) en el test de comparación entre ambos grupos (Fig. 1).

La densidad vascular (número de objetos por área medida) también fue mayor en el grupo de sarcomas fusocelulares (2623×10^{-4}) (Tabla 2) que en el de células redondas (2095×10^{-4}) (Tabla 1). Sin embargo, en este aspecto no se observó significación estadística en el test de comparación entre ambos grupos (Fig. 1).

La utilización de la técnica inmunohistoquímica del anticuerpo monoclonal anti-CD34 contrastada con verde metilo resultó óptima para el marcado de las células endoteliales, facilitando la identificación de los vasos sanguíneos (Figs. 2 y 3) y la realización de un estudio morfométrico preciso.

DISCUSIÓN

En el momento actual, está bien establecido que la vascularización desempeña un papel clave en el crecimiento, la invasión y la metástasis de los tumores. Folkman (1, 2) ha demostrado que células tumorales en cultivo, en ausencia de vascularización, crecen tan sólo hasta formar nódulos de 1-2 mm de diámetro; en cambio, cuando son implantadas en animales de experimentación capaces de desarrollar neovascularización crecen mucho más y de forma rápida. La hipótesis propuesta por Folkman de que cada nuevo incremento de la masa tumoral debe estar precedida por la proliferación de una nueva red vascular, ha sido validada por numerosos trabajos en los últimos años (7-13), estudiando los factores favorecedores e inhibidores de la angiogénesis.

La cuantificación de la vascularización tumoral, determinando el número de vasos sanguíneos y la densidad vascular, en especímenes de biopsias de neoplasias malignas de muy diversos tipos y localizaciones, ha aportado algunos datos interesantes. Weidner y cols. (18) en 1991 describieron que el recuento de vasos sanguíneos fue mayor en pacientes con cáncer de mama metastásico que en un grupo comparativo sin metástasis. De forma similar, se comunicó (19) en el carcinoma de próstata un in-

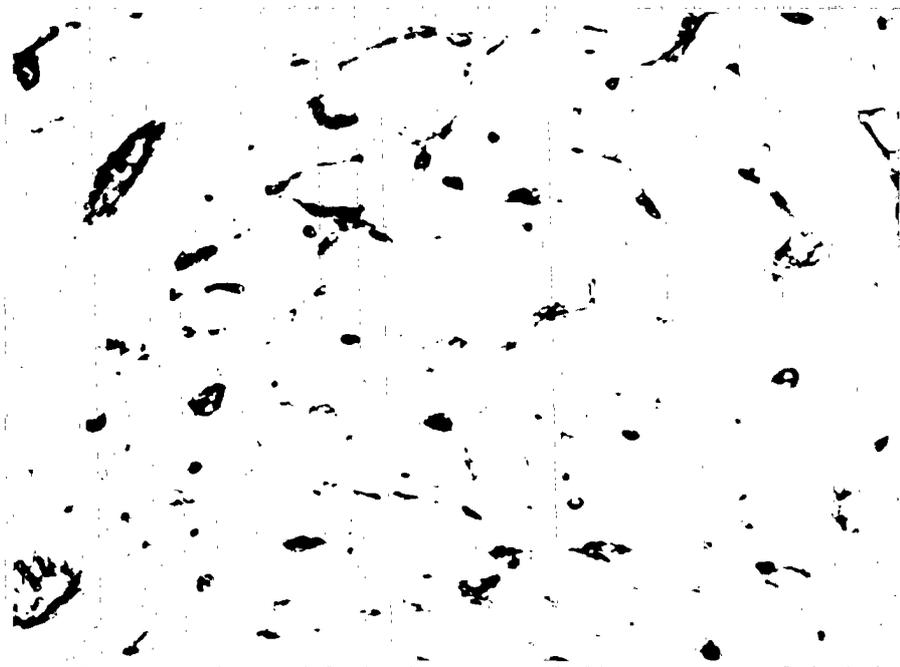


Figura 2. Alto grado de angiogénesis en un sarcoma de células fusiformes. Técnica inmunohistoquímica de anticuerpo monoclonal anti-CD34 contrastado con verde metilo (original, $\times 200$).



Figura 3. Bajo grado de angiogénesis en un sarcoma de células redondas. Técnica inmunohistoquímica de anticuerpo monoclonal anti-CD34 contrastado con verde metilo (original, $\times 200$).

crecimiento del número de vasos sanguíneos con significación estadística según aumenta la malignidad en el sistema de gradación de Gleason. Williams y cols. (20) señalaron que la angiogénesis mostró una fuerte correlación con recidiva regional en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, y que pudiera ser usada como un indicador pronóstico independiente. Igualmente, Meitar y cols. (22) concluyeron en un estudio sobre el neuroblastoma que la angiogénesis puede desempeñar un importante papel en la determinación del comportamiento biológico de este tumor. También se han señalado correlaciones entre la vascularización del tumor y el pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal y carcinoma escamoso del esófago (24, 26).

En los resultados de nuestro estudio se observa un mayor desarrollo de la angiogénesis en el grupo de sarcomas de células fusiformes, con significación estadística ($p < 0.05$) mediante la prueba *t* de Student entre ambos grupos referida al área media y porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos. Esto nos indica un desarrollo diferente de la angiogénesis en los grupos analizados y plantea el interrogante, a comprobarse en estudios posteriores, de si el alto grado de desarrollo de la angiogénesis observado en los sarcomas de células fusiformes (Fig. 2), en comparación con los de células redondas

(Fig. 3), es un elemento que señale un peor pronóstico para los primeros. La media del número de vasos sanguíneos y de la densidad vascular también fue mayor en los sarcomas fusocelulares, aunque en el test de comparación no se observó significación estadística. Por otra parte, hemos de resaltar que el estudio estadístico se ve dificultado por las grandes desviaciones de la media y el carácter poco homogéneo de las muestras.

Entre otros marcadores de células endoteliales que permiten la identificación de vasos sanguíneos, el anticuerpo monoclonal anti-CD34 ha resultado ventajoso en los estudios de angiogénesis en los tumores sólidos (28, 29). En nuestra experiencia su utilización resultó óptima contrastándolo con verde metilo de esta forma se visualizan adecuadamente los vasos sanguíneos y se obtienen imágenes digitalizadas con calidad que facilitan la realización y precisión del estudio morfométrico.

En conclusión, en la muestra estudiada se comprueba un desarrollo diferente de la angiogénesis en los grupos analizados con un mayor grado de neovascularización en el grupo de sarcomas fusocelulares de los tejidos blandos y hueso. Se infiere el posible valor pronóstico que pudiera tener la cuantificación de la angiogénesis en estas lesiones. Se constata la utilidad del anticuerpo monoclonal anti-CD34 contrastado con verde metilo pa-

ra el marcado de las células endoteliales, facilitando la identificación de los vasos sanguíneos y la realización del estudio morfométrico preciso.

BIBLIOGRAFÍA

- Folkman J. *Clinical applications of research on angiogenesis*. N Engl J Med 1995; 333: 1757-1763.
- Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6.
- Díaz Flores L. *Angiogenesis: An update*. Histol Histopath 1994; 9: 807-843.
- Folkman J. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and others disease*. Nature Med 1995; 1: 27-31.
- Folkman J. *Angiogenic factors*. Science 1987; 235: 442-447.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. *Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin 1*. Science 1994; 265: 1582-1584.
- Mori S, Ueda T, Kuratsu S, Hosono N, Izawa K, Uchida A. *Suppression of pulmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNF-470 in murine osteosarcoma*. Int J Cancer 1995; 61(1): 148-152.
- Anan K, Morisaki T, Katano M y cols. *Vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer*. Surgery 1996; 119(3): 333-339.
- Gullino PM. *Prostaglandins and gangliosides of tumor microenvironment: Their role in angiogenesis*. Acta Oncol 1995; 34(3): 439-441.
- Relf M, Lejeune S, Scott PA y cols. *Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta 1, platelet derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis*. Cancer Res 1997; 1, 57(5): 963-969.
- 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.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y y cols. *Angiostatin: A circulation endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1994; LIX.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y y cols. *Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell 1997; 88(2): 277-285.
- Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. *Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0.76 mm) malignant melanomas*. Am J Pathol 1994; 145: 510-514.
- Leon SP, Folkherth RD, Black PM. *Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors*. Cancer 1996; 77: 2: 362-372.
- Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. *Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer*. Cancer 1996; 77(Suppl. 8): 1722-1728.
- Bochner BH, Cote RJ, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. *Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis*. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 21, 1603-12.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. *Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med 1991; 324: 1-8.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. *Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma*. Am J Pathol 1993; 143: 401-409.
- Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derose PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ. *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors*. Am J Surg 1994; 168: 373-380.
- Maeda K, Chung YS, Takatsuka S y cols. *Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma*. Br J Cancer 1995; 72: 319-323.
- Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. *Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma*. J Clin Oncol 1996; 14: 405-414.
- Saclarides TJ. *Angiogenesis in colorectal cancer*. Surg Clin North Am 1997; 77(1): 253-260.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M y cols. *Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer*. Cancer Res 1997; 57(6): 1043-1046.
- Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. *Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate*. Cancer 1997; 79(4): 772-779.
- Tanigawa N, Matsumura M, Kitaoka A y cols. *Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer 1997; 79(2): 220-225.
- Llombart Bosch A, Pellín A. *Patología molecular aplicada a los tumores humanos*. Curso Controversias y Adelantos en Patología Quirúrgica. Armed Forces Institute of Pathology (A.F.I.P.), Dpto. de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España, abril 1998.
- Heimburg S, Oehler MK, Kristen P, Papadopoulos T, Caffier H. *The endothelial marker CD34 in the assessment of tumour vascularization in ovarian cancer*. Anticancer Res 1997; 17(4B): 3149-3151.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. *Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non early gastric carcinomas*. Br J Cancer 1997; 75(4): 566-571.