

UNIVERSIDAD DE GRANADA.

FACULTAD DE MEDICINA.



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL EN  
EL CÁNCER DE COLON. APLICACIONES DEL ANÁLISIS  
DE IMAGEN.

Maria Jesús Álvarez Martín.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Jesús Álvarez Martín  
D.L.: GR 1707-2013  
ISBN: 978-84-9028-580-0

# **I.-INTRODUCCIÓN.**

### 1. 1.-EPIDEMIOLOGÍA CÁNCER COLORRECTAL.

La incidencia de cáncer colorrectal esta aumentando paulatinamente.

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en frecuencia en todo el mundo y el segundo en los países desarrollados representando en ellos la segunda causa de muerte por cáncer si consideramos sólo aquellos que afectan a ambos sexos (**Bradley BA 1997, Ries LAG 2000**).

En España, aunque la incidencia es más baja que en otros países desarrollados, es el segundo más frecuente en varones después del cáncer de pulmón , ocupando el segundo lugar después del cáncer de mama (**Black RJ 1997**).

Se correlaciona directamente con la edad aumentando su incidencia de manera sostenida después de los 35 años (**Camerón 1994**); los varones presentan mayor riesgo de padecerlo que las mujeres. El 50% de los cánceres que afectan a partir de los 70 años tienen localización colorrectal (**Fahy B 2001**).

### 1.2.-FACTORES ETIOLÓGICOS.

Aunque factores familiares y dietéticos están reconocidos como determinantes de riesgo para tumorigénesis colorrectal, las causas específicas del cáncer colorrectal permanecen desconocidas.

Su incidencia ha experimentado un incremento progresivo desde el inicio de siglo XX (**Cameron 1994, Troisi RJ 1999**).

El riesgo de cáncer colorrectal es modificable; las diferencias en la población pueden ser explicadas por cambios en el estilo de vida y factores medio-ambientales (**Correa P 1978, Cummings JH 1998**). Junto a estos factores ambientales, no cabe duda que, como cualquier otro tipo de cáncer, el CCR tiene un importante componente genético. En diferentes tipos de neoplasias la alteración genética que conduce a su instauración es única y bien definida. En el CCR las mutaciones y/o alteraciones genéticas encontradas son múltiples y su aparición no suele relacionarse sólo con una.

Entre los posibles agentes etiológicos consideramos:

- Factores dietéticos
- Factores medio-ambientales y actividad física.
- Factores genéticos

### **1.2.1.-Factores dietéticos**

La dieta juega un papel principal en la etiología y prevención del cáncer.

La mayoría de los cánceres son esporádicos y las estimaciones epidemiológicas sugieren que hasta un 80% de los cánceres colorrectales pueden ser atribuibles a la dieta (**Bingham SA 2000**).

Se sabe que ciertos factores dietéticos están asociados con la iniciación y desarrollo del cáncer colorrectal; entre ellos: carne roja (**Sensik Ala 2001, Sinha R 1999; Bingham 1999, 2000**), grasa animal (**Momen MA 2002, Slattery ML2001**), dieta insuficiente en calcio (**Liuz 2001, Scalmati A 1992**), pH fecal (**Walker ARP 1986, Pietroiusti A 1983**), dieta pobre en verduras, frutas y fibra (**Smith-Warner SA 1999, Thompson HJ 1999; Huang HY 2000**), alcohol (**World Cáncer Research Fund 1997, Loognecker MP 1999**).

### **1.2.2.-Factores medio-ambientales y de actividad física:**

Se ha visto un mayor riesgo de CCR en aquellos países con pocas horas de sol, en relación a la escasez de vit D (**Tangpricha V 2001**).

Antropometría (peso o IMC): La delgadez y actividad física como protectores de CCR (**Levi F 1999, Mac Tiernan A 2000, Bruce WR 2000, Kaaks R 2000**).

### **1.2.3.-Factores genéticos y moleculares en las neoplasias colorrectales.**

Hoy día existen multitud de estudios que apuntan que el cáncer colorrectal se genera como resultado de acumulación de mutaciones de genes específicos (oncogen activado, gen supresor inactivado) que controlan la **división celular**, la **apoptosis** y las **reparaciones del ADN**. Existe abundante evidencia de que estos factores genéticos y moleculares tienen una interacción directa con los factores dietéticos y de tipo ambiental.

Es bien conocida la importancia de la enfermedad polipoide; la mayoría de los cánceres de colon y recto se originan sobre un pólipo adenomatoso o adenoma preexistente (**Vogelstein B 1988**), los cuales constituyen lesiones comunes, particularmente en personas de edad avanzada. Su verdadera incidencia es difícil de calcular en poblaciones libres de sintomatología pero los estudios necrópsicos han mostrado una prevalencia cercana al 35% en Europa y los EE. UU, con menores índices (10%-15%) en Asia y África. Los adenomas vellosos se asocian a mayor potencial maligno, así como el tamaño voluminoso (un 25% de los adenomas tienen un diámetro >1cm) y el alto grado de displasia epitelial (en un 5%-10% de los pólipos adenomatosos se observa displasia grave). El 5% de los pólipos adenomatosos se malignizan en un lapso de 5 a 10 años (**Midgley R 1999**).

Se han desarrollado diversas líneas de investigación para el estudio de los cambios genotípicos que van de la mucosa normal y la hiperplasia mucosa hasta el cáncer invasor,

pasando por los distintos tipos evolutivos del adenoma (tubular, tubulo-velloso y velloso). Asimismo, la existencia de formas hereditarias de este cáncer -a destacar poliposis adenomatosa familiar (PAF) y CCR no asociado a poliposis (CCHNP)- que comparten la vía aleatoria común de la secuencia adenoma-carcinoma han facilitado el desarrollo de la hipótesis genética en el proceso de la carcinogénesis colorrectal.

Los adenomas y carcinomas colorrectales comparten algunos rasgos genéticos. En ambos suele haber una mutación del gen “ras” y pérdida alelica de los cromosomas 5 y 18. Estas coincidencias llevaron a postular un modelo de tumorogénesis a Fearson y Vogelstein (**Fearson y Vogelstein 1990**), según el cual, el cáncer colorrectal se desarrollaría de una forma ordenada en varias etapas progresivas a través de una serie de cambios genéticos acumulados a lo largo del tiempo:

#### TEORÍA DE LAS ETAPAS MÚLTIPLES

NORMAL	→	HIPERPLASIA	→	ADENOMA	→	CÁNCER
APC MMR <u>GENES</u>		APC MMR <u>GENES</u>		K-ras DCC P53 <u>GENES</u>		
CROMOSOMA GEN ALTERADO PROCESO		5q APC Epitelio Proliferativo.		12p/8q K-ras/myc Adenoma Intermedio.	18q DCC Adenoma	17p p53 Carcinoma 17q mm23 Metástasis

Según este modelo, se producen cambios genéticos en la mucosa colorrectal que dan como resultado sucesivamente que esta mucosa pase a hiperplasia, adenoma, cáncer in situ y finalmente cáncer invasor. Para sufrir una transformación maligna completa, una célula acumula una combinación de defectos genéticos que incluyen activación de oncogenes e inactivación de genes supresores del tumor (**Fearon EA 1990**).

A pesar de que en realidad, la progresión de hechos debe ser menos lineal y temporal de lo que sugiere este esquema simplificado, el modelo ha proporcionado la base para comprender la interacción entre predisposición genética y factores ambientales, tal como se perfila en revisiones contemporáneas (**Midgley R 1999, Potter JD 1999**).

Se sabe que en la fase inicial (fase de promoción) tienen lugar mutaciones continuadas, proliferación celular incontrolada y expansión clonal. Progresión implica células alteradas genotípicamente que desarrollan los cambios histológicos asociados con el CCR.

Actualmente se admite que mutaciones múltiples secuenciales en genes esenciales para el control de la señal celular de transducción, transcripción, y de este modo proliferación y apoptosis, son importantes a lo largo de toda la carcinogenesis (**Loeb L 1998**).

Además, existe la hipótesis que considera la aparición de células tumorales con un fenotipo bioquímico diferente, alta malignidad y poder metastásico, dentro del tumor primitivo y en su progresión a fases avanzadas (**Fidler IJ 1977**).

### **Oncogenes relacionados con el cáncer colorrectal:**

Considerando al cáncer como una transformación del crecimiento y división anormal de la célula, éste puede producirse bien por estímulo: oncogen activado, o bien por fallo en los factores frenadores: gen supresor inactivado. En ambos casos el resultado es el cáncer. Diversos genes se han relacionado con el cáncer colorrectal.

Dentro de los *oncogenes supresores* distinguimos:

- **APC:** este es un gen supresor localizado en la banda q21-22 del cromosoma 5, cuya mutación daría origen al fenómeno carcinogénico ligado a la poliposis adenomatosa familiar (FAP). En el 100% de los casos de CCR detectados como consecuencia de PAF se observan mutaciones en el gen APC (**Gryfe R 1997**). Las mutaciones de este gen se pueden detectar en el 80% de los pacientes afectos de FAP y en el 60% de los cánceres esporádicos colorrectales.
- **MCC:** El gen MCC fué considerado inicialmente el responsable de la FAP. Se halla también en el cromosoma 5 (5q21) y se han observado mutaciones en el



15% de los cánceres esporádicos de colon y recto. Es posible que las mutaciones de los genes APC Y MCC actúen conjuntamente en la carcinogénesis por vía común.

- P53: Es un gen supresor localizado en las bandas p12 y p13 del brazo corto del cromosoma 17 y codifica un factor de transcripción-proteína-de 53 Kd (**Kim HW 1998, Merino JJ 1998**). El aumento de expresión de p53 activa a otros genes con funciones dispares (**Boland CR 1996, Scherer SJ 1996, Fornasaring M 2000, Buermeyer AB 1999**). Este gen se halla mutado en el 60% de todos los cánceres humanos entre ellos el de colon y recto en el que se ha comprobado que la mutación confiere mayor agresividad al tumor.
- NM23: Es un gen supresor de metástasis también identificado en el cromosoma 17 (17q, 21). Su mutación confiere a los tumores una mayor capacidad metastásica.
- DCC: Se localiza en el cromosoma 18 (18q) y se identifican mutaciones en el 70% de los carcinomas del colon y recto.

#### Oncogenes activadores:

- ONCOGEN CK-RAS: El gen K-ras se encuentra en el cromosoma 12p. Las mutaciones de punto sobre los codones 12, 13 y 61 son las más frecuentes. Estas mutaciones puntiformes se han hallado en el 37%-60% de los cánceres de colon y recto y aparecen precozmente en el proceso de carcinogénesis, estando presentes en el 9% de los adenomas menores de 1cm. y en el 41% cuando son mayores de 1cm. Su frecuencia es similar en los pólipos y cánceres correspondientes a la FAP que en los esporádicos. La presencia de mutaciones del K-ras confiere un peor pronóstico a los pacientes.

- C-MYC: La amplificación del oncogén c-myc se observa también en más del 60% de los pólipos adenomatosos. La amplificación del c-myc es más frecuente en los cánceres del colon izquierdo que en los del derecho (81% frente a 36%).

### 1.3.-HISTOLOGÍA DEL INTESTINO GRUESO.

Distinguimos: mucosa (lamina propia, muscular de la mucosa), submucosa, muscular, serosa.

#### Mucosa

El epitelio del intestino grueso está especializado en la secreción de moco y en la absorción de sales y agua. El componente epitelial de la mucosa del intestino grueso forma estructuras tubulares rectas o escasamente ramificadas compuestas por una mezcla de células absortivas y células mucosas. Estas se disponen formando las criptas o glándulas de Lieberkuhn. Se diferencian de las glándulas del intestino delgado por la ausencia de células de Paneth y mayor abundancia de células caliciformes o mucosas. También hay células neuroendocrinas en pequeño número. Aunque las células caliciformes son su elemento más llamativo, la mayoría de las células de las porciones media y superior de las criptas son células cilíndricas con función absortiva de agua y sales, las cuales representan también el tipo celular del epitelio de la superficie de la mucosa. El epitelio se está renovando continuamente. Las células indiferenciadas de la profundidad de las criptas o células madre se dividen continuamente y su descendencia se diferencia a células cilíndricas, caliciformes y neuroendocrinas, que lentamente se mueven hacia arriba por la cripta, hasta la superficie.

La vida media de la mayor parte de estas células es de unos seis días; pero parece que

las células endocrinas son una excepción, pues tienen una vida que se mide en semanas más que en días.

Los fibroblastos subepiteliales que rodean a las criptas intestinales proliferan en la base y migran hacia arriba con los elementos epiteliales.

### **Lámina propia:**

Esta formada por colágena, reticulina y fibroblastos incluidos en una matriz de glucosaminoglicanos. Inmediatamente por debajo de la membrana basal del epitelio superficial existe una capa de colágena compacta.

Entre las células de la lámina propia destacan células plasmáticas, linfocitos T y eosinófilos diseminados. El tejido linfoide también se dispone formando pequeños acúmulos linfoides (parte del GALT), de los cuales algunos de mayor tamaño atraviesan la muscular de la mucosa extendiéndose a la submucosa. Abundan células con gránulos PAS-positivo conocidas como mucífagos, especialmente en el recto.

### **Muscularis mucosae:**

Formada por dos capas de músculo liso, una capa circular interna y otra longitudinal externa, pero esta distinción habitualmente solo es nítida cuando las capas musculares están anormalmente engrosadas. Existen también fibras elásticas.

En la muscular de la mucosa penetran finas ramas nerviosas del plexo submucoso, que luego se prolongan verticalmente por la lámina propia.

**Submucosa:**

Separa la muscularis mucosae de la muscular. Está compuesta por fibras colágenas y de reticulina, tejido elástico, vasos sanguíneos y linfáticos, vías nerviosas no mielinizadas y las células del plexo submucoso de Meissner. Existe asimismo un rico plexo venoso. Contiene también grupos ocasionales de células adiposas.

**Muscular:**

La muscular del intestino grueso difiere en su organización de la del intestino delgado. En lugar de formar una capa continua de grosor uniforme, las fibras longitudinales están agrupadas en tres bandas longitudinales equidistantes, llamadas las tenias del colon. Entre las tenias, las fibras musculares longitudinales forman una capa extraordinariamente fina y, con frecuencia, discontinua. La capa circular interna de la muscular es semejante a la del intestino delgado. Las tenias están en un estado de contracción parcial lo cual es causa de que las porciones interpuestas de la pared hagan saliente hacia afuera y constituyan unas saculaciones llamadas haustras. Las haustras son muy patentes en el colon ascendente, transversal, descendente, y también en la flexura sigmoidea.

**Serosa:**

Recubre todo el colon excepto los tramos que se fijan a la pared abdominal posterior y el tercio inferior del recto que es subperitoneal.

Es la capa más externa de la pared intestinal; está constituida por una lámina continua de células epiteliales planas, el mesotelio, separada de la muscular subyacente por una capa muy fina de tejido conjuntivo laxo.

La serosa del colon tiene de particular la presencia de acúmulos locales de células adiposas situadas por debajo del mesotelio que forman unas protuberancias colgantes llamadas apéndices epiploicos.

#### 1.4.-ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CÁNCER DE COLON.

##### 1.4.1.-Apariencia macroscópica:

Las características macroscópicas de los tumores dependen de la fase en la historia natural del tumor en que éste sea diagnosticado.

Los carcinomas pueden ser:

- **Exofíticos-fungoides:** con un predominante crecimiento intraluminal.
- **Endofíticos-ulcerativos:** con crecimiento intramural predominante.
- **Difusamente infiltrativos-linitis plástica:** con un sutil crecimiento endofítico y anular, afectando circunferencialmente la pared del colon-recto, pudiendo provocar así estrechamiento de su luz.

Alrededor de dos tercios de todos los tumores son ulcerativos y un tercio son exofíticos (**American Joint Committee on cáncer 1983**). Los tumores de colon derecho más frecuentemente son exofíticos; los del lado izquierdo suelen tener un crecimiento intramural y circunferencial dando la imagen típica en “servilletero” o “corazón de manzana” en el enema de bario. En este tipo de crecimiento se afectan con mayor frecuencia los linfáticos distribuidos alrededor del tubo digestivo.

### **1.4.2.-Tipos histológicos:**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los tumores primarios malignos del colon se clasifican en:

- Tumores epiteliales.
- Tumores no epiteliales.
- Tumores secundarios.

#### **• Tumores epiteliales:**

-El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente de los cánceres del intestino grueso suponiendo el 90%-95% de todos los tumores del mismo (**Hermanek P 1982, Spjut HJ 1984**).

La característica definitoria del adenocarcinoma colorrectal es la invasión de la submucosa a través de la muscularis mucosae. Lesiones con morfología característica de adenocarcinoma que están confinadas al epitelio o invaden solo la lámina propia, no presentan virtualmente riesgo de metástasis.

-El adenocarcinoma coloide o mucinoso representa alrededor del 17% de los tumores del intestino grueso (**Minsky BD 1990**). Esta variante se caracteriza por presentar un “pool” de mucina extracelular que contiene epitelio maligno, con estructura acinar, cordones celulares o células aisladas. En este tipo histológico encontramos con mucha frecuencia inestabilidad de los microsatélites (MSI-H). Para definir una lesión como mucinosa o coloide debe estar compuesta por más del 50% de mucina extracelular. La presencia significativa (más del 25%) de carcinoma mucinoso en la biopsia preoperatoria se correlaciona con un estadio avanzado del tumor (**Younes M 1993**).

-Un subtipo raro es el carcinoma de células en anillo de sello (2%-4% de los carcinomas mucinosos) definido por la presencia de más del 50% de células tumorales con

prominente mucina intracitoplásmica. La típica célula en anillo de sello tiene una gran vacuola mucinosa, PAS positiva, que llena el citoplasma y desplaza el núcleo hacia un lado. También podemos ver células en anillo de sello en los adenocarcinomas mucinosos y en los procesos difusamente infiltrativos con mínima mucina extracelular. Algunos carcinomas con MSI-H son de este tipo.

Entre otras variantes muy infrecuentes de tumores epiteliales se incluyen los carcinomas de células escamosas y los carcinomas adenoescamosos, a veces llamados adenoacantomas. El carcinoma de células escamosas se asocia a peor pronóstico que el adenocarcinoma (Cagiri B 1999) y el carcinoma medular.

Finalmente, se encuentran los carcinomas indiferenciados, que carecen de cualquier evidencia morfológica de diferenciación y tienen variables características morfológicas. A pesar de su indiferenciada apariencia, estos tumores son genéticamente inequívocos y típicamente asociados con alta inestabilidad de los microsatélites (MSI-H) (Tortola S 1999).

● **Tumores no epiteliales:**

-Lipoma.

-Leiomioma.

-Tumores estromales gastrointestinales.

-Leiomiosarcoma.

-Angiosarcoma.

-Sarcoma de Kaposi.

-Melanoma maligno.

-Linfomas malignos.

### **1.4.3.- Grado histológico:**

**Broders** fue un pionero en la clasificación de los adenocarcinomas por su grado de diferenciación histológico (**Broders AC 1925**). Estableció cuatro grados, basados en el porcentaje de células tumorales diferenciadas.

**Dukes CE 1932** consideró la disposición celular más que el porcentaje de las células diferenciadas. La clasificación inicial de Dukes se ha desarrollado en un sistema de tres grados, siendo hoy día la más ampliamente usada (**Hermanek P 1982, Qizilbash AH 1982**). El grado 1 es el más diferenciado, con túbulos bien formados y con el menor pleomorfismo y mitosis nucleares. El grado 3 es el menos diferenciado, con solamente estructuras glandulares ocasionales, células pleomórficas y una alta incidencia de mitosis. El grado 2 es el intermedio entre los grados 1 y 3.

Cuando un carcinoma presenta heterogeneidad en su diferenciación el grado debe basarse en el componente menos diferenciado, no considerando el frente de invasión (**Purdie CA 2000**).

El porcentaje de estructuras glandulares características que presenta el tumor puede ser usado para definir el grado.

Los adenocarcinomas mucinosos y carcinoma en células de anillo de sello son considerados por convenio como PD (grado 3). Los carcinomas medulares con MSI-H se consideran indiferenciados (**Hamilton SR & Lauri AA WHO 2000**).

Otra clasificación para establecer el grado es la de **Jass y cols. (Jass JR 1986)**.



### 1.5.-CLASIFICACIÓN Y FACTORES PRONÓSTICO DEL CARCINOMA COLORRECTAL.

Se definen como factores pronóstico un conjunto de síntomas y signos que informan sobre el posible futuro de un enfermo en cuanto a la supervivencia global, respuesta terapéutica, intervalo libre de enfermedad o aparición de una complicación (**González 1994**). Dichos factores han sido empleados por la clasificación de Dukes y sus modificaciones y el sistema TNM para establecer grupos homogéneos de pacientes con un pronóstico similar que permita la aplicación de procedimientos terapéuticos lo más parecidos posibles (**Hermanek 1992, Henson 1997**).

En el cáncer colorrectal se consideran los siguientes factores pronóstico:

- 1°/Estadio tumoral.
- 2°/Características clínicas.
- 3°/Características anatómo-patológicas.
- 4°/Características biológicas adicionales.

#### **1.5.1.-Estadio tumoral: clasificación patológico-quirúrgica:**

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que el factor pronóstico independiente más importante para la supervivencia o la recurrencia después de una cirugía potencialmente curativa es el **estadio tumoral**. Éste se determina por la profundidad de penetración a través de la pared del intestino así como por la presencia y número de ganglios linfático positivos y la presencia o no de metástasis a distancia (**Minsky BD 1988, Krook JE 1991, Lindmark G 1994**).

La clasificación de Dukes y sistema TNM son los sistemas de estratificación más usados y recomendados. Ambos sistemas tienen una validez demostrada para predecir la

supervivencia, aunque la fiabilidad de predicción de muerte por cáncer colorrectal para ambos sistemas es sólo del 68%-71%.

### 1.5.1.1. -Clasificación de Dukes y sus modificaciones:

El primer sistema práctico de clasificación por estadios fue el de Dukes (**Dukes CE 1932**) que clasificaba los tumores rectales de la A a la C, indicando el estadio A penetración en la pared intestinal pero sin atravesarla, estadio B infiltración de toda la pared del intestino y el estadio C implicaba la afectación de ganglios linfático sin tener en cuenta la extensión de penetración en la pared. Esta clasificación ha sido posteriormente modificada por muchos autores entre los que se incluyen Dukes (**Gabriel WB1935**), definiendo de forma más precisa la invasión de la pared y las metástasis ganglionares, ampliándose para incluir colon y recto.

En 1935, el estadio C de Dukes fue subdividido en C1 (ganglios localmente positivos) y C2 (ganglios positivos en el lugar de la ligadura) (**Gabriel WB 1935**).

Kirklín y cols. dividieron el estadio A de Dukes en un nuevo estadio A (solamente mucosa y submucosa) y un estadio B1 (invasión de la muscular propia pero sin atravesarla) y cambio el estadio B de Dukes a B2 (**Kirklín JW 1949**).

En 1949 Dukes añadió un cuarto estadio, caracterizado por tumor más allá del límite de la resección quirúrgica (**Dukes CE 1949**). El cuarto fue formalmente definido como *estadio D* por Turnbull y cols. 1967 (**Turnbull RB 1967**).

La clasificación de Astler-Coller permitió la separación entre penetración de la pared y el estadio ganglionar (**Astler VB 1954**). La modificación Gunderson-Sosin de la clasificación de Astler-Coller subdividió los tumores T3 en aquellos con invasión microscópica (B2m o C2m) o macroscópico (B2m+g o C2m+g) a través de la pared del intestino (**Gunderson LL 1974**). En pacientes con cáncer de colon esta diferencia alcanzó significación estadística (**Minsky BD 1988**) y se ha confirmado de manera independiente por Newland y cols (**Newland RC 1987**).

### **1.5.1.2.-Clasificación TNM:**

El AJCC (**American Joint Committe on Cáncer 1983**) y el UICC (**International Unión Against Cáncer**) (**Harmer MH ed 1978**) propusieron una clasificación por estadios según el TNM.

Una revisión conjunta **AJCC/UICC** (1988/1994) de la clasificación TNM unificó ambas. La versión revisada es más simple y considera como factor pronóstico importante el número de ganglios positivos (**American Joint Committe on Cancer 1988**) (**Nathanson SD 1986**). Se consideró también la invasión mesotelial (**Newland RC 1987**).

Infiltración ganglionar: Las metástasis tanto en ganglios próximos al margen mesentérico, como a mayor distancia del tumor primario o en nódulos linfático retrógrados se han asociado a pobre pronóstico; mientras, el valor pronóstico de la identificación de micrometástasis en nódulos linfáticos por inmunohistoquímica o técnicas moleculares es aún controvertido (**Ratto C 1999, Oberg A 1998**).

El tamaño de los ganglios linfáticos no es un indicador fiable de la presencia de metástasis. Dependiendo del estudio, del 50% al 78% de los ganglios linfáticos positivos en muestras de cáncer rectal son menores de 5 mm. (**Herrera L 1992, Kotagi HF 1993**).

En un análisis de 193 muestras de cáncer colorrectal, Hernanz y Redondo encontraron que al menos 6 ganglios tenían que ser identificados como negativos por el patólogo antes de ser fidedignamente clasificado como N0 (**Hernanz FR 1994**).

El número de ganglios positivo es considerado como un factor pronóstico independiente según el análisis multivariante del Large Bowel Cáncer Project de Londres (**Phillips RKS 1984**) y en los estudios de Wiggers et al 1988. El número de ganglios positivos ha sido incluido en la clasificación del Gastrointestinal Tumor Study Group (**GITSG**) y en la clasificación TNM del American Joint Committe on Cáncer (**AJCC**) así como en la de la Unión Internacional Contra el Cáncer (**UICC**).

### **CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS DE CÁNCER COLORRECTAL AJCC/UICC 1987\***

#### **- TUMOR PRIMARIO**

**TX** Tumor primario no evaluable.

**T0** No hay evidencia de tumor en la pieza reseçada (previa polipectomía o fulguración).

**Tis** Carcinoma in situ (intraepitelial o intramucoso, sin extensión a través de la muscularis mucosae).

**T1** Invade submucosa.

**T2** Invade muscular propia.

**T3-4** Depende si serosa esta presente

- Serosa presente:

**T3** Invade a través de muscular propia en subserosa

Serosa (pero no a través)

Grasa pericólica dentro de hojas del mesenterio

**T4** Invade a través de serosa en cavidad peritoneal libre o a través de serosa en órgano contiguo.

- No serosa. (Dos tercios distales del recto, posterior izquierda o derecha del colon):

**T3** Invade a través de muscular propia

**T4** Invade otros órganos (vagina, próstata, uréter, riñón).

#### **- GANGLIOS LINFÁTICO REGIONALES**

**NX** Ganglios no pueden ser evaluados (p, ej., solamente escisión local)

**N0** No metástasis en ganglios linfáticos regionales

**N1** Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales

**N2** Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales

#### **- METÁSTASIS A DISTANCIA**

**MX** Presencia de metástasis a distancia no evaluable

**M0** No metástasis a distancia

**M1** Metástasis a distancia

### CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS SEGÚN TNM

<b>ESTADIO 0</b>	Tis N0 M0
<b>ESTADIO I</b>	T1 N0 M0 T2 N0 M0
<b>ESTADIO II</b>	T3 N0 M0 T4 N0 M0
<b>ESTADIO III</b>	Cualquier T N1 M0 Cualquier T N2 M0
<b>ESTADIO IV</b>	Cualquier T o N M1

### SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DUKES CORRELACIONADO CON TNM

<b>Dukes'A</b>	T1, N0, M0 T2, N0, M0
<b>Dukes'B</b>	T3, N0, M0 T4, N0, M0
<b>Dukes'C</b>	Cualquier T, N1, M0; cualquier T, N2, M0
<b>Dukes'C2</b>	Cualquier T, N3; M0
<b>Dukes'D</b>	Cualquier T, cualquier N, M1

### SISTEMA MODIFICADO ASTLER-COLLER CORRELACIONADO CON TNM

<b>MAC A</b>	T1, N0, M0
<b>MAC B1</b>	T2, N0, M0
<b>MAC B2</b>	T3, N0, M0 T4, N0, M0
<b>MAC B3</b>	T4, N0, M0
<b>MAC C1</b>	T2, N1, M0 T2, N2, M0
<b>MAC C2</b>	T3, N1, M0 T3, N2, M0 T4, N1, M0 T4, N2, M0
<b>MAC C3</b>	T4, N1, M0 T4, N2, M0

(Modificado de American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer, ed 3. Philadelphia:JB Lippincott, 1988 and Unión Internationale Contre le Cancer. TNM classification of malignant tumors, ed. 4. Geneva:UICC, 1987.)

### **1.5.2.-Variables pronósticas adicionales, características clínicas:**

- **Edad:** Los datos publicados son muy discordantes; clásicamente se ha considerado que el cáncer colorrectal tiene peor pronóstico en pacientes menores de 40 años (**Recio P y Bussey HJR 1965, Van Langenberg MJ 1972; Dukes CE 1958**). Sin embargo, cuando se ha analizado la supervivencia en función del estadio, en casi ninguna publicación se establecen diferencias pronósticas en función de la edad (**Umpleby HC 1984, Carlo Ratto MD 1998**).
- **Sexo:** Aunque algunos estudios encontraron una mejoría en la supervivencia para mujeres (**Chapuis PH 1985, De Mello J 1983**), la mayoría no han mostrado diferencia en el pronóstico según el sexo (**Hermanek P JR 1994, Deans GT 1994**).
- **Síntomas:** Varias publicaciones subrayan la mayor tasa de supervivencia en pacientes asintomáticos diagnosticados en “screening” de población comparados con aquellos diagnosticados con cáncer colorrectal sintomático (**Robinson MH 1995**). Sin embargo, ni la duración de los síntomas, ni el retraso en diagnóstico o tratamiento, han influido en la supervivencia en análisis multivariante.
- **Obstrucción y perforación:** En la mayoría de análisis uni o multivariantes, la obstrucción intestinal se encuentra como un factor pronóstico adverso. En el análisis multivariado realizado por Chapuis et al 1985, la obstrucción fue el único síntoma con valor pronóstico negativo para la supervivencia, independiente del estadio de Dukes. Para Ratto et al. 1998, la obstrucción fue el mejor predictor clínico reduciendo significativamente la supervivencia a largo plazo y siendo un factor pronóstico independiente.  
En el análisis realizado por el NSABP (**Wolmark N et al 1983**) y el GITSG (**Steinberg SM et al 1986**) encontraron que la obstrucción fue un importante factor pronóstico, independiente del estadio de Dukes y la perforación intestinal fue una variable con valor pronóstico solamente para la supervivencia libre de enfermedad.

- **Hemorragia o sangrado rectal:** La hemorragia o sangrado rectal ha sido asociada con un mejor pronóstico (**Steinberg SM et al 1986**); sin embargo, el significado pronóstico del sangrado desapareció en el análisis multivariable (**Chapuis PH et al 1985**).
- **Localización del tumor primario:** **Newland RC 1994** encontró que la localización colónica tenía mejor pronóstico que la rectal. Sin embargo, con respecto a los primarios de colon existen resultados contradictorios en torno a la peor supervivencia de los de colon derecho respecto al izquierdo (**Wolmark N 1983, De Mello J 1983**). Estudios más recientes en análisis multivariantes sugieren que no existen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia para las distintas localizaciones tumorales en el colon (**Hermanek P 1994, Deans GT 1994**).
- **Tamaño del tumor primario:** A diferencia de la mayoría de los tumores, el cáncer colorrectal es peculiar por no presentar una relación entre el tamaño del tumor y supervivencia. Este hallazgo ha sido confirmado en la mayoría de los análisis multivariantes (**Ratto et al 1998**).
- **Morfología del tumor primario:** Diversos autores encuentran que los pacientes con tumores exofíticos presentan una mejor supervivencia que los pacientes con tumores de crecimiento tanto intermedio como infiltrativo (**Wolmark N 1984, Steinberg SM 1986**). Sin embargo, este factor pierde su significación en análisis multivariantes y en sólo uno de siete análisis multivariantes la morfología del tumor se mantiene como variable pronóstica independiente.
- **Transfusión sanguínea:** No existe una clara asociación entre transfusión sanguínea perioperatorias e incremento de la tasa de recurrencia del cáncer colorrectal (**Heiss MM 1994, Sibbering DM 1994**).

### **1.5.3.-Características anatomopatológicas:**

- **Invasión de órganos adyacentes:** Los órganos o estructuras adyacentes están infiltrados en alrededor del 10% de los casos de cáncer colorrectal. Su significación pronóstica es contradictoria en los distintos estudios (**Nathanson y col 1985; Fielding LP 1986**).

- **Grado de diferenciación:** En varios análisis multivariados, el grado de diferenciación ha sido un factor pronóstico independiente para la supervivencia (**Steinberg SM 1986, Tang R 1995**).

Existe correlación entre el grado histológico y metástasis ganglionares linfáticas y a distancia en el momento de la cirugía (**Dukes CE 1940 y 1958, Gilbert SG 1978**).

El grado de diferenciación también se correlaciona con la probabilidad de diseminación venosa (**Herter FP 1980**), el riesgo de invasión linfática (**Herter FP 1980**), extensión de la diseminación local (**Dukes CE 1958**), número de metástasis linfáticas (**Minsky BD 1989**) y la invasión de la pared (**Cohen AM 1980**).

Sin embargo, en comparación al estadio tumoral, el grado de diferenciación no parece añadir ninguna ventaja en la predicción de la supervivencia.

- **Tipo histológico: cáncer coloide (mucinoso).** Tanto la variedad intracelular, más comúnmente conocida como carcinoma de células en anillo de sello, como la extracelular (cáncer coloide o mucinoso), se asocian a mal pronóstico (**Sasakis 1998, Thomás RM 1995**); aunque en algunos estudios, usando regresión múltiple, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto al pronóstico entre la variedad mucinosa y no mucinosa del adenocarcinoma (**Ratto et al 1998**).
- **Invasión vascular:** La invasión vascular presenta dos componentes distintos: invasión del vaso sanguíneo (BVI) e invasión del vaso linfático (LVI). El uso de tinciones de tejido elástico es importante para ayudar a identificar BVI. Si no se usan las tinciones



de tejido elástico, BVI será identificado correctamente en solamente el 16%-41% de los casos (**Minsky BD 1988, Inoue T 1992**).

*-Invasión de vasos sanguíneos:* Distinguimos como invasión de los vasos dentro de la pared intestinal BVI intramural y la invasión de los vasos sanguíneos fuera de la pared (grasa del pericolon o adventicia), BVI extramural. En general, BVI hace referencia a invasión venosa más que arterial. La incidencia de invasión arterial es menor al 1%.

Mediante análisis de riesgos proporcionales BVI no era un factor pronóstico independiente para la supervivencia (**Minsky y cols 1988**). Chapuis y cols, Krasna y cols e Inoue y cols para el cáncer colorrectal considerado globalmente, encontraron que la incidencia de BVI varía del 25% al 81%, se relaciona con el estadio y el grado (**Chapuis PH 1985, Inoue T 1992**) y es un factor pronóstico independiente para la supervivencia (**Chapuis y cols 1985**).

*-Invasión de vasos linfáticos:* La incidencia de LVI varía del 8% al 73% y se relaciona con el estadio y el grado de diferenciación. Todos los estudios muestran una supervivencia inferior para pacientes con tumores LVI positivos comparados con tumores LVI negativos, siendo un factor pronóstico independiente para la supervivencia (**Shirouzu y Morodomi 1995, Minsky BD 1989**).

- **Invasión perineural:** La incidencia de invasión perineural varía del 14% al 32% y se relaciona con el grado y el estadio de Dukes. Distintos estudios han comprobado unos mayores índices de recurrencia local, menor supervivencia a los 5 años (**Krasna MJ 1988**) y a los 8 años (**Shirouzu K 1993**) en pacientes con invasión perineural frente a aquellos sin invasión perineural.

Bognel C 1995 en 339 pacientes con cáncer rectal encontró que la invasión neural era un factor pronóstico independiente para la supervivencia.

- **Inmunorrespuesta al tumor primario:**

*-Respuesta inflamatoria:* La presencia de un intenso infiltrado inflamatorio con leucocitos polimorfonucleares, sobre todo eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas, mastocitos e histiocitos, así como también una intensa *reacción desmoplásica* han

sido asociados a mejor pronóstico (**Nielsen HJ 1999**)

-Ganglios linfático reactivos: Un grupo de investigadores han mostrado que la aparente respuesta inmunológica en ganglios linfáticos regionales se correlaciona con una mejor supervivencia (**Patt DJ 1975**). En el cáncer de colon sigmoides, Patt y cols. determinaron que la histiocitosis sinusoidal y actividad inmunoblástica paracortical se correlacionaban individualmente con un incremento en la supervivencia. Si ambas características estaban presentes la supervivencia era incluso mejor.

Pihl y cols. 1977, observaron que la hiperplasia paracortical de los ganglios linfáticos ocupando más del 15% de la sección ganglionar estaba asociada favorablemente con la supervivencia.

- **Antígeno carcinoembrionario:** No está claro que el valor del CEA preoperatorio sea factor pronóstico independiente. La mayoría de los estudios en los que se ha realizado un análisis multiparamétrico de los niveles preoperatorios de CEA, encuentran que no es una variable pronóstica independiente. En general, los niveles de CEA reflejan la carga tumoral y hoy día los oncólogos están de acuerdo en usar los niveles preoperatorios de CEA como referencia para el seguimiento.
- **Colágeno:** El colágeno intestinal es un componente mayor de la matriz del tumor. Offerhaus y col 1991 encontraron en análisis univariados que la expresión de colágeno tipo IV estaba asociada a mejor pronóstico en pacientes con cáncer. Esto no se confirmó en análisis multivariados. En el cáncer colorrectal N positivo, los pacientes con escasos depósitos de colágeno tipo IV en la membrana basal presentan una supervivencia inferior que los que presentan un depósito moderado a elevado (**Havenith MG 1988**).
- **Morfología nuclear:** Varios investigadores han utilizado medidas morfométricas para determinar si las diferencias en el tamaño y forma nuclear se correlacionan con la supervivencia en el cáncer colorrectal. Los resultados son controvertidos (**Mitmaker y cols. 1991, Heimann y cols. 1991**). Un análisis de regresión lineal mostró una relación lineal significativa entre el área media nuclear y el número de ganglios

positivos en el cáncer colorrectal, aunque no hubo correlación con la supervivencia (Ambros RA 1990).

- **Parámetros de ciclo celular y ploidia (contenido ADN):** En el cáncer colorrectal se pierde el carácter diploide de las células a medida que progresan de premalignas a malignas (Hiddemann W 1986). Los tumores aneuploides tienden a tener una tasa de crecimiento superior y un pronóstico menos favorable que los tumores diploides. Los tumores aneuploides están a menudo asociados con otros factores anatomopatológicos de mal pronóstico (Crissman JD 1989).

Como con otros factores pronóstico del cáncer colorrectal, la influencia del contenido de ADN en los patrones de recaída y supervivencia varía enormemente. La mayoría de los estudios refieren que la aneuploidia es un factor de mal pronóstico para la supervivencia (Armitage NC 1990, Magnuson I 1991) mientras que otros constatan una pequeña diferencia o ninguna (Schillaci A 1990, Fisher ER 1991). En análisis multivariados, algunos estudios muestran que el contenido de ADN es un factor pronóstico independiente (Tomoda H 1993).

Las diferencias en la técnica utilizada para el análisis del contenido del ADN pueden explicar las controversias en los resultados (Deans GT 1994).

Un estudio de Tomoda H 1993 sugiere que es el índice del ADN, más que la ploidia, el que suministra la información de pronóstico más útil. El índice de ADN está siendo utilizado como determinante de pacientes de alto riesgo con ganglios negativos.

#### **1.5.4.-Características biológicas adicionales del tumor:**

**Oncogenes y marcadores moleculares:** Algunas de las alteraciones genéticas identificadas en el cáncer colorrectal son marcadores pronóstico (Chung DC 1998, Mc Leod HL1999). La pérdida alélica del cromosoma 18q se ha visto es un indicador pronóstico adverso. Otros estudios han publicado que la pérdida de cromosomas 17p, 1p, 8p o 18q, la disminución de la expresión del DCC, la sobreexpresión p53, la disminución en la expresión

p27kipl, alta expresión de ciclina A, mutación del gen ras, expresión de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular y sus inhibidores (cathepsina-L, urokinasa, activador tisular del plasminógeno, inhibidores tisulares de metaloproteinas), expresión de genes implicados en la apoptosis (bcl2, bax, survivin), expresión de moléculas de adhesión (CD34 y sus variantes ICAM 1, galactin 3) y enzimas metabólicas (Glut1, glucose transporter, manganesio superóxido dismutasa, timidilato sintetasa, ornitina descarboxilasa, ciclooxigenasa 2) tienen valor pronóstico.

Además, en los cánceres colorrectales que manifiestan MSI-H, se ha visto tienen con menor frecuencia metástasis y mejor pronóstico cuando los comparamos con microsatélites estables.

#### 1.6.- REACCIÓN DESMOPLÁSICA.

El huésped manda diversas respuestas frente a la neoplasia (**Seemayer TA et al. 1979, H Nakayama et al. 1998**):

- Infiltración de células linforreticulares dentro de los tumores sólidos.
- La neovascularización tumoral.
- La derivada de la presencia de células estromales de origen mesenquimal: reacción estromal miofibroblástica o respuesta desmoplásica.

**Reacción Desmoplásica** o proceso de remodelación, **se refiere** tanto a la producción como a la degradación de la matriz extracelular (**Ohtani H 1998**). Las células cancerosas no sólo destruyen la matriz extracelular pre-existente (mediante diversas enzimas proteolíticas),

sino que también la invasión cancerosa por sí induce nueva formación de matriz por las células estromales (**Clarke R 1992, Ohtani H 1998, Liotta LA 1982**).

La **formación** del estroma tumoral resulta de la interacción de las células tumorales y sus productos con el huésped y ciertos de sus sistemas normales de defensa, particularmente el sistema de coagulación y fibrinólisis (**Nagy JA et al. 1989, Dvorak HF 1992, Mueller BM 1998, Palumbo et al. 2000**); recordando en muchos aspectos al proceso de cicatrización de las heridas (**Dvorak HF et al 1986**); sin embargo difiere de él, en los mecanismos de su iniciación, en la aparente ausencia del papel de las plaquetas, así como en la magnitud y persistencia de la hiperpermeabilidad vascular y del “turnover” de fibrina (**Brown LF et al 1998**).

Diversos estudios resaltan la importancia de la activación de la cascada de la coagulación y fibrinólisis realizada por las células tumorales tanto en la formación del estroma tumoral, neovascularización, como en el crecimiento tumoral, y promoción de metástasis hematológica (**Palumbo JS 2000**). Los estudios de Dvorak HF et al 1987, implican al fibrinógeno y proteínas relacionadas en la patogénesis de la angiogénesis. También se ha visto, que los productos de degradación del fibrinógeno (FDPs) juegan un importante papel quimiotáctico e inmunomodulador, además de angiogénico (**Palumbo JS 2000**).

La reacción desmoplásica es un distintivo de los adenocarcinomas colorrectales, y contiene diversas cantidades de colágeno (tipo I, III y V), condroitin sulfato, proteoglicanos, ácido hialurónico, fibronectina y tenascin-C (**Hauptmann S et al. 2003**).

El colágeno es el mayor componente de la matriz extracelular intersticial (MEC), sobre todo, el colágeno I y III. Es bien conocido que la matriz extracelular juega un importante papel en numerosos procesos como: el mantenimiento de la forma celular, proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, y carcinogénesis.

Se ha sugerido que algunos genes son importantes en la tumorigénesis a través de la modulación de la respuesta en las células estromales. Fisher observó que la carcinogénesis colorrectal está asociada a la expresión estromal de los genes COL11A1 y COL5A2, los cuales no se expresan en el colon normal (**Fisher et al 2001**).

Aunque estudios iniciales en 1950 propusieron que la desmoplasia representaba la condensación del colágeno preexistente (**Jackson JR et al 1957**), actualmente existe suficiente evidencia de que el colágeno es sintetizado por los miofibroblastos presentes en el intersticio (**Lagacé R et al 1985, Hauptmann S et al 2003**). En el carcinoma colorrectal, se dice que las células estromales alfa actina-músculo liso positivo(A-SMA), situadas próximas al tumor, son miofibroblastos transformados que se originan de los fibroblastos colónicos pericrypticos, que pertenecen a un especializado subtipo de células mesenquimales, que exhiben características morfológicas de diferenciación muscular lisa asociadas con sus propiedades migratorias y proliferativas (**Kaye GI et al 1968**). Por otra parte, Ban S et al 2000, realizaron un estudio sobre los cambios fenotípicos de la muscular mucosa en el adenocarcinoma colorrectal invasivo precoz, sugiriéndoles sus resultados que las células musculares lisas de la muscular mucosae cambian su fenotipo para llegar a ser células de huso eosinofílico, denominadas miofibroblastos, en las áreas de invasividad precoz del adenocarcinoma colorrectal.

Se han propuesto diversas **vías implicadas en la activación de los miofibroblastos y síntesis de colágeno**; desde mecanismos inmunocitoquímicos e injuria microvascular, con características análogas a la cicatrización de las heridas; son los miofibroblastos el tipo celular predominante en el proceso de reparación de las mismas, encontrándose en gran número en el tejido de granulación (**Dvorak HF et al. 1981, 1986; Nagy JA et al. 1989; Senger DR et al. 1995, Van de Berg JS et al. 1984**); a la activación paracrina de las mismas por factores de crecimiento liberados por las células tumorales (**Walker RM A 2001**). Muchos de dichos factores son los mismos que promueven también la angiogénesis; se ha identificado entre ellos al factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF-alfa y TGF-beta), factor de crecimiento insulina like (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al FGF-2 y al VPF/VEGF (**Horgan K et al 1987, Ronnov-Jessin L et al 1993, Ellis MJC et al 1994, Bronzert87, Hauptmann S et al 2003, Shao ZM et al 2000**).

El PDGF está producido por una amplia variedad de células tumorales y células normales, tales como macrófagos, células estromales y células de la glia; su expresión en las células tumorales es modulada por el microambiente tumoral p.ej hipoxia. Comparado con

VEGF y bFGF es el mitógeno menos potente sobre las células endoteliales, pero también estimula la quimiotaxis migratoria de dichas células. Es idéntico a la timidina fosforilasa, siendo el efecto de dicha enzima indispensable para su efecto angiogénico (**Ronnie Tung-Ping Poon et al 2001**). Es considerado por Shao et al 2000, el primer iniciador de la respuesta desmoplásica; actúa ejerciendo un efecto mitógeno sobre las células fibroblásticas a través de IGF-I, puesto que el PDGF estimula la producción de IGF-I en dichas células, siendo su efecto mediado específicamente a través de los receptores tipo I-IGF en miofibroblastos y células cancerosas humanas (**Clarke R et al. 1992, Byrne K.J.O et al 2000**). La acción mitógena del PDGF sobre las células tumorales es sinérgica a la inducción de secreción de IGF-I para estimular la proliferación estromal de fibroblastos. Las IGFs (IGF estromales), son esenciales para regular la salida de las células fibroblásticas de la fase G1 del ciclo celular (**Clarke 1992**), así como para el mantenimiento de la morfología de los miofibroblastos y producción de colágeno por los fibroblastos (**Clarke 1992**). Por otra parte, el PDGF también puede contribuir al proceso metastásico ya que tras estimulación con PDGF, algunas células fibroblásticas “in vitro” secretan elevados niveles de actividad colagenolítica que aumenta la posibilidad de las células tumorales de invadir a través de la matriz desmoplásica (**Bauer EA et al 1985**).

También es evidente el papel de TGF-B1 en el depósito estromal ya que estimula la síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos (**Hauptmann S et al 2003**), y se ha encontrado una significativa correlación entre su presencia y el depósito estromal de fibronectina y tenascín (**Walker RA et al 2001**).

Tanto el TGFbeta-1 como el FGF-2, estimulan la síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos; sin embargo, la diferenciación de los miofibroblastos se estimula por el TGFbeta1, pero se suprime por el FGF-2 (**Hauptmann S et al 2003**).

El factor de permeabilidad vascular (VPF/VEGF), aunque producido sobre todo por las células tumorales, también puede ser producido por los linfocitos y macrófagos que infiltran los tumores así como por otras células sanguíneas, tales como neutrófilos y plaquetas (**Poon R.T-P et al 2001**); es una citoquina multifuncional que actúa directamente en las células

endoteliales (ECS) a través de dos receptores de alta afinidad (Flt-1 (VEGFR-1) y KDR (VEGFR-2)), ambos tirosin-kinasas, activando a la fosforilasa C e induciendo un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular de forma pasajera. El VPF/VEGF tiene al menos dos importantes papeles en la biología tumoral: por un lado potencialmente la permeabilidad microvascular de proteínas plasmáticas; así modifica la matriz extracelular tumoral y promueve el crecimiento de fibroblastos y nuevos vasos (**Dvorak HF et al 1992**); y por otro lado, es un selectivo mitógeno de células endoteliales. Este factor está también implicado en otros diversos procesos no tumorales con una patogénesis análoga a la de la generación del estroma tumoral, incluyendo cicatrización de las heridas, artritis reumatoide y síndrome de neovascularización intraocular entre otros (**Senger DR et al. 1995, Ferrara N et al. 2001**)

*La importancia biológica de la reacción desmoplásica sigue siendo objeto de discusión* (**Hauptmann S et al 2003**); su papel en la progresión del cáncer es aún incierto, y podría variar dependiendo tanto de la naturaleza de la misma, predominantemente celular (fibroblastos/miofibroblastos) con poco tejido colágeno, o con predominio del depósito de colágeno con aparentemente pocas células estromales (**Walker 2001**), como del grado de maduración (**Ueno 2004**) y de la composición y concentración de sus moléculas. Los resultados de la investigación in vitro de Hauptmann S et al. 2003 sobre el papel de los distintos tipos de colágeno (I, III y V), fibronectina, y las dos variantes de tenascín en la adhesión y migración de la línea celular HRT-18 del carcinoma colorrectal, indican que estas ampliamente dependen tanto de la composición como de la concentración de las moléculas de la ECM.

Anteriormente se la había considerado como una barrera, como un obstáculo para la invasión de las células tumorales. En el cáncer de colon Nielsen HJ et al. encontraron que una intensa reacción desmoplásica estaba asociada a mejor pronóstico (**Nielsen HJ 1999**). Offerhaus y col 1991 observaron en el análisis univariante que la expresión de colágeno tipo IV estaba asociada a mejor pronóstico en pacientes con cáncer de colon; pero no fué confirmado en el análisis multivariantes. Havenith et al vieron en pacientes con cáncer colorrectal con afectación ganglionar que los casos con escasos depósitos de colágeno IV en la membrana basal presentaban una supervivencia inferior a aquellos con un depósito moderado a elevado (**Havenith MG 1988**).



En el cáncer de mama, Christensen L 1988, encontraron que los tumores que exhiben niveles significativos de fibronectina inmunorreactiva, lo cual es normalmente indicativo de una intensa reacción desmoplásica, son pobremente metastásicos.

Sin embargo, la MEC también puede servir de sustrato migratorio para las células tumorales, proporcionando una ventaja para la invasión tumoral (**Palumbo JS et al 2000**).

Los **miofibroblastos**, que son las células fundamentalmente implicadas en la respuesta desmoplásica, por un lado sintetizando proteínas estromales tales como fibronectina, tenascín y colágeno 1 y 3, y por otro, también poseen la capacidad de sintetizar a las metaloproteinasas capaces de degradar todos los componentes de la matriz, estando implicadas pues en el proceso de remodelación de la misma (**Walker 2001, Vihinen P et al 2002**). Estas células también sintetizan factores de crecimiento con actividad angiogénica y mitógena sobre las células tumorales ayudando así a la invasión y subsiguiente crecimiento de células cancerosas promoviendo el fenómeno metastásico.

Por otra parte, el componente colágeno de la matriz extracelular influye en la respuesta linforreticular, ya que es esencial para la migración linfocitaria, reconocimiento, activación y diferenciación (**Shimizu Y et al 1991**). Así pues, la inhibición del depósito de colágeno puede también reducir la respuesta inmune frente a la neoplasia.

*El papel de los miofibroblastos en el crecimiento e invasión tumoral parece incluir no solo funciones inhibitorias sino que también promotoras del avance tumoral.*

Nakayama H et al 1998, estudiaron la relación existente entre el número de miofibroblastos en las distintas capas de la pared del colon y su relación con la capacidad invasiva; observaron que un descenso en el número de miofibroblastos está asociado con una insuficiente protección frente al crecimiento invasivo de los carcinomas colorrectales, jugando así los miofibroblastos un importante papel en la protección frente a la diseminación tumoral. Pero por otra parte, los miofibroblastos en el borde tumoral también promueven el crecimiento invasivo de los carcinomas a través de la secreción de factores de crecimiento paracrinos frente a las células del carcinoma y de diversas enzimas que degradan la matriz.

Las enzimas proteolíticas producidas tanto por las células tumorales como por las células del estroma (células endoteliales, macrófagos, miofibroblastos), facilitan así la

invasión tumoral, las metástasis y la angiogénesis (**Gottesman M 1990, Liotta LA 1991**). Dentro de este extenso grupo, las metaloproteasas que más se han relacionado con los procesos de invasividad tumoral y metástasis son aquellas que degradan específicamente el colágeno tipo IV: gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), estromelisinina 1 (MMP-3) y estromelisinina 2 (MMP-10).

Dado que el colágeno IV es el mayor constituyente de las membranas basales (MB) y la pérdida de la MB en el cáncer colorrectal se ha correlacionado con una incrementada probabilidad de metástasis a distancia y pobre pronóstico (**Forster SJ 1986**), la expresión de colagenasas tipo IV (MMP-2 y MMP-9) presenta gran interés. Diversos estudios relacionan la expresión de MMP-9 con el fenotipo metastásico (**Bernhard EJ 1994**). Números estudios han demostrado la localización predominante de MMP-9 y MMP-2 en la interfase tumor- estroma, tanto en los tumores colorrectales primarios como en las metástasis hepáticas (**Parsons SL 1997, Zeng ZS 1995**).

Mediante técnicas de hibridación “in situ” e inmunohistoquímica se ha demostrado la producción mayoritaria de MMP-9 por las células estromales peritumorales (fibroblastos y macrófagos) in vivo. Las células tumorales actuarían induciendo la producción de MMP-9, probablemente por la acción de factores paracrinos, aunque estos mecanismos están aun bajo investigación (**Mc Donnell S 1999, Zeng ZS 1998, Swallow CJ 1996**). Estos datos sugieren que MMP-9 desempeña un papel importante en la capacidad metastásica del carcinoma colorrectal.

Morikawa K et al 1988 observaron una estrecha correlación entre la actividad de la colagenasa tipo IV de las células del cáncer de colon en humanos (CCH) y la formación de metástasis en el hígado.

KimTS 1999 encuentra una correlación positiva entre MMP-9 y MMP-2 y angiogénesis en el cáncer colorectal, siendo las metaloproteasas marcadores de agresividad local frente a la angiogénesis, predictora de enfermedad metastásica.

Independientemente del origen celular de la producción de las MMP en el marco tumoral, estudios recientes han demostrado una asociación significativa entre una expresión tumoral aumentada de diferentes metaloproteinasas y un peor pronóstico de los pacientes

afectos de diferentes tumores, en términos de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia total. Así se ha descrito, que la expresión tumoral de estromalisina-3 está asociada a un peor pronóstico en el cáncer de mama (**Linder C 1997, Ahmad A 1998**) y de colon (**Porte H 1995**); la colagenasa intersticial en el cáncer colorrectal (**Murray GI 1996**), esofágico (**Murray GI 1998**) y en condrosarcomas (**Kawashima A 1997**); la gelatinasa B en el cáncer colorrectal (**Zeng ZS 1996**); la gelatinasa A en el cáncer gástrico (**Allgayer H 1998**), de ovario (**Garzetti GG 1995**), de mama (**Talvensaari Mattila A 1998**) y de vejiga urinaria (**Kanayama H 1997**); y la colagenasa-3 en el cáncer de mama (**Lamelas ML 1998**).

#### 1.7.-ANGIOGÉNESIS: GENERALIDADES Y DEFINICION.

La angiogénesis es el proceso caracterizado por la formación de nuevos vasos sanguíneos (capilares y vénulas) desde otros microvasos previos (**Folkman J 1971, Folkman J 1990, Liotta LA 1991**). Histológicamente es definido como un mecanismo de neovascularización, por el nacimiento de nuevos capilares, desde vasos preexistentes.

En circunstancias fisiológicas, estas situaciones son paralelas a la reducción de la respuesta inmune mediada por células (CMI) y a la sobrerregulación de la respuesta inmune humoral (HI) (**Piccinni M-P 1998, Schaffer M 1998**), sugiriendo una estrecha interrelación entre el sistema inmune y el proceso angiogénico en dichas condiciones.

La angiogénesis juega un papel central en multitud de procesos, fisiológicos y patológicos, durante la vida tanto pre como postnatal, incluyendo: la ovulación, la implantación del óvulo fecundado, crecimiento fetal y gestación, la inflamación y la cicatrización de las heridas tras cirugía y trauma (**Folkman 1995**), así como en el desarrollo de neovasos colaterales en casos de isquemia, por ejemplo en la isquemia cardíaca (**Sasayama S et al 1992**).

Esta se lleva a cabo, local y sólo transitoriamente, a través de la acción de un estrecho balance entre estimuladores e inhibidores angiogénicos (**Arenberg DA 1999**).

La alteración del proceso angiogénico se ve en muchas circunstancias patológicas (p, ej retinopatía diabética, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoidea, psoriasis, etc) de las cuales el cáncer ha sido el foco de mayor interés en los últimos años.

Debemos distinguir entre angiogénesis o neovascularización, y vasculogénesis **(Dermir R, 1989):**

- La vasculogénesis es el proceso por el cual se produce el desarrollo de capilares mediante la diferenciación de células endoteliales in situ, durante la vida embrionaria. Las nuevas luces formadas pronto coalescen, agregándose células musculares lisas y pericitos.
- La angiogénesis, o neovascularización, es un proceso que consiste en la formación y crecimiento de vasos sanguíneos a partir de otros previos.

### **1.7.1.-Proceso angiogénico:**

El complejo proceso angiogénico, quiescente en la vida adulta, puede desarrollarse rápidamente, de forma escalonada, en diversas circunstancias, siguiendo básicamente las siguientes etapas **(Blood et al, 1990, Diaz Flores et al. 1994):**

1. Activación de células endoteliales y pericitos.
2. Degradación de la lámina basal.
3. Migración y proliferación de células endoteliales.
4. Formación de una nueva luz capilar.
5. Proliferación de pericitos alrededor de los nuevos capilares.
6. Desarrollo de una nueva lámina basal.
7. Formación de plexos vasculares.
8. Persistencia, involución y diferenciación de los nuevos vasos.
9. Formación de capilares y organización de los mismos.

### **Activación de células endoteliales y de pericitos**

Las células endoteliales durante la angiogénesis sufren alargamiento nuclear y prominencia nucleolar, incremento en el número de organelas y formación de proyecciones en su superficie. Secretan proteasas del tipo metaloproteasa y activador del plasminógeno. Los pericitos también sufren aumento en el número de polirribosomas citoplásmicos, y otras modificaciones de sus características morfológicas y relación tipográfica (**Díaz-Flores L et al. 1991**).

### **Degradación de la lámina basal**

Durante la angiogénesis, se produce la proteólisis local de la lámina basal de la pared de los vasos y subsiguiente degradación de la matriz intersticial. Inicialmente las células endoteliales activadas segregan enzimas que degradan la matriz, tales como activador del plasminógeno y colagenasa, causando fragmentación de la lámina basal (**Folkman J et al. 1984**). Los componentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina y colágeno tipo I, III, IV y V, sufren importantes cambios (**Madri N et al. 1982**).

La fragmentación de la lámina basal es un paso necesario para la migración de células endoteliales del vaso inicial (**Ausprunk DH y Folkman J 1978**). La desintegración completa ocurre en el lugar donde el estímulo angiogénico es más fuerte, coincidiendo con aquellas áreas donde las células endoteliales se están duplicando. Por lo tanto, las células endoteliales no tienen lámina basal, sino un provisional sustrato homogéneo de proteoglicanos.

### **Migración de células endoteliales**

Una vez producida la degradación de la lámina basal, se produce una migración de células endoteliales, las cuales protuyen a través de la pared del vaso y migran a través del espacio intersticial hacia el estímulo angiogénico. Cuando la célula endotelial migra dentro del intersticio, otras células endoteliales le siguen y forman cordones en el estroma perivascular.

### **Proliferación de células endoteliales**

La migración y mitosis de células endoteliales son fenómenos independientes (**Wall RT et al. 1978**).

El tiempo y sitio exacto de división de células endoteliales es controvertido. Algunos investigadores la consideran concomitante con la aparición de brotes, mientras la mayoría de los autores son de la opinión de que las células endoteliales comienzan las mitosis después de su migración. Las mitosis de células endoteliales aparecen tanto en los nuevos vasos como en los previos.

Existen dos formas de canalización de los nuevos capilares:

A/Mediante vacualización intracelular del citoplasma endotelial de células contiguas, las cuales se canalizan intercelularmente por conexión de las vacuolas (**Folkman J et al 1980**).

B/Por canalización intercelular de células endoteliales adyacentes mediante curvatura de las mismas (**Wakui S et al 1988**).

### **Pericitos en la angiogénesis.**

Durante la fase inicial de la angiogénesis se aprecia una súbita, breve e intensa proliferación de pericitos. En ellos aparecen nucleolos prominentes y ribosomas dispersos en su citoplasma. Muchos de los pericitos muestran un aumento de la síntesis de DNA y además, se aprecia una disminución en la superficie de contacto entre pericitos y endotelio, con disrupción de la lámina basal.

Los pericitos juegan un importante papel en la regulación de la angiogénesis. La presencia de pericitos estimula la mitosis de células endoteliales mientras su ausencia puede inhibir la proliferación de células endoteliales y su migración (**Diaz-Flores L et al. 1992**).

También se ha descrito que los pericitos recién formados guían el avance del proceso celular del brote endotelial formándose puentes de pericitos a modo de guía en el crecimiento de células endoteliales (**Nehis V et al. 1992**).

Tanto los fibroblastos como el músculo liso han sido considerados posibles precursores de pericitos, debido a fenotipos similares entre ambos tipos de células.

### **Cambios en la matriz extracelular y formación de una nueva lámina basal.**

En estadios iniciales de desarrollo de microvasos, la fibronectina es el componente predominante de la matriz provisional. Progresivamente los depósitos de fibronectina descienden llegando a ser discontinuos mientras aumenta la laminina tipo IV, acumulándose en el espacio subendotelial. En los estadios más tardíos de angiogénesis aumentan el colágeno tipo I y III en el espacio perivascular.

### **Formación de plexos vasculares.**

La fusión de varios capilares forman un plexo, pero el modo en que los brotes capilares se encuentran entre sí para fusionarse está sin resolver (Nehis V et al. 1992).

### **Cambios tempranos en la formación de neovasos: persistencia, involución y diferenciación.**

Durante la angiogénesis, un sustancial número de vasos regresa. De hecho, los vasos inmaduros parecen requerir estímulo angiogénico para no regresar cuando el estímulo cesa (Azmi TI and O'Shea JD 1984).

Una vez los nuevos vasos reciben el estímulo angiogénico, hay un descenso del flujo en los vasos antiguos, los cuales regresan. Al mismo tiempo, la regresión vascular parece ocurrir al principio en las ramas capilares distales más pequeñas, probablemente porque el flujo sanguíneo dentro de ellas es pequeño (Ausprunk DH et al. 1978).

### **1.7.2.-Angiogénesis y Cáncer.**

El proceso de la angiogénesis ha sido objeto de numerosas investigaciones desde hace más de 50 años.

En 1946 **Codman y Sheldon** observaron una hiperemia local constante e intensa en la zona que rodeaba a tumores de ratón implantados subcutáneamente. Esta zona estaba constituida por pequeños capilares engrosados que formaban una densa malla de canales entrelazados. El engrosamiento vascular se extendía hasta los grandes vasos. Ya antes de la neovascularización y el crecimiento de los vasos alrededor o en el interior del tumor se observaron cambios vasculares en los tejidos adyacentes al tumor implantado. Los implantes de tejidos adultos normales no indujeron hiperemia, pero los implantes de tejido embrionario singénico (que crecieron durante un cierto tiempo en el huésped) provocaron una intensa hiperemia que cesó cuando el tumor embrionario sufrió regresión. Este hallazgo llevó a Codman y Sheldon a pensar que la hiperemia se debía a la presencia de células proliferantes (**Codman DR 1946**). En otros estudios se observó también la formación de una red vascular alrededor de los tumores malignos implantados en el abazón de hámster (**Greenblatt M 1968**), en la cámara anterior del ojo de cobaya (**Greene HSN 1961**) o de conejo (**Gimbrone M 1974**) y en la membrana corioatlandoidea de embrión de pollo (**Folkman J 1974**).

En 1966, **Warren y Shubik** (**Warren BA 1966**) estudiaron la configuración y la ultraestructura de la vascularización de melanomas humanos transplantados en abazón de hámster. En la neovascularización inicial, formada por brotes capilares con numerosas anastomosis, los vasos sanguíneos se confinaban en la periferia del tumor. Los autores observaron dos tipos de configuración fisiológica de los vasos sanguíneos: los que regaban la periferia del tumor y parecían asociarse a la necrosis central, frecuentemente observada en los tumores de crecimiento rápido; y los que parecían penetrar en el centro del tumor. Los estudios ultraestructurales revelaron tres grandes tipos de vasos:

1/El primero consistía en vasos de pared delgada que aparentemente se habían formado a partir de los capilares.



2/El segundo tipo consistía en sinusoides o canales sanguíneos desprovistos de células endoteliales y en gran parte cubiertos por células tumorales malignas.

3/El tercero, consistía en vasos sanguíneos maduros de aspecto normal.

**Liotta y cols (Liotta LA 1974)** observaron que cinco días después de la implantación intramuscular de células de sarcoma en ratones singénicos se formaban pequeños vasos en la periferia de todos los tumores. Sólo tras la inducción de la vascularización encontraron células tumorales en el efluente venoso. Observaron también una correlación directa entre la densidad de los vasos con un diámetro superior a 30milimicras y la concentración tanto de células tumorales aisladas como de agregados de células tumorales que se habían separado del tumor en crecimiento. La mayoría de los vasos que rodeaban al tumor tenían un diámetro superior a 30µm, lo suficientemente grande como para permitir la circulación de agregados formados por más de seis células tumorales (**Liotta LA 1974**).

Estos estudios sugirieron que la vascularización del tumor primario precede a la separación de las células tumorales, la formación de agregados y su diseminación. Folkman y Tyler (**Folkman J 1977**) proporcionaron evidencias indirectas en apoyo de esta hipótesis con el estudio de carcinomas humanos “in situ”. La mayoría de estos carcinomas eran pequeños, carecían de vascularización y se localizaban dentro de la membrana basal intacta. En general, el estadio “in situ” no se asociaba a metástasis y podía prolongarse durante mucho tiempo. Sin embargo, una vez que el tumor primario se vascularizaba, podían formarse metástasis.

El papel de la angiogénesis en la biología del cáncer fue abogado inicialmente por **Folkman (Folkman J 1971)**, quien fue el primero en postular en 1971 que los tumores sólidos podrían permanecer latentes hasta un tamaño de sólo 2 a 3mm<sup>3</sup> en ausencia de neovascularización; el tamaño está limitado por la difusión de oxígeno y nutrientes. Las células cancerosas implantadas en sitios vasculares de los animales crecían rápidamente y formaban grandes tumores. En contraste, las células implantadas en sitios avasculares eran incapaces de formar masas tumorales. La proliferación y supervivencia de las células depende de un suministro adecuado de factores de crecimiento y de la ausencia de moléculas tóxicas.

En los tejidos sólidos, el oxígeno, por ejemplo, puede difundirse radialmente desde los capilares hasta una distancia de tan solo 150 o 200(m. Cuando se superan estas distancias se produce la muerte celular (**Tomlinson RH 1955**). Este trabajo guió hacia la hipótesis de que la angiogénesis era obligatoria en el crecimiento tumoral.

Investigaciones posteriores han proporcionado una evidencia definitiva, tanto en estudios animales como humanos, que el crecimiento tumoral es angiogénico dependiente (**Folkman 1990**). El crecimiento de los tumores, más allá de un tamaño límite de 1-2mm de diámetro (10 elev a 5 - 10 elev a 6 cells) en modelos experimentales, depende de la angiogénesis.

La opinión común sugiere que con el tiempo un subgrupo de células dentro del tumor adquiere un fenotipo angiogénico con la capacidad de inducir nueva formación de vasos. Como resultado de ello la enfermedad desarrolla la capacidad de crecer y metastatizar. Esto es conocido como la **teoría del cambio angiogénico**, que demarca dos estadios en el desarrollo del tumor, la fase prevascular y la vascular (**Folkman J 1989-1987, Silman F 1981, Chodak Gw 1980**). Las células en la fase prevascular de la enfermedad neoplásica y en las no-vasculares, micrometástasis silentes de las metástasis del tumor, pueden proliferar hasta el mismo grado o más rápidamente que las células en la fase bien vascularizada, agrandando el tumor primario y tumores secundarios. Sin embargo, en ausencia de nueva formación de vasos, el grado de proliferación tumoral se mantiene en equilibrio con el grado o proporción de apoptosis hasta el momento en que se desarrolla un medio ambiente angiogénico (**Folkman J 1995, Holmgren L 1995 L, Bergers G 1998**). La fase prevascular, que ha sido elucidada en estudios de carcinoma de cérvix (**Silman F 1981**), vejiga (**Chodak GW 1980**) y mama (**Jensen HM 1987**), puede persistir durante años y normalmente está asociada con limitado crecimiento tumoral, p. ej limitada profundidad de melanomas (**Srisvastava A 1986**), y pocas o ninguna metástasis. La fase vascular, está normalmente seguida de un rápido crecimiento tumoral, sangrado y de potencialidad metastásica (**Mac Cawley LJ 2000, Liotta LA 1998**).

La presencia e intensidad de la angiogénesis, determinada indirectamente por el recuento vascular, juega un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades malignas. Altos recuentos vasculares son un factor pronóstico adverso independiente en muchos tumores sólidos, entre los que se encuentran los de mama (**Fox SB 1995**), pulmón (**Giatromanolaki A 1996**), próstata (**Weidner N 1993**) y cáncer de ovario (**Brustmann H 1997**), independientemente del método de conteo empleado para determinar la densidad microvascular (**Fox SB 1995**).

Aunque la dependencia de enfermedades malignas hematológicas de la angiogénesis no es intuitiva, se ha encontrado una mayor densidad vascular en la médula ósea de pacientes que han sido diagnosticados recientemente de leucemia mieloide o mieloma, retornando la densidad vascular a la normalidad con la remisión de la enfermedad.

Hoy día es aceptado que la angiogénesis no sólo es esencial para el crecimiento tumoral, sino que también está implicada en la **progresión inicial** de los tumores, desde un estado premaligno, incluyendo metaplasia, displasia y carcinoma “in situ”, hasta un cáncer invasor (**Hanahan D 1996, Dobbs SP 1997, Engels K 1997**). En el cérvix, incrementos significativos del recuento microvascular se han visto desde un cérvix normal, pasando por un CIN I, II y III, hasta un carcinoma invasivo de células escamosas.

Así pues, la angiogénesis está implicada desde los estadios más iniciales de la formación del cáncer hasta la etapa final de diseminación metastásica a distancia (**Liotta LA 1998, Holmgren L 1995**).

Existe suficiente certeza de que el proceso angiogénico además puede preceder y participar en el proceso de carcinogénesis en sí. La angiogénesis juega un importante papel en la evolución de enfermedades asociadas al subsiguiente desarrollo de procesos malignas. Entre estas se incluyen hepatitis crónica y cirrosis hepática inducida por el virus de la hepatitis B y C (**Mazzanti R 1997, El -Assal ON 1998**), así como la formación de placas pleurales tras exposición del mesotelio al asbesto (**Bielefeldt-Ohmann H 1996**). En estas situaciones ha sido postulado que el proceso angiogénico juega un papel protagonista en la carcinogénesis en individuos susceptibles al desarrollo del carcinoma hepatocelular (**Mazzanti R 1997**,

**Shibara M 1998**) y mesotelioma (**Bielefeldt-Ohmann H 1996**). Además, el HIV y el herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV/HHV8) codifican factores que promueven la angiogénesis y han sido implicados en el desarrollo de dicho sarcoma (**Albini A 1995, Bais C 1998**).

Folkman propuso que el crecimiento tumoral es angiogénico dependiente (**Folkman J 1971**). Sin embargo, hallazgos recientes sugieren que un subconjunto de tumores inicialmente crecen por “**co-option**” (**cooperación**) con estructuras vasculares preexistentes, pero si esta cooperación vascular remite, deja al tumor dependiente de la angiogénesis para su supervivencia (**Holash J 1998**).

#### **1.7.2.1.-Relación entre fenotipo de células tumorales y células endoteliales:**

##### 1.7.2.1.1.-Proliferación de células tumorales y angiogénesis:

Mutaciones en el gen supresor P53 (17p), que se encuentran en el 70%-80% de los cánceres colorrectales, y del oncogén K-ras (12p), presente en el 40%-50% de los cánceres colorrectales esporádicos, aumentan la proliferación de células endoteliales; están también implicadas en la disminución de los inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, trombospondina -1 por mutación del p53 (**Dameron KM 1994, Vermeulen PB 1996**), y en la elevación de los factores angiogénicos, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por la mutación del p53 (**Kieser A 1994; Vermeulen PB 1996**) y mutación ras (**Rak J 1995**).

Bouck 1996 observó en estudios “in vitro” que la expresión del tipo salvaje del p53 disminuye la capacidad de las células de inducir angiogénesis.

Estudios recientes han demostrado que p53 puede regular la actividad promotora del gen bFGF a nivel de la transcripción; así el alelo p53 de tipo salvaje reprime la expresión de bFGF y su mutante la activa (**Ueba T 1994**).

Así pues, las mutaciones en el gen supresor p53 y del oncogen K- ras pueden ser

responsables del cambio angiogénico mediante modificaciones en el balance local entre factores pro y antiangiogénicos (**Rak et al 1995, Dameron KM 1994**). Kang et al 1997 encontraron una correlación positiva entre IMD en el cáncer colorrectal, VEGF y sobreexpresión de la proteína p53.

Por otro lado, la hipoxia de los tumores malignos, así como el aumento de la presión tisular como consecuencia de la proliferación de células tumorales, dará lugar a la estimulación de VEGF (**Schweiki D 1992**), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (**Kuwabara K 1995**). Esta interacción paracrina recíproca entre células tumorales y células del estroma, por ejemplo, células endoteliales, puede ser un eslabón directo entre la actividad de ambas poblaciones celulares (**Folkman J 1996**).

#### 1.7.2.1.2.-Invasividad de células tumorales y angiogénesis:

Existen datos de que la invasividad de las células tumorales y la migración de las células endoteliales son procesos interactivos. La migración de las células endoteliales desde la pared de los vasos pre-existentes hacia el estímulo quimiotáctico, uno de los pasos iniciales en el desarrollo de los nuevos vasos, no sólo asemeja a la invasión de las células tumorales a través de la membrana basal, sino que además, la digestión de la matriz extracelular por las células endoteliales facilita la diseminación de las células tumorales. La degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) y las membranas basales por acción de las células tumorales es un requisito previo esencial para la invasión y la metástasis (**Nicolson GL 1989, Sloane BF 1990, Testa JE 1990, Liotta LA 1982**).

Entre las enzimas que participan en esta degradación se encuentran las metaloproteinasas, una familia de endopeptidasas dependientes de metales (Zn) (**Stetler-Stevenson WG 1990, Liotta LA 1990, Himelstein BP 1994**), que son producidas por las células del tejido conectivo así como por numerosas células tumorales primarias y metastásicas (**Liotta LA 1991, Crawford HC 1994, Moscatelli D 1988**). La síntesis de enzimas capaces de degradar la MEC, por ejemplo, la colagenasa de tipo IV (gelatinasa,

metaloproteinasa de la matriz 2), y la heparinasa (endo-Beta-D-glucuronidasa específica de heparan sulfato), por las células tumorales metastásicas, está estrechamente relacionada con su capacidad metastásica, ya que facilitan la diseminación de las células tumorales en y a través de dicha matriz (**StetlerStevenson WG 1999, Liotta LA 1990, Johnson MD 1993**). Se ha demostrado que inhibidores específicos de las metaloproteinasas de la matriz inhiben la invasión de las células tumorales (**Testa JE 1991, DeClerck YA 1991**).

Obviamente, la neovascularización tumoral promueve el crecimiento tumoral ya que los nuevos vasos permiten el intercambio de nutrientes, oxígeno y productos de desecho, de una gran población celular para la cual la simple difusión de sustancias a través de su superficie externa no sería suficiente. Es también aparente que además de este efecto en la perfusión, las células endoteliales pueden liberar importantes factores de crecimiento paracrino para las células tumorales (p ej bFGF, insulín factor de crecimiento-2, y factor estimulante de colonias) (**Rak JW 1994, Folman J 1994**). Además, el comportamiento invasivo quimiotáctico de las células endoteliales está facilitado por su secreción de colagenasas, uroquinasas, y activador del plasminógeno (**Fox SB 1993, Moscatelli D 1981**).

Así pues, este impacto aditivo de perfusión, efectos paracrinos e invasividad asociada a enzimas, derivado de las células endoteliales, contribuye a la fase de rápido crecimiento tumoral y señala un cambio a un fenotipo angiogénico potencialmente letal. Estos mismos efectos contribuirían a una mayor potencialidad metastásica al facilitar la entrada de las células endoteliales dentro del sistema linfático.

Como es conocido, el cáncer es el resultado del acúmulo de una serie de cambios genéticos, los cuales ejercen un efecto autónomo sobre las células tumorales. En la mayoría de los casos las células tumorales no requieren de la interacción con las células no tumorales para exhibir tal transformación característica “in vitro”. Sin embargo, la respuesta del huésped (neoangiogénesis y desmoplasia) influyen en la progresión de la enfermedad. La interacción entre epitelio (tumor) y compartimento estromal es dinámica y varía durante la carcinogénesis.

Esto es, la inherente inestabilidad genética de las células carcinomatosas como resultado del acúmulo de cambios genéticos característicos de la carcinogénesis (**Fearon ER 1990, Peltomaki P 1993**), no sólo afecta directamente a las células tumorales, sino que

inevitablemente influye en el colectivo celular vecino vía paracrina o yuxtacrina.

Interacción estroma-epitelio durante el desarrollo y tumorogénesis:

- *Condensación mesenquimal,*
- *Desmoplasia y*
- Neo-angiogénesis.

A menudo se presupone un paralelismo entre la interacción epitelio-mesénquima durante el desarrollo y la carcinogénesis. Esta relación es dinámica en ambas situaciones y alteraciones en la organización de un compartimento pueden tener un profundo impacto sobre el otro (**Stephen Byers et al 1994**).

- *Condensación mesenquimal:* la condensación mesenquimal no es imprescindible para iniciar la proliferación epitelial, pero si es esencial para el siguiente control del crecimiento y morfogénesis (**Hirai Y 1992**). Se ha visto en todos los organismos investigados, “in vivo” o en experimentos recombinantes “in vitro”, que la morfogénesis epitelial normal no puede tener lugar en ausencia de mesénquima. Los factores que se ha postulado que puedan estar implicados en esta inducción son: los componentes de la matriz extracelular, la superficie celular y diversos factores solubles, liberados por las células epiteliales (**Sakakura T 1991**).

Como es conocido, para que las células tumorales puedan invadir tejidos adyacentes deben ser capaces de desprenderse del tumor primario venciendo unas fuerzas de adhesión que tienden a mantenerlas unidas, gracias a unas moléculas de adhesión (cateninas y E-caderina).

Las investigaciones de Gallin WJ et al 1986 e Hirai Y et al 1989 indican que la capacidad del epitelio para mantener la condensación mesenquimal depende de moléculas de adhesión E-caderina. La pérdida de la organización epitelial no sólo afecta directamente a las células epiteliales sino que también influye en el mesénquima adyacente. La desorganización del compartimento epitelial con anticuerpos frente a E-caderina resulta en la pérdida o fracaso para desarrollar la

condensación mesenquimal (**Gallin WJ et al 1986 e Hirai Y et al 1989**). Enfermos con cáncer colorrectal en estadios avanzados presentan concentraciones bajas de alfacatenina y E-caderina (**Gofuku J 1999**). Por tanto, algunos autores asocian esta reducción con tumores más indiferenciados y de peor pronóstico (**Ropponen KM 1999, Karatzas G 1999**).

- Reacción Desmoplásica (proceso de remodelación): se refiere tanto a la producción como a la degradación de la matriz extracelular (**Ohtani H 1998**).

Clarke et al apreciaron que el cáncer de mama metastásico está asociado con una pobre reacción desmoplásica mientras que tumores con gran reacción desmoplásica y depósito en la matriz extracelular (MEC) son menos metastásicos (**Clarke R 1992**). Durante el desarrollo, el ordenado crecimiento invasivo y morfogénesis del epitelio está acompañado y depende de la condensación mesenquimal. Durante la carcinogénesis, los carcinomas menos metastásicos (más organizados) están asociados con condensación del mesénquima desmoplasia), mientras los carcinomas más metastásicos (menos organizados), no.

En resumen, la pérdida de la organización epitelial no sólo afecta a las células del carcinoma, sino que, también influye en el estroma circundante mediante mecanismos paracrinós y juxtacrinós (**Clarke R et al. 1992**).

Se acepta que todas las células, incluidas las tumorales, cuando pierden contacto entre sí o penetran en la matriz extracelular sufren un tipo de apoptosis (muerte celular programada) denominada anoikis. Las células tumorales son capaces de desarrollar resistencia a esta muerte celular elaborando un tipo de moléculas de adhesión como son las integrinas (**Frisch 1994**). Estudios experimentales de cáncer colorrectal, tanto “in vivo” como “in vitro”, demuestran un aumento de las subunidades alfa-6 y alfa-5 beta-3 de las integrinas, y la relacionan con mayor agresividad del cáncer colorrectal.

Las integrinas alfa-v-beta 3 desarrollan una intensa actividad angiogénica en células aisladas del higroma quístico inhibiendo la apoptosis de las células endoteliales de los vasos neoformados y aumentando la proliferación de dichas células junto con el VEGF



**(Maddalozzo et al. 1999).**

La inhibición de la angiogénesis “in vivo” por la administración de anticuerpos directos frente a las integrinas  $\alpha v$ - $\beta 3$ , altamente expresada en vasos angiogénicos, se ha visto que no sólo reduce el crecimiento tumoral, sino que también afecta a la invasividad local de los carcinomas de mama en humanos (Brooks PC 1995).

Por lo tanto, en conjunto, una menor expresión de E-caderina, una mayor expresión de integrinas y E-selectina (moléculas de adhesión), y un aumento de la actividad proteolítica, se asocian a un mayor potencial metastásico en los cánceres humanos.

#### 1.7.2.1.3.-Diseminación tumoral hematológica y angiogénesis:

Mientras que las neoplasias benignas están poco vascularizadas y tienden a crecer despacio, los tumores malignos están muy vascularizados y crecen de forma acelerada (Folkman J 1987 -1995, Fidler IJ 1994). Esta mayor vascularización aumenta también la probabilidad de que las células tumorales penetren en el torrente circulatorio y generen metástasis (Liotta LA 1974, 1976, 1991). Además, los vasos neoformados, aunque deriven de tejidos del huésped circundantes al tumor, guardan sus propias características funcionales. Por ejemplo, los vasos tumorales presentan discontinuidades y estudios ultraestructurales muestran que sus membranas basales presentan fragmentaciones; esto facilita que los nutrientes lleguen al tumor y que las células tumorales entren en la circulación proporcionando una ventaja para la supervivencia del tumor (Weidner N 1993).

Pero no sólo la mayor vascularización de los tumores es la responsable de esta mayor capacidad metastásica, sino que también, el hecho de que los neovasos presenten una composición celular, estructura, y permeabilidad, diferentes a los vasos normales. Los vasos neoformados tumorales presentan un diámetro interno desproporcionadamente grande en relación al grosor de la pared vascular, así como una menor cantidad de células musculares lisas y pericitos. Esto implica una notable delgadez y fragilidad de la pared vascular que favorece el desarrollo de dilataciones de tipo aneurismático, un flujo sanguíneo irregular con

zonas de éstasis sanguínea y una elevada permeabilidad vascular facilitando el escape de células tumorales al torrente circulatorio.

El primer hallazgo cuantitativo de que la intensidad de la angiogénesis en tumores humanos podría predecir la probabilidad de metástasis fue publicado para melanomas cutáneos (**Srivastava A 1986, 1988**).

Estudios más recientes han mostrado la asociación entre angiogénesis y metástasis (**Weidner N 1991, 1992; Mc Culloch P et al 1995**). Mc Culloch et al, mostraron que la diseminación perioperatoria de células cancerosas se relaciona con IMD en el carcinoma de mama.

Los inhibidores circulantes de la angiogénesis pueden suprimir el subsiguiente crecimiento de las metástasis por inhibición de la angiogénesis local e incremento de la actividad apoptótica en la población de células tumorales (**Folkman J 1995, O'Reilly MS 1994**).

Así pues, no sólo la formación de nuevos vasos predispone a la progresión metastásica, sino que el propio proceso de angiogénesis en los tumores encierra una colaboración entre células endoteliales y tumorales que aumenta sus posibilidades.

Las células tumorales producen factores de crecimiento paracrino tales como: factor estimulante de colonias (CSF), factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2), bFGF, enzimas como colagenasas, urokinasas, y activador del plasminógeno, que facilitan el comportamiento quimiotáctico invasivo de las células endoteliales, al mismo tiempo que facilitan también la diseminación de células tumorales (**Fox SB et al. 1993**). Por otro lado, los factores de crecimiento producidos por las células endoteliales vasculares, tales como bFGF, IGF1, PDGF, GCSF, que actúan como agentes mitógenos, producen una estimulación paracrina de las células tumorales. La interleukina 6 (IL6) producida también por las células endoteliales estimula la motilidad de las células tumorales.

Existe una estimulación recíproca entre células endoteliales del estroma intratumoral y las células del parénquima tumoral.

### **1.7.3.-Control de la angiogénesis:**

#### **1.7.3.1.-Factores angiogénicos**

El proceso de la angiogénesis es complejo y está formado por la sucesión de varios eventos biológicos. Todo empieza por la producción y liberación de una serie de factores de crecimiento angiogénico como respuesta a una señal bioquímica tisular o estímulo angiogénico, para iniciar y dirigir la proliferación y migración de células endoteliales en el tejido conectivo (**Folkman J 1987**). Los factores angiogénicos son producidos tanto por las células tumorales como por células del estroma, macrófagos y fibroblastos (**Takahashi Y 1996**).

El control fisiológico de la angiogénesis es el resultado del balance local entre la actividad de los factores estimuladores e inhibidores. Ambos pueden ser aislados en tejidos normales, pero en condiciones habituales en tejidos adultos la actividad inhibitoria es predominante. Cuando se desarrollan tumores malignos la actividad antiangiogénica de los inhibidores desciende y aumenta la de los inductores, permitiendo la progresión tumoral (**Volpert OV 1995**).

El grado de angiogénesis en un tumor depende también del balance del efecto de los factores angiogénicos y antiangiogénicos. En las pasadas dos décadas se han descrito más de 20 factores de crecimiento, citoquinas, y otras sustancias con actividad proangiogénica, así como también se han identificado diversos inhibidores.

Además de factores promotores e inhibidores de la angiogénesis también participan en ella componentes de la matriz extracelular y de las interacciones celulares.

**Factores Endógenos Angiogénicos y Antiangiogénicos. Reguladores Angiogénicos.****Factores Angiogénicos.**

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG)  
 Factor ácido y básico de crecimiento fibroblástico (FGF)  
 Factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-EGF).  
 Angiogenina.  
 Factor de crecimiento transformante Alfa, Beta (TGF-a; TGF-b)  
 Factor de crecimiento epidérmico  
 Factor de crecimiento hepatocitario (HGF)  
 Factor de activación plaquetaria  
 Factor de necrosis tumoral-A (TNF-a)  
 Factor granulocítico estimulante de colonias (G-CSF)  
 Folistatina  
 Interleucina-1 y 8 (IL1, IL-8)  
 Prostaglandinas E1, E2  
 Integrinas vasculares Alfa v Beta3  
 Hormona de crecimiento (somatotropina, GH)  
 Matriz metaloproteinasas

**Factores antiangiogénicos.**

Trombospondina (TSP-1)  
 Angiostatina (fragmento plasminogeno)  
 Endostatina ( “ colágeno XVIII)  
 Interferón Alfa, Beta, Gamma  
 Interleucina-12 (IL-12)  
 Factor plaquetario 4 (FP4)  
 Angiopoyetina  
 Inhibidores tisulares  
 de las metaloproteinasas (TIMP)

**1.7.3.1.1.-Factores Proangiogénicos:**

La angiogénesis se inicia por la acción de diferentes factores angiogénicos tras la activación local de genes activadores y delección de sus supresores, o por liberación de su almacenaje.

La neovascularización tumoral sigue un patrón paracrino por el que las células tumorales incrementan el crecimiento de las células endoteliales pero simultáneamente éstas favorecen también el crecimiento de las células tumorales mediante la secreción de factores como el PDGF, el FGF básico, el IGF-I, IGF-II y diversas citoquinas. En función de este hecho se ha observado un mayor crecimiento de células tumorales siguiendo los capilares, aún en ausencia de flujo sanguíneo.

- Factor de crecimiento endotelial vascular o factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF):

VEGF es un péptido heparina-binding de 45. 000 daltons con cinco isoformas moleculares compuestas de 206-, 189-, 165-, 145-, y 121-aminoácidos residuales (Neufeld G 1999). Las isoformas más cortas VEGF165, VEGF145 y VEGF121, son péptidos

secretados que pueden actuar como agentes difundibles, aunque una parte del VEGF 165 también se encuentra en la matriz extracelular, mientras que las isoformas más largas permanecen asociadas a las células (**Neufeld G 1999**). Las diversas isoformas de VEGF se unen a dos receptores Tirosin-Kinasa, VEGFR-1 (flt-1) y VEGFR-2 (KDR/flk-1), los cuales son expresados casi exclusivamente por las células endoteliales (**Neufeld G 1999**).

La actuación del VEGF sobre los receptores endoteliales KDR/Flk-1 regula la diferenciación, multiplicación y quimiotaxis de las células endoteliales (**Millauer R 1993**). La actuación sobre los receptores Flt-1 producirá la maduración y reestructuración de los vasos neoformados (**Shibaya M 1995**).

La mayoría de los tipos de células tumorales producen diversas isoformas de VEGF simultáneamente pero VEGF 121 y VEGF 165 son normalmente las variantes predominantes (**Neufeld G 1999**).

Es uno de los más potentes factores angiogénicos. Es una citoquina multifuncional que posee una específica actividad mitogénica sobre las células endoteliales estando aparentemente desprovista de dicha actividad en otros tipos de células (**Ferrara N 1992**) e incrementa la permeabilidad vascular promoviendo la extravasación de proteínas plasmáticas desde los vasos tumorales, sobre todo fibrinógeno y fibronectina (**Brown LF 1998**), conduciendo a la formación de una matriz extravascular de fibrina que permite la invasión de las células estromales dentro del tumor en desarrollo y proporciona el lecho para los nuevos vasos (**Dvorak HF 1992**). Se ha demostrado experimental y clínicamente que incrementa el crecimiento tumoral y la angiogénesis (**Ferrara 1993 Dvorak HF 1992**). Induce la síntesis de activador de plasminógeno y la de su inhibidor, así como del receptor de urokinasa (**Guidi 1995**).

El VEGF juega un papel central en la regulación de la angiogénesis tumoral. Induce angiogénesis “in vivo” y se une a los receptores de células endoteliales de vasos en crecimiento estimulando la proliferación y migración de células endoteliales, es decir, induciendo la vascularización tumoral por un mecanismo paracrino. Directa o indirectamente, tiene la habilidad de afectar todas las fases de la angiogénesis y es reconocido como uno de los más importantes factores angiogénicos. También juega un importante papel en ciertos

procesos fisiológicos (inflamación, cicatrización).

El VEGF/VPF fué descubierto originalmente por su capacidad para incrementar la permeabilidad de los microvasos. La hiperpermeabilidad vascular es una característica de la angiogénesis, que la precede y acompaña, permitiendo la migración de las células endoteliales y fibroblastos.

La secreción de VEGF por las células tumorales es estimulada por la hipoxia (**Raleigh et al 1998, Chiarotto 1999**). Como los tumores sólidos crecen en tamaño, las células dentro de la masa en crecimiento frecuentemente sufren hipoxia por el incremento de la distancia al vaso más cercano, y el que VEGF medie la angiogénesis en respuesta a la hipoxia parece ser un mecanismo general implicado en el crecimiento de muchos cánceres. Recientemente se ha propuesto la hipótesis de que la hipoxia, empleando como marcador de hipoxia el pimonidazol (**Raleigh et al 1998 Chiarotto 1999**), puede inducir la síntesis de VEGF a través de factores tales como IL-6, factores de crecimiento (epidérmico y queratinocítico) y FNT (Factor de necrosis tumoral) (**Cohen 1996**), estableciéndose de este modo una **relación** entre apoptosis y angiogénesis, hecho que convertiría la angiogénesis en un regulador paracrino de este proceso.

La expresión de VEGF por las células tumorales está también potenciada por la activación de oncogenes como el ras (**Rak J 1995**) o inactivación de genes supresores como p53 (Kieser A., 1994) y por otras citoquinas como el factor Beta transformante del crecimiento (TGF-B) (**Pertovaara L 1994**) y óxido nítrico (**Chin K 1997**). La inhibición de VEGF se ha demostrado que suprime el crecimiento tumoral “in vivo” (**Kim KJ 1993**).

En muchos cánceres la expresión de VEGF en el tumor se ha mostrado como un factor pronóstico indicador de recurrencia o supervivencia, independiente de otros factores clínico-patológicos; así por ejemplo: el cáncer de mama (**Linderholm B 1998**), carcinoma de células escamosas de pulmón (**Imoto H 1998**), colorrectal (**Ishigami SI 1998**), carcinoma

gástrico (**Saito H 1999**), carcinoma escamoso oral y orofaríngeo (**Smith BD 2000**), leucemia mieloide aguda (**Aguayo A 1999**).

- *Factores de crecimiento fibroblástico (FGF)*
- Factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF):

Es otro factor angiogénico frecuentemente encontrado en los tumores. Es un polipéptido soluble, heparina binding, de 146 aa, con un 50% de secuencia homóloga (140 aa FGF), siendo activo cuando el aa 15 terminal se encuentra excindido. Presenta diversas isoformas de diferente masa molecular, entre 18 y 24 Kd. Está producido por diversos tipos de células tumorales así como por células de origen neuroectodérmico y mesodérmico.

Posee una acción mitógena sobre las células endoteliales, y como el VEGF, es un potente inductor de angiogénesis (**Friesel RE 1995**), estimulando tanto la migración de las células endoteliales (**Tsuboi R 1990**), como la proliferación celular endotelial; por otra parte, las células endoteliales también producen y liberan bFGF presentando así también una acción autocrina.

Además de su acción independiente sobre las células endoteliales, bFGF también actúa sinérgicamente con VEGF en la inducción de la angiogénesis (**Asahara T 1995**). Actúa promoviendo la producción de VEGF en las células endoteliales (**Seghezzi G 1998**). La liberación de bFGF desde las células tumorales se ha demostrado está asociado con el cambio angiogénico (“angiogenic switch”) en el multiescalonado proceso de desarrollo tumoral (**Kandel J 1991**), y anticuerpos monoclonales frente a bFGF se ha visto que inhiben el crecimiento tumoral (**Hori A 1991**)

Sin embargo, su actividad mitógena no es específica; a diferencia del VEGF también estimula la proliferación de una amplia variedad de células derivadas del ecto y mesodermo como células epiteliales y fibroblastos (**Gospodarowicz D 1987**).

El bFGf estimula la producción de un activador del plasminógeno tipo urokinasa y procologenasa y la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular con efectos en la

producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos.

El bFGF induce la producción de prostanglandinas E2 por las células endoteliales microvasculares aumentando la producción de AMP cíclico y estimulando su proliferación. Así la acción angiogénica de bFGF puede ser eliminada por la administración sistémica de medicamentos que inhiben la síntesis de PTG (**Fajardo LF 1992**).

• Factor ácido de crecimiento fibroblástico:

Es otro miembro de la familia de factores de crecimiento fibroblástico que es expresado por las células tumorales y promueve la proliferación de células endoteliales (**Folkman J 1987**); sin embargo, parece que juega un papel menos importante en la angiogénesis que el bFGF.

Los estudios sobre el impacto pronóstico de la expresión de bFGF en los tumores son menos concluyente que los de VEGF (**Takanami I 1996; Kitadai Y 1996; Landriscina M 1998, Burian M 1999**).

• Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF):

Fue el primero aislado desde las plaquetas (**Miyazono K 1987**). Puede ser también sintetizado por las células endoteliales en las que también se encuentran los receptores funcionales de PDGF (**Beitz JG 1991**), lo cual sugiere que PDGF es un modulador autocrino o paracrino durante la angiogénesis. PDGF puede acelerar la formación de capilares por la activación de células del tejido conectivo, tales como miofibroblastos, en la vecindad de las células endoteliales.

Comparado con VEGF y bFGF, es un agente mitógeno menos potente sobre las células endoteliales, pero también estimula el quimiotactismo migratorio de las células endoteliales (**Risau W 1992**).

El factor PD-ECGF es expresado en una amplia variedad de procesos malignos (**Griffiths L 1997**) aunque se ha comprobado que algunas células normales tales como



macrófagos, células estromales y células de la glia, producen PD-ECGF (**Fox SB 1995**). Su expresión en las células tumorales está modulada por el microambiente tumoral, como la hipoxia (**Griffiths L 1997**).

El significado pronóstico de la expresión tumoral de PD-ECGF no está completamente claro. La mayoría de los estudios muestran una correlación positiva entre el incremento de PD-ECGF y tumores avanzados de adverso pronóstico (**Takebayashi Y 1996, Matsumura M 1998**) en cambio, otro estudio fracasó en encontrar correlación entre PD-ECGF y vascularización tumoral (**Saito S 2000**). En este último estudio una alta expresión de PD-ECGF en los macrófagos del estroma tumoral fue predictiva de buen pronóstico; este hallazgo fue atribuido al papel de PD-ECGF expresado por las células del estroma en el aumento de la respuesta inmune frente a las células tumorales.

- *Factores de crecimiento transformante:*
- *Angiogenina:*
- *Angiopoyetina 1:*

Además de las mencionadas, existen otros factores de crecimiento o citoquinas que se ha visto estimulan la angiogénesis, como por ej: factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento hepatocitario, factor de activación plaquetaria.

La angiogénesis es un proceso escalonado en el que está implicado la proliferación celular, diferenciación, migración, y organización en forma de túbulos. Es probable que las diferentes moléculas angiogénicas regulen distintos pasos de la angiogénesis (**Kumar R 1998**).

### 1.7.3.1.2.- Inhibidores de la angiogénesis

El término antagonista de la angiogénesis fue introducido en 1975 por Brem y Folkman. Todos son capaces de bloquear “in vivo” la angiogénesis y han demostrado actividad antitumoral.

#### • Trombospondina:

Es uno de los que ha sido mejor caracterizado. Es una proteína secretada en la matriz extracelular por macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (**Taraboletti G et al 1990**), que inhibe la angiogénesis mediante la modulación de factores angiogénicos. Es un potente inhibidor natural de la proliferación y migración de células endoteliales, así como de la adhesividad, motilidad, y actividad proteolítica de las células endoteliales. Sus niveles están disminuídos durante la tumorogénesis (**Tsuzynski GP 1996, Bussolino F 1997**).

La secreción de trombospondina-1 es estimulada por la presencia del gen p53 (gen supresor tumoral). De esta forma p53 puede intervenir en la regulación del fenotipo angiogénico y la pérdida de su función puede contribuir a la progresión del tumor por descenso de la síntesis de trombospondina-1 (**Volpert OV 1995, Gonzalez Palacios F 1997**).

#### • Angiostatina:

Es un fragmento del plasminógeno de 38 KD (**O'Reilly MS 1994**) que impide la degradación de la matriz extracelular (**Bussolino F 1997**). Fue introducida por Folkman en 1972.

#### • Endostatina:

Es un fragmento del colágeno XVIII (**O'Reilly MS 1997**). Su mecanismo de inhibición de la angiogénesis es similar al de la angiostatina y, al igual que ella, es capaz de

producir regresión de tumores en animales de experimentación (O'Reilly MS 1997).

En base a la observación clínica de que tras la extirpación del tumor primario se producía un rápido desarrollo de metástasis a distancia se postuló que el tumor primario puede producir factores antiangiogénicos tales como angiostatina y endostatina, que inhiben el crecimiento de las metástasis (Folkman J 1972).

### 1.7.3.2.-Factores de matriz extracelular y de adhesión celular.

Junto a las citoquinas que podrían considerarse específicas, ya que actúan directamente sobre las células endoteliales, existen otras moléculas que de forma inespecífica se encuentran implicadas en la angiogénesis:

A/Las enzimas proteolíticas: sobre todo las metaloproteinasas, fundamentalmente la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B), que actuarían degradando la matriz extracelular (Kim TS 1999).

B/La E-selectina: por un lado facilitará la migración de las células endoteliales y por otro permite la unión de las células tumorales a las células endoteliales en los capilares de los órganos predispuestos a metástasis. Se ha visto que sus niveles están más elevados en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepáticas que en pacientes sin metástasis (Wittig BM 1996; Brodt P 1997).

C/Las integrinas alfa y beta: tienen un papel predominante en la angiogénesis ya que sin su presencia (mediante la administración de un antagonista, LH609) se produce la apoptosis de las células endoteliales de los vasos neoformados bloqueando el crecimiento tumoral e induciendo la regresión tumoral (Eliceiri BP 1998).

La activación de la síntesis de MMP-2 está mediada por los receptores de integrinas, especialmente Alfa 2 Beta 1. En otros sistemas, Alfa v Beta 3 han sido también implicados en la iniciación de la síntesis de MMP-2 (**Haas et al 1998**).

Estas enzimas proteolíticas producidas tanto por las células tumorales como por células del estroma peritumoral han adquirido un gran interés en la presente década. Esto es debido a su potencial papel en la degradación de la matriz extracelular y membranas basales, facilitando así *la invasión tumoral y las metástasis*, que son aspectos absolutamente claves en la historia natural del cáncer (**Gottesman M 1990, Liotta LA 1991**).

Las enzimas proteolíticas que están implicadas en los carcinomas humanos pertenecen a cuatro diferentes grandes familias: metaloproteinasas, aspartil-proteinasas, serin-proteinasas y cisteín-proteinasas.

#### *A/ Metaloproteinasas de la matriz:*

Son una familia de endopeptidasas extracelulares dependientes de zinc que selectivamente degradan componentes de la matriz extracelular. Estas enzimas están producidas tanto por las células tumorales como por las células del tejido conectivo normal (macrófagos y células endoteliales).

Todas las MMP son inhibidas por una familia específica de proteínas que se denominan inhibidores tisulares de MMP (TIMP) (**Matrisian LM 1990**). La activación de MMP-9 depende de su relación molar con su inhibidor (TIMP). La MMP-9 se activa si la relación MMP-9/TIMP es mayor de 1:1.

Los niveles de expresión de los genes de las MMPs son normalmente bajos; las enzimas son inducidas en diversas situaciones, tanto fisiológicas (cuando se requiere de la remodelación de la matrix extracelular (MEC), participando en los procesos de remodelación tisular, embriogénesis-parto, cicatrización y angiogénesis entre otros), como patológicas,

por ej: artritis reumatoide, enfermedad periodontal, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares y alteraciones hematológicas, pero sobre todo, en las neoplasias.

Sin duda, el aspecto que ha generado mayor interés en investigación clínica es el papel de las MMPs en la fisiopatología tumoral: Angiogénesis / Invasividad tumoral / y Metástasis.

Dentro de este extenso grupo, las metaloproteasas que más se han relacionado con los procesos de invasividad tumoral y metástasis son aquellas que degradan específicamente el colágeno tipo IV: gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), estromelina 1 (MMP-3) y estromelina 2 (MMP-10). Las MMPs producidas por las células endoteliales son: MMP1, MMP2, MMP-9 y MT-1-MMP. De éstas, la MMP-2 y MT-1-MMP son las más estudiadas por su papel en la angiogénesis.

#### *-MMPs y Angiogénesis:*

Hoy día es aceptado que la invasividad y capacidad metastásica de las células tumorales es un fenómeno “multi-step” (escalonado) que implica la degradación de la matriz extracelular (MEC) así como modificaciones en la adhesión y movilidad de las células tumorales.

Como es sabido, la angiogénesis es un proceso complejo y dinámico, que requiere de la proliferación de las células endoteliales desde vasos preexistentes, de la ruptura de la matriz extracelular, y de la migración de las células endoteliales; *por lo que el crecimiento y desarrollo de los vasos sanguíneos dentro del tumor requiere de algunos de los mismos factores que son cruciales para la invasión de las células tumorales. Las metaloproteinasas juegan un papel central en todo este proceso (Vihinen P 2002, Cox G 2001).*

La actividad de las MMPs es un acontecimiento temprano en la respuesta angiogénica, sin embargo, las MMPs pueden tanto:

1. Facilitar la angiogénesis.
2. Generar inhibidores de la angiogénesis.

La proteólisis de la matriz extracelular es un prerrequisito para la angiogénesis y las MMPs activas (especialmente MMP-2) están presentes en los vasos sanguíneos en el escenario angiogénico. Sin embargo, se ha comprobado que diversas MMPs (MMP-12, MMP-7, MMP-9, MMP-3) son capaces de realizar la proteólisis del plasminógeno y formar angiostatina, un inhibidor endógeno de la angiogénesis, el cual específicamente inhibe la proliferación de las células endoteliales (**O'Reilly MS 1999, Patterson BC 1997**).

1/Facilitar la angiogénesis:

Las MMPs están implicadas en mucho más que en la ruptura del tejido conectivo necesaria para la nueva formación vascular. También actúan promoviendo la angiogénesis mediante la regulación de la **adhesión, proliferación, migración y crecimiento** de las células endoteliales (**Haas et al 1998**), bien directamente o indirectamente mediante:

- Liberación de factores proangiogénicos (**Vu TH et al 1998**).
- Destrucción de inhibidores de la angiogénesis (**Vu TH et al 1998**).

Los inhibidores de las MMPs, tanto endógenos como sintéticos, inhiben la respuesta angiogénica tanto “in vitro” como “in vivo” (**Anand-Apte B1997, Hiraoka N 1995**).

*Existe una completa coordinación entre las MMPs y las moléculas de adhesión celular (B-catenina/E-cadherina, Integrinas y Citoquinas) con objeto de facilitar los movimientos de las células endoteliales, también de las células tumorales, a través de la matriz extracelular (MEC)*

Giannelli G et al 1997, en sus estudios en las células epiteliales de mama vieron que la acción selectiva de la MMP-2 sobre la laminina-5 (proteína constituyente de las membranas

basales a la que las células endoteliales se adhieren e interactúan a través de las integrinas) daba lugar a una molécula de laminina-5 escindida, que muestra un locus (oculto previo a la acción de MMP-2) que permite que éstas células adquieran motilidad, estimulándose así su migración.

Estos hallazgos sugieren que productos de degradación de la matriz extracelular podrían influir en el comportamiento de las células endoteliales.

#### 2/Generación de inhibidores de la angiogénesis (Angiostatina/Endostatina):

Recientemente se ha comprobado otro interesante papel en la actividad de las MMPs, y es el de ser las principales proteasas responsables de la generación de un potente *inhibidor de la angiogénesis*: la angiostatina (**Cornelius LA 1998, Patterson BC1997**). Las MMPs pueden degradar el plasminógeno y generar un fragmento NH<sub>2</sub>-terminal, denominado angiostatina, que inhibe la proliferación de las células endoteliales. Entre éstas MMPs se incluyen: MMP-3, MMP-7, MMP-9 y MMP12. La MMP-12 es la más potente en la generación de angiostatina (**Cornelius LA 1998, Dong ZY 1997**).

Otro inhibidor de la angiogénesis recientemente identificado es la endostatina, fragmento proteolítico del colágeno XVIII que también puede ser generado por la actividad de las MMPs (**O'Reilly MS 1997**).

#### **1.7.4.- Determinación de la angiogénesis**

Entre los parámetros que directamente reflejan la angiogénesis tumoral tenemos:

1. Densidad microvascular intratumoral (IMD).
2. Fracción de proliferación endotelial.
3. Grado de cobertura pericítica de los microvasos en los tejidos tumorales.
4. Métodos complementarios.

#### 1.7.4.1.- Cuantificación de angiogénesis (Densidad vascular intravascular):

La cuantificación de microvasos (capilares y pequeñas vénulas) en secciones histológicas de los tumores, mediante microscopía óptica, es una forma de valorar la angiogénesis tumoral que ha sido asociada con la capacidad de metástasis en varios tipos de neoplasias, así como la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

Para la identificación de los microvasos generalmente se usan técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales para marcar las células endoteliales. Dentro del amplio rango de anticuerpos específicos endoteliales humanos disponibles actualmente distinguimos dos categorías: los marcadores celulares pan-endoteliales y los anticuerpos frente al endotelio activo/proliferante. Además de las células endoteliales, otros constituyentes de la pared vascular pueden teóricamente ser utilizados para visualizar el grado de vascularización intratumoral. Entre ellos distinguimos: los pericitos (índice de cobertura por pericitos), y componentes de la lámina basal.

Entre los anticuerpos que detectan antígenos endoteliales formalina-resistentes tenemos los anticuerpos frente al factor de von Willebrand (VWF), también denominado antígeno relacionado con el FVIII, y marcadores de superficie celular como CD31 (molécula de adhesión celular endotelial-plaquetario o PECAM) (**Parums DV 1990**) y CD34 (antígeno de célula progenitora del sistema hematopoyético humano) (**Schlingeman RO 1990, Fina L 1990**).

El factor de von Willebrand está localizado en el citoplasma de las células endoteliales vasculares y tiene un importante papel en la adherencia y agregación plaquetaria (**Fajardo LF 1989**).

CD31 es una glicoproteína de membrana que forma parte de la familia de las moléculas de adhesión (**Parums DV 1990**). Está expresada en todas las células endoteliales, incluyendo capilares, sinusoides, vasos largos, y durante la diferenciación de las células mielomonocíticas (**Kuzu I 1992**).

CD34 es una proteína transmembrana que está presente tanto en las células progenitoras hematopoyéticas como en las células endoteliales (**Fina L 1990**). Su molécula se



encuentra asociada con microprocesos endoteliales de los brotes vasculares, lo que sugiere que interviene en la adhesión celular y migración (**Schlingeman RO 1990**).

Todos estos anticuerpos han sido usados para reconocer tumores de origen vascular, y de ellos el antiCD31 y el antiFVIIIAg han sido los más usados para la identificación de microvasos en carcinomas.

Los Ac antiCD31 son superiores en secciones de parafina (**Fox SB 1995**). EL factor de vonWillebrand y el CD34 presentan el inconveniente que marcan una proporción de vasos linfáticos; y aunque se asume que las neoplasias no forman nuevos vasos linfáticos (**Van Netten JP 1995**), el marcaje de vasos linfáticos preexistentes puede inducir falsos positivos en el conteo microvascular. El factor VIII también tiene el inconveniente de que tampoco tiñe parte de los endotelios capilares de los tejidos tumorales (**Vermeulen PB 1995**).

Horak et al, observaron que CD31 es más sensible que el factor VIII para el recuento de microvasos. Sin embargo, existe una estrecha correlación entre los marcadores con CD31 y factor VIII, sugiriendo que ambos son métodos fiables de cuantificación de angiogénesis en tejidos tumorales (**Toi M et al 1995 en el cáncer de mama, Vermeulen et al 1995 en el cáncer colorrectal**).

CD31 y CD34 pueden tener reacciones cruzadas con fibroblastos y CD31 también reacciona con las células plasmáticas y mielomonocitos (**Kohlberger PD et al 1996**). Esta falsa señal de CD31 en células inflamatorias podría llevar a confusión en la cuantificación vascular, pero puede ser fácilmente soslayada basándose en diferencias de tipo morfológico entre ambos tipos de células. Otra desventaja del marcaje con CD31 es la frecuente pérdida antigénica debido a las fijaciones que contienen ácido acético.

Un análisis reciente de IMD en cáncer de mama sugiere que el anti-CD34 puede ser el anticuerpo más reproducible y seguro para estudios de rutina (**Martín L 1995**). Hasta que esto no sea comprobado en otros tipos de tumores, puede ser de utilidad el uso combinado de anti-CD31 y anti-CD34 (**Vermeulen PB et al 1996**).

Para Axelssen 1995 y Siitonen 1995, tras comparar los resultados con tres anticuerpos (factor VIII, CD31 y CD34), CD34 y factor VIII muestran mejores resultados que el antiCD31.

Los anticuerpos anti-membrana basal, como anti-colágeno IV, o contra paredes de microvasos con antivimentina, no parecen óptimos por su baja especificidad y sensibilidad (Fox SB et al. 1995).

Aunque se ha encontrado una asociación positiva con el riesgo de desarrollar metástasis en diferentes tumores, la determinación de IMD usando marcadores celulares pan-endoteliales puede no ser un representante preciso de la dinámica capacidad angiogénica de los tumores. Se han determinado distintos anticuerpos con capacidad de inmunomarcaje del endotelio activo p. ej TEC-11, E9, EN 7/44, 4A11, H4/18, FB5. Los más selectivos para el mismo son los anticuerpos 4A11 y H4/18 (Augustin HG 1994, Ruitter DJ 1989). Pero desafortunadamente la mayoría de los correspondientes antígenos de estos selectivos marcadores frente al endotelio proliferante se pierden durante los procesos de fijación e inclusión en parafina.

#### Métodos convencionales para la determinación de la densidad microvascular intratumoral (IMD)

- *Determinación de IMD en las “hot spots” de acuerdo al método de Weidner et al.*

Ya que la IMD en secciones histológicas tumorales es heterogénea, Weidner en 1991 planteó realizar el recuento de vasos sanguíneos en las zonas calientes (áreas del tumor que contienen mayor cantidad de neovascularización) o “hot spot”.

Las razones para determinar IMD en esas áreas son múltiples:

1/Desde un punto de vista práctico, dada la heterogeneidad tumoral, la obtención de una valoración global reproducible de IMD implica la evaluación de una gran extensión del área tumoral.

2/Desde un punto de vista fisiopatológico, las áreas vasculares “hot spot” derivan de los clones de células tumorales con mayor capacidad angiogénica, y serán estas células las que predominantemente entrarán en la circulación, influyendo más en el comportamiento del tumor por su mayor probabilidad de dar metástasis vascularizadas.

Vermeulen et al 1995 observaron el doble de proliferación de células endoteliales en las áreas vasculares “hot spot” del cáncer de colon comparado con áreas tumorales no seleccionadas.

Así pues, la determinación de estas regiones es crítica a la hora de establecer la potencial asociación entre progresión tumoral y angiogénesis; sin embargo este es el punto más subjetivo de todo el proceso por ser observador - dependiente.

### Proceso para el conteo microvascular intratumoral.

1°	Examinar todas las secciones marcadas con hematoxilina-eosina y seleccionar las que muestren un generoso componente invasivo tumoral
2°	Tomar los bloques de las correspondientes secciones seleccionadas y realizar cortes de unas 5 micras de espesor para inmunotinción.
3°	Inmunotinción de la sección con un marcador endotelial para poder determinar la densidad microvascular (p. ej: anti-F8Ag, anti-CD31, antiCD34, etc).
4°	Escanear las secciones inmunoteñidas con microscopía óptica a baja magnificación (10-100x) para seleccionar las áreas “hot spot”
5°	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”. Nota: De acuerdo con Weidner 1991, 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 IMD*

Consiste en una determinación semicuantitativa de la densidad microvascular, trasladando los valores continuos de IMD 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 densidad microvascular por métodos cuantitativos y semicuantitativos y comprobado que ambos eran predictores estadísticamente significativos de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) (**Guidi AJ 1994, Weidner N 1992**).

Fox et al 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 aisladamente.

- *Recuento según método de Chalkley (Chalkley H 1943).*

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, y a una magnificación mayor (200-250x), se rota una retícula ocular que contiene 25 señales posicionales dispuestas al azar, hasta que el máximo número de puntos está dentro del área vascular “hot spot” y en lugar de contar microvasos individuales se cuenta el número de puntos superpuestos.

Fox et al 1995 en un estudio piloto en cáncer de mama encontraron una significativa correlación entre los métodos de Weidner y Chalkley. 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.

Gasparini G et al 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 centros. Sin

embargo, con este método sigue siendo necesario realizar el paso más observador dependiente, la selección de las áreas “hot spot”.

- *Análisis Computarizado de Imagen (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 computerizado de imágenes supone un intento de evitar la influencia de factores subjetivos, agilizar los estudios y mejorar la fiabilidad.

Análisis de imagen. Conceptos generales:

Imagen es una representación en dos dimensiones de una función de transmisión óptica de la luz. Está constituida por un conjunto de puntos que se distribuyen en dos dimensiones del espacio. Por tanto, es una fracción bidimensional de intensidad de luz  $f(x, y)$ , siendo  $x$  e  $y$  las coordenadas espaciales.

El término de “análisis de imagen” puede definirse como la medición cuantitativa en cito e histopatología empleando sistemas informáticos que tienen la capacidad de representar cada punto de la imagen real con valores numéricos distribuidos en un eje de coordenadas, sobre los cuales pueden aplicarse complejas operaciones matemáticas permitiendo la reproducción de la imagen, su manipulación y almacenamiento (**Marchievsky et al. 1987, Linder 1992**).

Componentes del sistema de análisis de imagen:

Los componentes básicos de un sistema de análisis de imagen computerizado son (**Marchevsky 1986**):

1. Sistemas de captación y visualización de la imagen (incluyen una videocámara y un videomonitor.)
2. Un ordenador que consta de un hardware especializado, que incluya un sistema convertidor de señales analógicas en digitales y de digitales en analógicas, un sistema amortiguador y un hardware auxiliar.
3. Un sistema de almacenamiento.

Algunos sistemas de análisis de imagen integran el “software” y el “hardware” como el IBS2000 (**Reñe 1987**). En nuestro estudio hemos empleado el programa de análisis matemático de imagen Visilog (visilog 4. User’s guide; 1991), adaptado a un equipo convencional hardware compatible.

#### Fases del análisis de imagen computerizado.

El proceso de análisis computerizado consta de las siguientes fases (**Erler 1993, Marchevsky 1993**):

- 1-Captación y digitalización de la imagen.
- 2-Procesamiento. Las fases del procesamiento son:
  - 2.1/ Realce de la imagen.
  - 2.2/ Restauración.
  - 2. 3/ Segmentación.
  - 2. 4/ Umbralización.
  - 2. 5/ Morfología matemática.
- 3-Análisis de datos.

#### Aplicaciones del análisis de imagen.

En el campo de la neovascularización tumoral se pretende la obtención de imágenes histológicas con un patrón lo más neto posible mediante programas de análisis informáticos que permitan la delimitación de estas estructuras de las vecinas en las imágenes digitalizadas.

La incorporación de dichas técnicas a la anatomía patológica representaría una serie de ventajas tales como: la reducción del costo de los procedimientos diagnósticos, y la obtención de un sistema experto capaz de realizar diagnósticos automatizados.

El conteo semiautomático se considera el método más objetivo para determinar IMD proporcionando una mayor exactitud, fiabilidad y reproducibilidad; además de la gran ventaja de proporcionar parámetros morfológicos adicionales:

- Número de vasos dentro de cierto rango de dimensiones.
- Área vascular.
- Perímetro vascular.
- Porcentaje de área inmunomarcada por campo...

Barbereschi M et al 1995, encontraron en un estudio de 91 pacientes con cáncer ductal infiltrante de mama sin afectación ganglionar (N-) que tanto la determinación del número de vasos, como del área vascular media mediante CIAS, estaban independientemente asociados con la supervivencia libre de enfermedad, proporcionando algunos indicios de que el valor pronóstico de la determinación del AVM (área vascular media) es menos dependiente de la experiencia del observador que el hallazgo de las áreas “hot spot”. Así pues, el CIAS puede ser de ayuda al patólogo no familiarizado en la determinación de la angiogénesis.

En conclusión: 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 PVM (perímetro vascular medio) son un reflejo cuantitativo del grado de eventos fisiopatológicos implicados en la angiogénesis de los tumores en progresión. La integración de IMD, AVM y PVM, con información del estado de actividad del endotelio tumoral puede proporcionar una valoración más dinámica del comportamiento vascular de los tumores (**Charpin et al. 1999, Simpson JF et al 1996**).

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 et al. 1995 y Belien et al. 1999, han desarrollado 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 conteo microvascular más objetivo, solventando el problema de la subjetividad en la determinación de las áreas “hot spot”.

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

#### **1.7.4.2.- 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.

#### **1.7.4.3.-Porcentaje de recubrimiento pericítico:**

Eberhard et al 2000, 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 murales (anti-alfa-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 normal.

El remodelado de los vasos sanguíneos de la retina es sólo posible en la vida postnatal en ausencia de cobertura pericítica (**Benjamin LE 1998**). Esta observación tiene importantes implicaciones para el tratamiento anti-angiogénico. Benjamin et al 1999, 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 pericítica. 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.

#### **1.7.4.4.-Métodos complementarios para determinar el potencial angiogénico de los tumores.**

##### 1.7.4.4.1.-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 et al 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 3mm 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 proliferantes (**Jitsuiki Y 1999, Colpaert C 2001**). 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 mama N- (**Colpaert C 2001**).

- *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\_\_ (Pezzella F 1997 y 1996, Vermeulen PB 2001, Colpaert C 2001).

Otro prometedor marcador inmunohistoquímico de grado de crecimiento tumoral dependiente de angiogénesis puede ser: *la expresión factor inducible por la hipoxia HIF-1* (Zhong H 1999, Talks KL 2000).

#### 1.7.4.4.2.-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 circulantes (Monestiroli S et al 2001).
- *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 (Gasparini G 1997 y 1999, Epperberger U 1998, Linderholm B 1999).

- *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 tumorales (Poon et al 2001):

#### 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 sentido (**Dirix et al 1996, Kumar et al 1998, Takeda A 2000**).

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.

#### Determinación de los niveles circulantes de bFGF:

La elevación en suero y orina de bFGF ha sido documentada en una amplia variedad de neoplasias desde 1990 (**Fujimoto K 1991, Nguyen M 1994**). La significación clínica de la elevación de los niveles circulantes de bFGF en relación al estadio tumoral y pronóstico es más controvertida, comparado con lo documentado para VEGF (**Landriscini M 1998; Dirix LY et al 1996, Davies MM 2000**).

### **1.7.5.-Terapia antiangiogénica**

Su fundamento estriba en que si el crecimiento y progresión de tumores sólidos está estrechamente relacionado con la neovascularización, la interrupción de dicho proceso mediante factores inhibidores de la angiogénesis puede representar una pauta de tratamiento novedosa y selectiva.

A diferencia de los compuestos citotóxicos empleados en la actualidad, no estaría encaminada a la eliminación de células tumorales, sino a evitar su malignización, retrasando el crecimiento tumoral y la formación de metástasis, evitando su formación e inhibiendo las ya existentes. Por otra parte el mantenimiento de este estado no angiogénico aumentaría la posibilidad de eliminación de las células tumorales mediante la inducción de apoptosis o

activación del sistema inmune (Sarraf 1991, Ravi 1998).

Así pues, al centrar su actividad fundamentalmente sobre las células endoteliales vasculares, en lugar de células tumorales o de otras líneas celulares con alta tasa de proliferación, las terapias antiangiogénicas presentan teóricamente un perfil de toxicidad mucho más favorable, en especial en lo relativo a la mielosupresión, uno de los típicos factores limitantes de los antineoplásicos convencionales.

La complementariedad de los objetivos farmacológicos, sus perfiles de toxicidad mucho más benignos y la incapacidad aparente para inducir resistencia tumoral, hacen de los inhibidores de la angiogénesis unos candidatos ideales para tratamientos combinados con los agentes quimioterápicos convencionales, permitiendo mejorar la eficacia de los tratamientos anticancerosos o, al menos, reducir la incidencia de sus graves efectos adversos, que tanto pueden llegar a deteriorar la calidad de vida del paciente canceroso.

#### **1.7.5.1.-Estrategias utilizadas para el diseño de agentes antiangiogénicos:**

- Bloqueo de los factores angiogénicos:

1. *Anticuerpos monoclonales anti-VEGF.*
2. *Inhibición de la producción de VEGF y bFGF con interferón alfa.*
3. *Bloqueo de los receptores endoteliales para el VEGF y bFGF con fármacos de síntesis: SU5416 y SU6668.*

- Inhibidores naturales y sintéticos de la angiogénesis:

*Endostatina, angiostatina, trombospondina 1, TNP-470, talidomida y taxol.*

- Bloqueo de las moléculas que permiten a los vasos invadir tejidos adyacentes:

En este apartado se encuentran fundamentalmente los *inhibidores de las metaloproteinasas*: marimastat, neovastat, batimastat, etc.

- Incapacitar a las células endoteliales para la formación de nuevos vasos:

En este apartado los esfuerzos se han dirigido *al bloqueo de las integrinas*, bien

mediante anticuerpos monoclonales antiintegrinas (Vitaxin), o farmacológicamente EMD121974 (**Gasparini G 1999**).

• Una nueva forma de terapia antiangiogénica es la genética:

Utilizando vectores virales se introducirían *falsos receptores del VEGF o de la angiopoyetina*, secuestrando estos inductores de la angiogénesis (**Folkman J 1998**).

La combinación de agentes antiangiogénicos y citostáticos aumenta la actividad de ambos (**Kakeji Y 1997**).

Todos los agentes conocidos que poseen como blanco el ciclo celular, en teoría, inhiben el crecimiento tumoral por ambos mecanismos: produciendo la muerte de las células cancerosas e indirectamente, inhibiendo la estimulación angiogénica e inhibiendo la proliferación de las células endoteliales. Esto ha sido experimentalmente verificado por ejemplo para los taxanos, una nueva familia de agentes anticancerosos (**Belotti D 1996**).

Actualmente se están investigando más de 35 agentes anti-angiogénicos en ensayos clínicos. Ellos pueden ser clasificados de acuerdo con su blanco para inhibir la angiogénesis.

La metodología del ensayo clínico, con los agentes antiangiogénicos, difiere sustancialmente a la empleada con los quimioterápicos actuales. La principal diferencia estriba en la definición de los parámetros de eficacia o “endpoints” de los ensayos clínicos, que en el caso de los fármacos antiangiogénicos no se centrarían tanto en la respuesta específicamente tumoral (especialmente de su tamaño), sino en una respuesta más global del tratamiento, como la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

#### **1.7.5.2.- Determinación de la eficacia de la terapia antiangiogénica.**

La determinación de la respuesta tumoral a los agentes anti-angiogénicos por métodos clásicos (p. ej métodos de imagen, examen clínico) puede ser inapropiada, pero sigue siendo mandatoria. Inicialmente, el interés se ha centrado, para monitorizar la respuesta al

tratamiento, en el uso de determinaciones en suero o plasma de los niveles de los factores de crecimiento importantes en la angiogénesis p. ej. bFGF o VEGF (**Wynendaele W 1999, Fuhrmann-Benzaken 2000**). Sin embargo, diversos estudios han fracasado en demostrar un paralelismo seguro entre la respuesta tumoral usando terapias antiangiogénicas y aumentos o descensos de tales marcadores (**Jones H 1999**). Se han usado métodos de imagen (RNM, PET) no invasivos para estudiar directamente la vascularización o flujo tumoral así como los neo-vasos (**Young H 1999, Pham CD 1998**).

### **1.7.5.3.-Objetivos de la terapia antiangiogénica**

Los fármacos antiangiogénicos pueden ser usados tanto con intención paliativa como curativa o preventiva.

#### Intención paliativa:

La mayoría de las terapias antiangiogénicas se están desarrollando actualmente con esta intención. Su potencial para inhibir cualquier crecimiento sobreañadido del tumor, para evitar la diseminación tumoral, e incluso para disminuir el tamaño del tumor, junto con sus pocos efectos secundarios y su posible uso durante largo periodo de tiempo, hace a estos fármacos muy útiles en esta situación clínica.

#### Intención curativa:

La intención curativa es el principal objetivo del tratamiento del cáncer. Los agentes antiangiogénicos podrían ser útiles con esta intención, al evitar el crecimiento de las micrometástasis, como tratamiento adyuvante para estadios iniciales del cáncer, o como terapia de mantenimiento tras obtener una respuesta completa con quimioterapia / radioterapia / cirugía. Algunos agentes anti-angiogénicos se están desarrollando actualmente con esta intención (National Cancer Institute, Clinical Research Protocols For Selected New Antitumor Agents.)

#### Intención preventiva:

En poblaciones de alto riesgo para desarrollar cáncer. Además, el uso de un agente

inhibidor de la angiogénesis fue eficaz en inhibir el crecimiento tumoral, aún antes de la aparición de nuevos vasos sanguíneos (**Folkman J 2000**).

#### **1.7.5.4.-Terapias antiangiogénicas en desarrollo:**

##### *Agentes antiangiogénicos que actúan sobre MMPs:*

Los inhibidores de las MMPs bloquean la angiogénesis, y así el crecimiento tumoral, pero también la posibilidad de que las células tumorales metastaticen e invadan los vasos sanguíneos. Los inhibidores de las MMPs (MMPIs) están más avanzados en su aplicación clínica que otros agentes antiangiogénicos.

Agentes Anti-angiogénicos que bloquean Metaloproteinasas.

FÁRMACO	ESTADO DE DESARROLLO
Batimástat (BB94)	Abandonado (por su baja solubilidad no se ha desarrollado más allá de ensayos en Fase I-II)
Marimástat (BB2516)	Fase III en: mama, estómago, colon, glioblastoma, ovario, NSCLC, páncreas.
Solimástat (BB3644)	Fase I (para tumores sólidos refractarios)
Bay 12-9566	Fase III: pulmón, ovario, páncreas, "en compas de espera"
AG3340	Fase III: pulmón, próstata.
Col-3	Fase I, Fase II: cerebro
Neovastat (AE-941)	Fase III: colon y NSCLC
BMS-275291	Fase I/II
CGS 27023 A	Fase I/II

NSCLC, cáncer de pulmon de células no pequeñas.



Agentes Anti-Angiogénicos que inhiben Factores de Crecimiento:

FÁRMACO	ESTADO DE DESARROLLO.
Anticuerpos Anti-VEGF	Fase II y III: mama, pulmón, próstata, riñón y colorrectal
SU 5416	Fase I/II : sarcoma de Kaposi, riñón, melanoma, sarcomas, VHL
SU 6668	Fase I
PTK787/ZK 22584	Fase I, Fase I/II: sarcoma Kaposi, colorrectal, VHL
Ribozima (Angiozima)	Fase I

NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas, VHL: Síndrome de Von Hippel-Lindau, HCL: leucemia de células peludas, CML: leucemia mielocítica crónica.

Agentes Anti-Angiogénicos que inhiben la activación de las células endoteliales:

FÁRMACO	ESTADO DE DESARROLLO
TNP 470 (análogo sintético de la fumagilina)	Fase II: linfomas, riñón, cervix y tumores sólidos avanzados.
Esqualamina	Fase I/II NSCLC
Endostatin	Fase I

Agentes Anti-Angiogénicos que actúan sobre la Vascularización Tumoral:

FÁRMACO	ESTADO DE DESARROLLO
Vitaxin	Fase I/II.
EMD 121974	Fase I/II: sarcoma de Kaposi.
CM 101/ZDO 101	Fase I.
Combrestatin	Fase I.

Agentes Anti-angiogénicos con múltiples o desconocidos mecanismos de acción:

FÁRMACOS	MECANISMO DE ACCIÓN	ESTADO DE DESARROLLO.
Talidomina	Inhibición de VEGG, bFGF, TNFalfa. Otros?	Fase II: glioblastoma, próstata, pulmón, mama, cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi y otros. Adyuvancia en colorrectal metastásico.
IM862	Activación IL-12 y NK. Otros?	FaseI: ovario, FaseII: melanoma, renal. Fase III: sarcoma de Kaposi.
Suramín	Bloquea la unión de los factores de crecimiento a sus receptores. Otros?	FaseIII: próstata, Fase II: glioblastoma, mieloma, E. de Castleman.
PNU-145156E	Análogo de suramín.	Fase I
Penicilamina	Quelante del cobre.	Fase II: glioblastoma.
Captopril	Quelante de cobre.	Fase I/II
CAI	Inhibidor entrada de calcio.	Fase II: ovario, NSCLC, riñón, próstata.
ABT-627	Antagonista de receptores endoteliales	FaseII: próstata, glioblastoma.
Interleukina-12	Inducción IFN G. Otros?	FaseII: sarcoma Kaposi, riñón, ovario.

82 Estudio de la Angiogénesis intratumoral y reacción Desmoplásica .....

Interferón alfa	Inhibición de la producción de VEGF y bFGF.	Aprobado para el tratamiento del carcinoma de células renales, mieloma múltiple, linfoma, HCL, CML. En ensayos Fase II y III.
Taxanos	Antimitótico, Otros.	Aprobado para el tratamiento: mama, ovario, pulmón. Ensayos Fase II y III.
Razoxane	Inhibidor de topoisomerasa II, Otros.	Fase II renal.

## **II.-OBJETIVOS**



La angiogénesis esta despertando últimamente gran interés en el campo de la oncología. Es fundamental tanto para el crecimiento como para la progresión tumoral. Fue el melanoma cutáneo el primer tumor maligno en humanos del que se publicó el que la densidad de angiogénesis pudiera predecir la probabilidad de metastatizar (**Srisvastava A 1986, 1988**). Una posterior correlación, estadísticamente significativa, ha sido demostrada entre el conteo microvascular y la incidencia de metástasis, recurrencia, y corta supervivencia en diversos tumores sólidos: mama, pulmón de células no pequeñas, próstata, vejiga, y tumores de cavidad oral. Sin embargo, el papel de la angiogénesis no ha sido tan ampliamente estudiado en tumores del tracto gastrointestinal con resultados contradictorios para los adenocarcinomas de colon; así por ejemplo, Saclarides et al 1994, Frank et al 1995, Takebayashi et al 1996, Engel et al 1996, Tanigagawa et al 1997, encuentran una correlación entre niveles elevados de recuento microvascular con gran tamaño tumoral, estadios avanzados, pobre supervivencia, y metástasis mientras que otros autores, entre ellos Lindmark et al 1996, Banner F et al 1998, Abadía SA 1999, Tarta C et al 2002, Prall F et al 2003 encuentran que no existe correlación entre la densidad vascular y el tamaño tumoral, grado de diferenciación, afectación ganglionar o metastásica a distancia, y que recuentos elevados de densidad microvascular se asocian con supervivencias prolongadas o no tienen ningún papel pronóstico.

Por ello y dada la necesidad de determinar otras variables pronósticas que nos expliquen la discrepancia de resultados con el mismo estadio, según los sistemas actuales de homogenización de los pacientes, nos hemos planteado estudiar la angiogénesis y reacción desmoplásica mediante morfometría en el cáncer de colon.

### 2.1.-OBJETIVO GENERAL

Estudiar una amplia serie de casos de cáncer de colon diagnosticados histopatológicamente en el periodo comprendido entre los años 1991 a 1996, mediante un estudio de cohortes retrospectivo de base hospitalaria, con la intención de estudiar los siguientes objetivos específicos:

### 2.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1.-Objetivos clínicos:

1.-Analizar variables de interés clínico tales como: edad, sexo, localización del tumor primario, perforación, obstrucción, metástasis a distancia, recidiva loco-regional y a distancia, que puedan tener valor pronóstico independiente en el cáncer de colon.

#### 2.2.2.-Objetivos morfológicos:

1.-Analizar variables histopatológicas tales como: aspecto macroscópico, tamaño tumoral, tipo histológico, grado de diferenciación, profundidad de infiltración en la pared

intestinal, infiltración ganglionar o a distancia, estadio tumoral (TNM, Dukes), que puedan tener valor pronóstico independiente en el cáncer de colon.

### **2.2.3.-Objetivos morfométricos:**

1.-Empleando la técnica de análisis de imagen cuantificar los siguientes parámetros morfométricos con posible valor pronóstico en el cáncer de colon:

- Grado de angiogénesis: estudiado a través de la determinación de la densidad microvascular, área, perímetro y “compactness” vascular, en las áreas “hot spot” (áreas calientes)

tanto del centro tumoral (CT) como del adyacente tejido sano peritumoral (PT) y del borde sano (MM).

- Grado de fibrosis (reacción desmoplásica): estudiado a través de la determinación del área, perímetro y “compactness” en el adyacente tejido sano peritumoral (PT).

2.-Analizar la correlación existente entre la angiogénesis y fibrosis a través de los distintos parámetros morfométricos estudiados.

### **2.2.4.-Objetivos finales:**

Determinar aquellos factores clínicos e histopatológicos que se correlacionan de forma independiente con la angiogénesis y con la fibrosis. Y analizar el posible valor pronóstico de la angiogénesis y de la fibrosis en el cáncer de colon, evaluando su influencia en la aparición de recurrencia local, metástasis y supervivencia de los pacientes.







### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### 3.1.-DISEÑO DEL ESTUDIO

Se ha realizado un estudio retrospectivo de pacientes diagnosticados y tratados de cáncer colorrectal en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, durante el periodo comprendido entre enero de 1991 y diciembre de 1996. Para ello se revisaron 406 historias clínicas de pacientes diagnosticados y tratados de cáncer colorrectal en dicho periodo, seleccionando 81 en base a una serie de criterios de inclusión y exclusión que a continuación se exponen:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
1.-Pacientes afectos de adenocarcinoma de colon.	1.-Adenocarcinoma de recto.
2.- Tenerlo como primer y único diagnóstico de cáncer.	2.-Tener un diagnóstico previo de cáncer en otra localización o un segundo tumor.
3.-Haber sido sometido a cirugía como tratamiento inicial.	3.-Tratamiento inicial distinto de cirugía (radioterapia o quimioterapia).
4.-Determinación de márgenes quirúrgicos libres.	4.-Márgenes quirúrgicos afectos.
5.-Disponer de la historia clínica y bloques parafinados del tumor.	5.-Pérdida de algún dato clínico, histopatológico o ausencia de seguimiento tras la intervención quirúrgica.

Los 81 pacientes han sido tratados de forma homogénea siguiendo el protocolo de trabajo del Comité Oncológico de los Servicios de Oncología y Cirugía General del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

### 3.2.-PROCESO DE RECOGIDA DE DATOS

De cada paciente se ha dispuesto de su correspondiente historia clínica obtenida del Servicio de Documentación de dicho Centro, así como de bloques parafinados correspondientes a distintas secciones de la pieza quirúrgica, incluyendo la zona de mayor invasión tumoral y límites de resección.

La recogida de datos obtenidos de dichas historias clínicas, para ser incluidos en la ficha de cada paciente, fue realizada por un único observador. El análisis de los datos histopatológicos y el posterior procesamiento de la Angiogénesis y Desmoplasia a través de la técnica de digitalización de imagen fueron supervisados por dos médicos especialistas en Anatomía Patológica, sin conocimiento previo de las características del paciente ni del tumor.

Los datos correspondientes a cada paciente se exponen en la hoja de recogida de datos **(figura 3.2.1)**.

**Figura 3.2.1.- Hoja de recogida de datos.**

APELLIDOS Y NOMBRE:			
N° DE HISTORIA:			
TLF:			
EDAD			
SEXO:			
LOCALIZACIÓN:			
OBSTRUCCIÓN INTESTINAL: SI-NO			
PERFORACIÓN INTESTINAL: SI-NO.			
TRATAMIENTO QUIRÚRGICO: (Solo intención curativa) Fecha:			
Programado: si -no		urgencias: si-no	
Técnica:			
ANATOMÍA PATOLÓGICA DEFINITIVA:			
Configuración del tumor: exofítico-ulcerado			
Tamaño del tumor primario:			
Tipo histológico:			
Profundidad de invasión a través de la pared:			
Grado de diferenciación:			
Ganglios: SI (N°:      ) - NO			
ESTADIO PATOLÓGICO: A B1 B2 B3 C1C2C3 D			
T1S T1 T2 T3 T4		NX N0 N1 N2 N3	
E I EII EIII EIV		M0 M1	
TRATAMIENTO ADYUVANTE:			
Esquema:			
Tratamiento completo: SI		NO	
Reducción de dosis: SI (%)		NO	
Interrupción del tratamiento: SI		NO	
RECIDIVA LOCO- REGIONAL: Fecha:		Intervalo libre enfermedad (ILE):	
Técnica diagnóstica:		Actitud terapéutica: cirugía: si-no	
Valoración de respuesta tras tratamiento:		quimioterapia: si-no	
RECIDIVA A DISTANCIA: Localización		Fecha:	
		ILE:	
Actitud terapéutica: cirugía: si-no		quimioterapia: si-no	
Valoración de Respuesta:			
SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD:			
SUPERVIVENCIA GLOBAL:			

### 3.3.-VARIABLES ESTUDIADAS

#### 3.3.1.-Filiación del paciente

La **edad** del paciente es la correspondiente al momento de su primera consulta en el servicio de cirugía general. La primera consulta es aquella en la que algún miembro del servicio realiza la historia clínica. La edad se expresa en años (variable continua).

El **sexo** se ha considerado como variable categórica.

#### 3.3.2.-Parámetros Clínicos:

La **localización** del tumor primario se ha recogido distinguiendo tres localizaciones: colon derecho, transversal e izquierdo (variables categóricas). En el colon derecho incluimos: ciego, colon ascendente y ángulo hepático; y en el colon izquierdo: ángulo esplénico, descendente y sigma.

La presencia de **Obstrucción** y **perforación intestinal** se recogen como presente o ausente (variable categórica).

**Tratamiento Recibido:** El tratamiento recibido por cada paciente se decide en el Comité Oncológico formado por miembros del Servicio de Cirugía General y Oncología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, según un protocolo previamente diseñado; y se expresa como variable categórica: cirugía frente a cirugía+tratamiento adyuvante.

En cuanto a la cirugía:

- En los *tumores del ciego*, colon derecho, ángulo hepático o colon transversal proximal se realiza hemicolectomía derecha junto con la resección del lecho linfático, el cual fundamentalmente se distribuye en los troncos vasculares que tienen relación con el tumor.

En los *tumores de transversal distal*, ángulo esplénico, descendente y sigmoideos se realiza hemicolectomía izquierda.

En pacientes con un *tumor sincrónico* se opta preferentemente por una colectomía total con anastomosis ileorrectal.

- En relación con la técnica quirúrgica, en el *paciente obstruido* distinguimos entre obstrucción proximal o distal al ángulo esplénico. En los casos de obstrucción proximal se realiza hemicolectomía derecha o derecha ampliada y anastomosis primaria íleo-cólica. En los casos de obstrucción distal, si el paciente se encuentra estable, se realiza resección inmediata del tumor más una de las siguientes opciones: colostomía terminal (Op.Hartman); preparación del colon intraoperatoria seguida de una resección y anastomosis primaria; o una colectomía total o subtotal más anastomosis ileorrectal (casos seleccionados).
- En el paciente con *perforación tumoral* adyacente al tumor o en el ciego, se realiza resección tumoral con colostomía terminal (Op.Hartman) o una resección ileocecal más una ileostomía con fístula mucosa.

En cuanto al tratamiento adyuvante:

El esquema utilizado es: 5-Fluoracilo+Leucovorin iv (5-Fu 425 mg/m<sup>2</sup> x día x 5días; Leucovorin 20mg/m<sup>2</sup> x 5días); se repite cada 28 días, durante 6 meses, comenzando entre la 4 a la 6 semana después de la cirugía.



Criterios de selección para quimioterapia postoperatoria según TNM:

- *Estadio I:* Sólo cirugía.
- *Estadio II:* Quimioterapia selectiva a los grupos de mayor riesgo por condición clínica desfavorable (tumor localmente avanzado (T4), tumor perforado, tumor obstruido, paciente menor de 40 años) o histología desfavorable (tumores mucinosos, pobremente diferenciados, invasión linfática, perineural, vascular).
- *Estadio III:* A todos, salvo contraindicación formal para quimioterapia.
- *Estadio IV:* Si la resección del tumor primario ha sido con intención curativa se debiera actuar igual que en la etapa III.

**Recidiva local y recidiva a distancia:** Ambas recogidas como variables categóricas, presente o ausente, tras evidenciar su existencia mediante la historia clínica, exploración física, pruebas analíticas y de imagen complementarias, y/o confirmación patológica.

**3.3.3.-Parámetros Histopatológicos**

Para el **Tamaño tumoral** se ha seleccionado el espesor mayor del mismo, expresándolo en cm y considerándolo como una variable continua.

**Configuración tumoral macroscópica**(variables categóricas): Distinguimos según Hamilton SR en la publicación de la **WHO (World Health Organization Clasificación of tumours 1999)** entre:

- Exofíticos-Fungoides.
- Endofíticos-Ulcerados.
- Difusamente Infiltrativos-Linitis Plástica.

---

**Profundidad tumoral, Invasión ganglionar y existencia de metástasis a distancia** (variables categóricas): Según la UICC recogida de la publicación de WHO (**Classification of the tumours of the Digestive System, tras la conferencia de consenso de Lyon, Francia 6-9,1999**):

Tis: Tumor “in situ”.

T1: Tumor que invade la submucosa.

T2: Tumor invade la muscular propia.

T3: Tumor invade, a través de la muscular propia, la serosa.

T4: El tumor directamente invade otros órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo visceral.

NX: Nodulos linfáticos regionales no pueden ser determinados.

N0: No afectación ganglionar regional.

N1: Metastasis en 1 a 3 ganglios linfático regionales.

N2: Metastasis en 4 o más ganglios linfático regionales.

MX: La existencia de metástasis a distancia no puede ser determinada.

M0: No existen metástasis a distancia.

M1: Existencia de metástasis a distancia.

**Estadio tumoral** (variable categórica): **TNM** según UICC recogida en la publicación de la WHO (**Classification of the tumours of the Digestive System, tras la conferencia de consenso de Lyon, Francia 6-9, 1999**):

EO: Tis N0 M0

EI: T1 N0 M0

T2 N0 M0

EII: T3 N0 M0

T4 N0 M0

EIII: Cualquier T, N1, M0

Cualquier T, N2, M0

EIV: Cualquier T, Cualquier N, M1

**Estadio tumoral: Dukes** modificado de Astler-Coller.

**Tipo histopatológico:** El tipo histopatológico de todos los pacientes incluidos con cáncer de colon fue adenocarcinoma, entre los que se incluyeron los de tipo mucinoso, definidos según las recomendaciones de la WHO como aquellas lesiones que están ocupadas en más del 50% de las mismas por mucina (**Hamilton et al 1999**). Distinguimos pues entre adenocarcinomas y adenocarcinomas mucinosos (variables categóricas).

**Grado de diferenciación:** Fue determinado según las recomendaciones de la WHO (**Morson BC 1976**) (variables categóricas).

- Bien diferenciado (BD).
- Moderadamente diferenciado (MD).
- Pobremente diferenciado (PD).

Los adenocarcinomas mucinosos se consideran pobremente diferenciados según convenio tras la **Conferencia de Consenso en Lyon, Francia 1999**.

### **3.3.4.-Valoración del estado actual y supervivencia**

**Supervivencia libre de enfermedad (SLE):** Variable cuantitativa. Definida como el tiempo transcurrido, expresado en meses, entre la primera cirugía realizada con intención curativa y la fecha del diagnóstico de la primera recidiva local y/o a distancia.

**Supervivencia global (SG):** Variable cuantitativa expresada en meses. Definida en los casos supervivientes como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial y la fecha de la última revisión; y como la diferencia entre la fecha de la muerte y del diagnóstico inicial en los casos de muerte por cáncer de colon.

Dicha valoración del estado del paciente (SLE, SG) se completó consultando las historias clínicas correspondientes, y en el caso de que dicha información no quedara reflejada en las mismas, mediante consulta telefónica individualizada (última fecha de revisión Marzo del 2003).

### **3.3.5.-Angiogénesis**

Se ha realizado un estudio cuantitativo y morfométrico de la angiogénesis con la ayuda de un sistema de análisis digital de imagen. De cada paciente en las zonas denominadas “hot spot”, o de máxima vascularización, se tomaron 10 imágenes del centro tumoral (CT), 10 de la periferia (PT) o interfase tumor-huésped, así como otras 10 del borde sano (MM) tomadas como control.

Se han medido las siguientes variables morfométricas relacionadas con la angiogénesis, considerando para el análisis final la media de cada una de ellas:

- Densidad vascular intratumoral, peritumoral y del borde sano (variable cuantitativa continua).
- Área vascular media intratumoral, peritumoral y del borde sano (variable cuantitativa continua).
- Perímetro vascular intratumoral, peritumoral y del borde sano (variable cuantitativa continua).
- “Compactness” ( $\text{perímetro}^2 / \text{área}$ ) vascular intratumoral, peritumoral y del borde sano (variable cuantitativa continua).

### **3.3.6.-Reacción desmoplásica**

Se tiñó el tejido conectivo mediante el método del rojo sirio-ácido pícrico y mediante análisis de imagen se realizó un estudio morfométrico determinando el área, perímetro y “compactness” medio de dicha reacción. Para ello, de cada caso se ha teñido una preparación de la muestra tumoral y tras escaneo completo de la misma, con microscopia óptica a 4x, se han seleccionado 8 imágenes de las zonas peritumorales con mayores índices de reacción desmoplásica. A diferencia de para la angiogénesis, no se realizó determinación de reacción desmoplásica en tejido sano.

### 3.4.-PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Tras revisar las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de cada caso y seleccionar la zona más representativa del tumor, desechando aquellos con mayores áreas de necrosis, inflamación o hemorragia, se realizaron las correspondientes tinciones de las nuevas secciones histopatológicas.

De cada pieza quirúrgica se eligieron dos bloques de parafina y se realizaron tres preparaciones histológicas; dos del tumor de la zona más representativa (una para estudiar la angiogénesis y otra para estudiar la reacción desmoplásica) y una de un límite de resección sano (control de angiogénesis).

#### **3.4.1.-Preparaciones histológicas**

Las muestras se procesaron en el Servicio de Anatomía Patológica del mismo Centro hospitalario mediante fijación en formalina tamponada al 10% e inclusión en parafina, y cortadas mediante microtomo a un espesor de 4 micras. Se practicaron tres técnicas para el estudio histopatológico:

**3.4.1.1.- Tinción con hematoxilina-eosina** empleada para el estudio histopatológico diagnóstico, establecimiento del estadiaje y para la selección de las muestras más representativas del tumor para efectuar el posterior análisis morfométrico.

**3.4.1.2.- Estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo monoclonal CD34** frente al antígeno del mismo nombre presente en estructuras vasculares.

Dada la universalidad del primero, a continuación expondremos sólo la técnica inmunohistoquímica para la detección del CD34:

Tras cortar a 4 micras de espesor las secciones histológicas, recoger sobre baño de flotación, y montar sobre portas especiales para inmunohistoquímicas tratados con silene y cargados positivamente (**Master Diagnóstica, Granada, España**).

1.-Dejar secar los portas en estufa a 37 °C colocados verticalmente durante 48 horas y; colocar en estufa a 60°C durante 1 hora antes de comenzar la técnica para incrementar la adherencia del tejido al portaobjetos.

2.- Desparafinar con tres baños en xileno de 5 minutos de duración cada uno.

3.- Hidratar en baños de alcohol de gradación decreciente (absoluto, 96%, 70% y 30%) hasta agua destilada, durante 5 minutos cada uno.

4.- Inhibición de la peroxidasa endógena con solución de agua oxigenada 0.03% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5.- Desmascaramiento antigénico mediante olla presurizada Introduciendo las preparaciones en 500 ml de tampón citrato a pH 8 (**Master Diagnóstica**), calentar durante 5 minutos, cerrar la olla presurizada y mantener a máxima presión durante 1,5 minutos.

6.- Atemperar progresivamente en baño con agua del grifo durante 20 minutos.

7.-Lavar tres veces en tampón PBS de 1 minutos cada uno.

A partir de este paso la técnica se desarrolla en un inmunoteñidor automático (**LabVision, Neomarker, USA**)

8.- Incubar con el Ac primario monoclonal de ratón (IgG1 prediluido frente a CD34 clon QB-END/10 (**Master Diagnóstica**) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

9.- Lavar tres veces en tampón PBS de 1 minutos cada uno.

10.- Incubar con el Anticuerpo secundario marcado con biotina Ig frente a Anticuerpos de ratón (**Multilink, Master Diagnóstica**) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

11.- Lavar tres veces en tampón PBS de 1 minutos cada uno.

12.- Incubar con el complejo estreptavidina-peroxidasa (**Multilink, Master Diagnóstica**) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- 13.- Lavar tres veces en tampón PBS de 1 minutos cada uno.
- 14.- Fabricar la solución de revelado no más de 30 minutos antes de usarla: A cada mililitro de agua destilada añadir por este orden 50 microlitros de tampón sustrato (20x), 50 microlitros de cromógeno diaminobenzidina líquida (DAB 20x), 50 microlitros de peróxido de hidrógeno (20x) (Kit de DAB de Master Diagnóstica).
- 15.- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 16.- Lavar tres veces en tampón PBS de 1 minutos cada uno.
- 17.-Realizar 2-3 lavados en agua destilada.
- 18.-Deshidratar en alcoholes de gradación ascendente (30%, 70%, 96% absoluto), 3 baños de xileno de 5 minutos y montar en medio de montaje Eukitt.

#### **3.4.1.3.-Tinción con Rojo Sirio para identificación del tejido conectivo:**

El método de rojo sirio-ácido pícrico no es una reacción químicamente específica para las fibras colágenas, pero al igual que el método de Van Gieson, proporciona una tinción bastante selectiva de estas fibras. Otras estructuras (membranas del *Pneumocistis carinii* y amiloide) con propiedades semejantes a las de la celulosa también pueden ser teñidas, para lo cual existe una modificación de este método.

##### Procedimiento técnico:

*Fijación:* Formalina tamponada al 10%.

##### *Soluciones:*

a/Solución de rojo sirio-acido pícrico:

-Rojo sirio F3BA (C.I.35780) al 1% ..... 10 mL

-Solución acuosa saturada de ácido pícrico. 90 mL

Mezclar, añadiendo a continuación cristaloides de ácido pícrico para saturar bien la solución colorante. A fin de asegurar la saturación, deberán permanecer algunos restos de ácido



pícrico sin disolver. Dejar reposar la solución 48 horas antes de usarla. El envejecimiento excesivo de la solución se manifiesta por la pérdida de sus propiedades tintoriales. Una tinción de fondo color naranja pálido indica que la saturación con ácido pícrico es incompleta, por lo que se recomienda añadir más cristales del ácido y dejar reposar otras 48 horas.

*Modo de operar:*

- 1.- Desparafinar e hidratar meticulosamente las secciones tisulares.
- 2.- Lavar durante 10 minutos en agua corriente.
- 3.- Mordentaje en alcohol de 70% durante 48 horas.
- 4.- Teñir con la solución de rojo sirio durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Deshidratar rápidamente en alcohol absoluto, aclarar y montar.

*Resultados:*

- Fibras del tejido conectivo (excepto elásticas)..... Rojo intenso.
- Otros elementos..... Amarillo.
- Núcleos (en caso de contraste opcional con H.de Weigert).....Azul-negrusco  
(no realizado)

### 3.5.-TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS.

#### 3.5.1.-Microscopio, cámara de vídeo y soporte informático.

Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio Leitz Dialux 20 EB, dotado de 4 objetivos: 160/-EF 4/0,12; 160/-EF 10/0,25; 17 EF 40/0,65 y 160/0, 17 EF 100/1250 EL.

Las imágenes se captaron con una cámara de vídeo CCD de Sony (**SONY, Tokio, Japón**) adaptada al microscopio y conectada al ordenador. Se empleó un ordenador modelo 486 ALR, dotado de tarjeta digitalizadora MATROX PIP 1024,12 Megabytes de memoria RAM, dos monitores de 15 pulgadas (uno empleado para mostrar las imágenes y el otro para programación), y un software que permitió realizar el tratamiento de análisis de imágenes.

Para el tratamiento de las imágenes se empleó el programa **Visilog 3.6® (Noesis, Courteboeuf, Francia)** que genera imágenes digitalizadas de 256 filas por 256 columnas de pixels y 256 niveles de gris. Los datos numéricos obtenidos a partir del análisis de imagen fueron almacenados y manipulados en forma de archivos ASCII mediante el **programa Word Star**.

### **3.5.2.-Captación y análisis de imagen (AI).**

De cada pieza quirúrgica se realizaron tres secciones histológicas seriadas, dos del tumor y una de un límite de resección sano (empleado como control). De la sección con tumor inmunomarcada para CD34 se captaron 20 imágenes, 10 del centro tumoral (CT) y otras 10 del tejido sano peritumoral (PT) a nivel de la transición tumor- tejido sano, sin separarse más de dos campos ópticos de 20x del borde tumoral. Igualmente del borde sano (MM) se tomaron 10 imágenes para control de angiogénesis.

Debido a la heterogeneidad de las muestras tumorales, inicialmente se seleccionaron las áreas vasculares calientes o “Hot Spot”, tanto del centro como de la periferia o área peritumoral, escaneando toda la preparación con microscopio con el objetivo 10x, siendo captadas posteriormente para su estudio a 20x, siguiendo así las recomendaciones de Weidner 1991 y de las dos conferencias internacionales de consenso sobre metodología y criterios de evaluación de la angiogénesis en tumores sólidos en humanos (**Vermeulen PB et al 1996 y 2002**). Consideramos como contable cualquier célula endotelial individualmente inmunoteñida o grupo de células, que puedan claramente separarse de microvasos adyacentes, células tumorales y de

otras células del estroma. La existencia de luz vascular no es un requisito. No entramos en consideraciones de calibre vascular para considerar un vaso contable o no.

**Para objetivar los parámetros que hacen referencia a la angiogénesis se siguió el siguiente protocolo:**

1/Captura de la imagen con un microscopio Nikon-Optiphot-2, que tenía adosada una cámara de vídeo CCD de Sony (SONY, Tokio, Japón) adaptada al microscopio y conectada al ordenador, a través del software Visilog 3.6 ®:

2/Almacenamiento de la imagen capturada en gris.

3/Lectura de la imagen por el programa Visilog 3.6.

4/Delimitación manual de las zonas en las que segmentar los vasos.

5/Una vez delimitadas éstas, con la función threshold se binarizaban los vasos atendiendo a su nivel de gris.

6/ Cuando era necesario, se terminaban de señalar las estructuras vasculares de forma interactiva.

7/ Eliminación del “ruido” extinguiendo los puntos de escasos pixels con las funciones “erode” y “reconstruye”.

8/ Labelización de la imagen para independizar cada uno de los vasos y obtener los parámetros morfométricos de interés.

9/ Obtención de los parámetros: Área, Perímetro, “Compactness” ( $\text{Perímetro}^2/\text{Área}$ ). Para calcular la densidad vascular se dividía el nº de vasos por la superficie medida.

**Tabla 3.5.2.1: Fases del proceso de análisis de imagen para Angiogénesis.**

<pre> <b>! VISILOG SCRIPT FILE</b> ! V3.8/8/88 ! !! START VLOG: \$ clear Clearing (Memory) : \$ 2 VLOG: \$ lutselect Type (std) : \$ 0 VLOG: \$ read Input: \$ ! Output: \$ a VLOG: \$ copy Input: \$ a Output: \$ b VLOG: \$ specify_aoi Input: \$ b Draw mode (Curve) : \$ 2 Fill value: \$ 1 Output mask: \$ c VLOG: \$ mask Image 1: \$ b Binary mask: \$ c Output image: \$ d VLOG: \$ threshold Input image: \$ d Low and high thresholds: \$ 65 255 Adjusted to: \$ !! Output image: \$ e VLOG: \$ bmask Image 1: \$ a Binary mask: \$ e Output image: \$ f VLOG : \$ graphic_mode VLOG : \$ draw Image to read : \$ f Drawing color : \$ 129 VLOG : \$ draw Image to read : \$ f Drawing color : \$ 0 </pre>	<pre> VLOG : \$ threshold Input image : \$ f Low and high thresholds : \$ 129 255 Adjusted to : \$ @ Output image : \$ g VLOG : \$ erode Input : \$ g Number of iterations : \$ 1 Output : \$ h VLOG : \$ reconstruct Input image : \$ g Image with markers : \$ h Output : \$ i VLOG : \$ hole_fill Input image : \$ i Output : \$ i VLOG : \$ closing Input : \$ i Number of iterations : \$ 1 Output : \$ i VLOG : \$ label Input : \$ i  Output : \$ j VLOG : \$ analyze_cell Input labeled image : \$ j Shape parameters (yes) : \$ 1     Surface/Perimeter (yes) : \$ 1     Inertia parameters (yes) : \$ 1     Feret diameters (yes) : \$ 1     Intercept numbers (yes) : \$ 1 Density parameters (no) : \$ 0 Save results on (Sdf-file) : \$ 2 Output Sdf-filename [.sdf] : \$ ! </pre>
--	---

**Figura 3.5.2.1: Tratamiento por A.I. de la imagen en gris para obtener parámetros morfométricos de interés.**

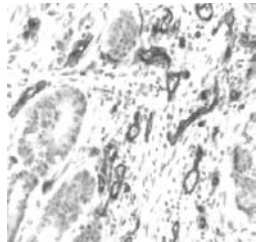
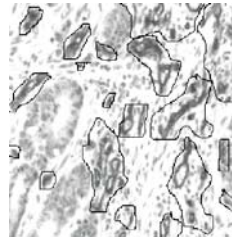
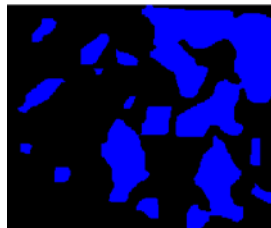


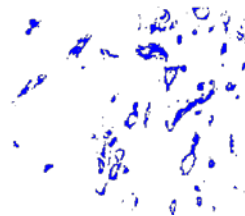
Imagen en gris.



Se señalan los campos de interés de forma interactiva.

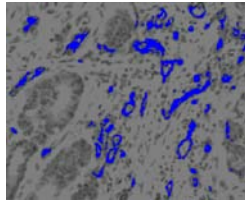


Máscara de la zona seleccionada.

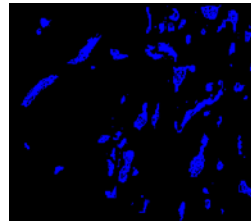


Segmentación de los vasos de las zonas seleccionadas mediante la función threshold.

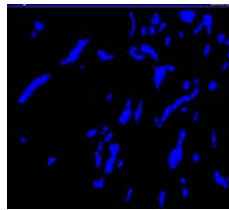
**Figura 3.5.2.1: Tratamiento por A.I. de la imagen en gris para obtener parámetros morfométricos de interés.**



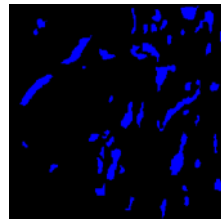
Máscara sobre la imagen en gris.



Se terminan de perfilar de forma interactiva, si es necesario.



Tras las funciones erode y reconstruye se elimina el ruido.



Con la función hole\_fill se termina la segmentación.



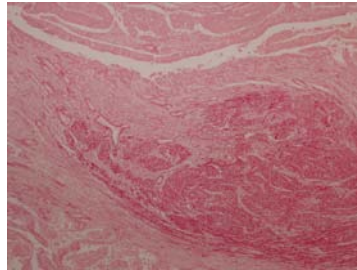
La función label permite individualizar cada elemento. Tras ello el programa calcula los parámetros de interés: área, perímetro, etc.

**Para la Fibrosis** se capturaron mediante la cámara de video CCD de Sony (SONY, Tokio, Japón) con el microscopio a 4x ocho imágenes de las preparaciones teñidas con Rojo Sirio, seleccionando previo escaneo de toda la preparación, las zonas peritumorales con mayor nivel de fibrosis. Las imágenes se binarizaron mediante la función threshold, y posteriormente se obtuvieron los parámetros de interés, que se almacenaron, de la misma forma que los parámetros vasculares, en un archivo SDF, para su tratamiento estadístico.

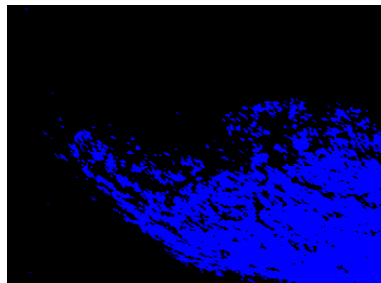
**Tabla 3.5.2.2: Fases del proceso de análisis de imagen de Fibrosis.**

```
! VISILOG SCRIPT FILE
! V3.8/8/88
!
!! START
VLOG : $ read
Input : $ c1
Output : $ a
VLOG : $ threshold
Input image : $ a
Low and high thresholds : $ 1 255
Adjusted to : $ @
Output image : $ c
VLOG : $ analyze_cell
Input labeled image : $ c
Binary input image... Assuming one element (yes) : $ 1
Shape parameters (yes) : $ 1
    Surface/Perimeter (yes) : $ 1
    Inertia parameters (yes) : $ 1
    Feret diameters (yes) : $ 1
    Intercept numbers (yes) : $ 1
Density parameters (no) : $ 0
Save results on (Sdf-file) : $ 2
Output Sdf-filename [.sdf] : $ f1
```

**Figura 3.5.2.2: Tratamiento morfométrico de la Fibrosis**



Fibrosis, teñida con Rojo Sirio



Segmentación del área de fibrosis mediante la función threshold



### 3.6.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### **3.6.1.-Análisis descriptivo univariante y estratificado**

Con el fin de describir la muestra de individuos participantes en la investigación y de organizar, sintetizar y depurar la información contenida en la base de datos del estudio, se realizó inicialmente un análisis univariante y estratificado, que consistió en un análisis de frecuencias y en un análisis descriptivo (medidas de posición y de dispersión) según la naturaleza de las variables de estudio (cualitativas o cuantitativas).

#### **3.6.2.-Análisis bivariante**

El siguiente paso consistió en realizar análisis bivariantes en función de la naturaleza y distribución de las variables de contraste. Así pues, se utilizaron pruebas paramétricas (T-Student, ANOVA, Chi-cuadrado, coeficiente de correlación de Pearson) y no paramétricas (U de Mann-Whitney, K de Kruskal-Wallis y J-H de Jonckheere-Terpstra, prueba exacta de Fisher, coeficiente de correlación de Spearman). Para la prueba Chi-cuadrado y las pruebas no paramétricas se utilizó el método exacto o el de Monte Carlo, para obtener resultados exactos y fiables cuando los datos no cumplían alguno de los supuestos subyacentes necesarios para el empleo del método asintótico típico. Como pruebas de comparaciones múltiples se utilizaron la prueba de Bonferroni y la C de Dunnett. Estos análisis bivariantes nos permitió, además de contrastar las hipótesis de estudio, agrupar, en algunos parámetros, categorías que no presentaban diferencias significativas o con muestra insuficiente. También nos guió en la decisión de inclusión o exclusión de variables en los modelos multivariantes.

### **3.6.3.-Análisis multivariante**

#### **3.6.3.1.-Factores asociados a la angiogénesis.**

Una vez realizado el análisis bivariante, el siguiente paso consistió en analizar factores asociados a cada zona de estudio (CT, PT, MM) en sus diferentes mediciones de angiogénesis (perímetro, área, densidad y compactness) y fibrosis (área, perímetro, compactness), controlando posibles efectos de confusión. Como modelo multivariante se optó por la regresión logística binaria, construyendo uno para cada zona y medición de angiogénesis (perímetro CT, densidad MM...), resultando 15 modelos multivariantes. Estos parámetros se dicotomizaron a partir de sus valores medios (**ver tabla 3.6.3.1**), siendo la categoría de referencia aquellos valores por debajo de la media. Como variables independientes, para cada modelo, se han incluido aquellas que en el análisis bivariante obtuvieron una significación inferior a 0,1 y otras que, aunque no tuvieran significación estadística, se consideraron clínicamente relevantes (ver tabla 3.6.3.1 y tabla 3.6.3.2). Como método de inclusión/exclusión de variables se escogió el método de selección por pasos hacia atrás, según la probabilidad del estadístico de Wald, considerando como probabilidad de salida 0,15.

**Tabla 3.6.3.1: Variables incluidas en los modelos de regresión logística binaria multivariante para las medidas de angiogénesis**

Variables dependientes			Variables independientes (entre paréntesis se indica la categoría de referencia)
Medida angiogénesis	Zona	Punto de corte (valor medio)	
Densidad	CT	22.3	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), sexo (varón), área F ( $\leq 24507,54$ ), perímetro F ( $\leq 7622,02$ ) y metástasis (No)
	PT	27	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	MM	11.02	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), sexo (varón), área F ( $\leq 24507,54$ ), tamaño del tumor ( $<4$ ) y metástasis (No)
Perímetro	CT	66.38	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	80.17	
	MM	43.82	
"Compactness"	CT	30.39	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	35.7	
	MM	26.84	
Área	CT	179	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	232.38	
	MM	79	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), obstrucción (no), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)

**Tabla 3.6.3.2: Variables incluidas en los modelos de regresión logística binaria multivariante para fibrosis**

Variables dependientes		Variables independientes (entre paréntesis se indica la categoría de referencia)
Medida fibrosis	Punto de corte (valor medio)	
Perímetro	7622	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), tamaño del tumor ( $<4$ ), aspecto macroscópico (exofítico), edad (continua), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)
"Compactness"	2734.47	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), tamaño del tumor ( $<4$ ), aspecto macroscópico (exofítico), edad (continua), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)
Área	24507.54	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)

### **3.6.4.-Medias de angiogénesis según parámetros de estudio**

Se contrastó si los valores medios de área, perímetro, “compactness” y densidad vascular en las zonas PT, CT y MM tienen comportamiento similar independientemente de los parámetros de estudio (estadío Dukes, profundidad tumoral, infiltración ganglionar, localización y grado de diferenciación). Para ello se utilizó el modelo lineal general de medidas repetidas, incluyendo como factores intrasujetos: área, perímetro, compactness y densidad vascular (cada uno con tres niveles: CT, PT y MM), y como factores intersujetos: estadío Dukes, profundidad tumoral, infiltración ganglionar, localización y grado de diferenciación. Como prueba de significación multivariada se utilizó la traza de Hotelling, y como prueba estadística de efectos intrasujetos se utilizó el estadístico de Greenhouse-Geisser en el caso de violación del supuesto de esfericidad (que a su vez éste se contrastó mediante el estadístico de Mauchly). Como pruebas de contrastes intrasujetos se utilizó el contraste repetido (comparando la media de cada nivel con la media del nivel siguiente). Para visualizar los resultados se realizaron gráficos de perfil de las medias marginales estimadas.

### **3.6.5.-Análisis de supervivencia**

Con el fin de estimar modelos para datos de tiempos de espera hasta la ocurrencia de un suceso con casos censurados presentes, se utilizaron los procedimientos de Kaplan-Meier y la regresión de Cox. El procedimiento de Kaplan-Meier nos permitió contrastar, de manera independiente, la igualdad de las distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de los factores incluidos en el estudio, a través de la prueba de Breslow. Una vez identificados aquellos factores pronóstico que eran estadísticamente significativos, se evaluaron sus efectos de manera conjunta mediante el modelo multivariante de Cox. Este proceso se realizó para la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y para la Supervivencia Global (SG). Como evento se definió aquellos casos en los que la muerte estaba relacionada con la enfermedad de estudio. Los casos censurados son aquellos casos para los que no se registró el suceso (pérdida del individuo, muerte no relacionada con la enfermedad o seguir vivo hasta la finalización del estudio).

### **3.6.6.-Análisis gráfico**

Para dar una mejor interpretación y visualización de los resultados estadísticos obtenidos, se realizaron gráficos de barras (porcentajes) y de barras de error (media e intervalo de confianza al 95%).

El nivel de significación utilizado en todo el análisis ha sido de 0.05

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 11.5 (SPSS Base 11.5 Manual del usuario, 2001 SPSS Inc.).



## **IV.-RESULTADOS.**

---

#### 4.1.- ESTUDIO DESCRIPTIVO

##### 4.1.1- Descripción de datos demográficos

De los 81 pacientes que componen la muestra el 49.4% (40 casos) eran mujeres y el 50.6% (41 casos) era hombres.

La edad media de los pacientes fué de 68.04 años (con un intervalo de confianza: IC del 95%, situándose los límites entre 65.43-70.64 y con una desviación típica de 11.78).

##### 4.1.2.- Descripción de variables categóricas u ordinales

###### **Tamaño tumoral:**

Agrupando el tamaño tumoral en tres categorías: <4cm., entre 4 - 6 cm, y  $\geq 6$  cm; observamos que el mayor porcentaje de casos se situaba entre 4-6 cm (40.26%).

###### **Localización tumoral:**

El mayor número de casos (N=42) se localizaron en el colon ascendente, lo que supone un 51.9% del total, que engloba al ciego, colon ascendente y ángulo hepático.

###### **Perforación:**

En la mayoría de los casos no existía perforación alguna (91.36%).



**Obstrucción:**

De los 81 pacientes, el 71.6% no estaban obstruidos (58 casos).

**Profundidad tumoral:**

Destacamos el elevado porcentaje de tumores en la muestra que alcanzaron todo el espesor de la pared T3 (58%) y T4 (27.2%).

**Estadio tumoral Dukes:**

El estadio B2 (35.80%) y C2 (32.09%) fueron los más frecuentes. EL grupo de tumores sin metástasis ganglionares o hematógenas a distancia (A-B) supuso el 48.13% y el de afectación metastásica ganglionar o hematógena supuso el 51.85% del total.

**Estadio TNM:**

Encontramos el mayor número de casos en EII y EIII, 31 y 30 casos, que suponen el 38.3% y 37% respectivamente.

**Tratamiento recibido:**

Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico como primera opción terapéutica y 38 pacientes (46.9%) recibieron además tratamiento adyuvante.

**Grado de diferenciación:**

Como se aprecia en la **tabla 4.1.2** de los 81 casos que componen la serie, 58 fueron adenocarcinomas (71.60%), de los que el 19.8% fueron BD (16 casos), el 48.1% fueron MD (39 casos), el 3.7% fueron PD (3 casos) y 23 casos adenocarcinomas mucosecretorios (28.4% del total).

**Tipo histológico:**

Del total de los casos, el 71.60% fueron adenocarcinomas y el 28.40% (23 casos) fueron de la variedad histopatológica mucosecretora.

**Infiltración ganglionar:**

El 56.79% de los pacientes no presentaron afectación ganglionar (46 casos) en el momento de la cirugía y el 43.20% de los casos sí, siendo más frecuentemente como N1 (21 casos).

**Recidiva loco-regional:**

Destacamos que de los 81 pacientes sólo hemos podido determinar la existencia de recidiva locoregional en 67 pacientes (82.71%), de los cuales 56 no presentan recidiva locoregional (83.5%) y 11 si la presentan (16.42%); tenemos pues un 17.2% de pérdida de información (14 pacientes).

**Recidiva a distancia:**

De 81 pacientes sólo tenemos 66 como muestra válida pues no hemos conseguido información para este parametro en 15 pacientes, lo que supone un 18.51% de pérdida de información.

**Exitus:**

Para poder determinar la existencia o no de exitus y si está o no relacionado con el cáncer de colon tenemos una muestra válida de 74 pacientes, lo que supone el 91.35% de la muestra total objeto de estudio (N=81). De la muestra válida, 23 casos han sido exitus relacionado con la enfermedad (31.08%).

**Tabla 4.1.2:** Distribución de las variables categóricas del estudio

Variable	N	%	Variable	n	%	Variable	n	%
<b>Tamaño del tumor</b>			<b>Estadio Dukes</b>			<b>Infiltración ganglionar</b>		
<4	25	32.47%	A	2	2.47%	No	46	56.79%
4-6	31	40.26%	B1	9	11.11%	Sí	35	43.20%
>=6	21	27.27%	B2	29	35.80%	<b>Infiltración ganglionar</b>		
<b>Localización</b>			B3	2	2.47%	N0	46	56.79%
ASCENDENTE	42	51.85%	C1	1	1.23%	N1	21	25.92%
TRANSVERSO	10	12.35%	C2	26	32.09%	N2	14	17.28%
DESCENDENTE	29	35.80%	C3	3	3.70%	<b>Recidiva loco-regional</b>		
<b>Perforación</b>			D	9	11.11%	Sí	11	16.42%
No	74	91.36%	<b>Estadio TMN</b>			No	56	83.58%
Sí	7	8.64%	EI	11	13.58%	<b>Recidiva distante</b>		
<b>Obstrucción</b>			EII	31	38.27%	Sí	11	16.67%
No	58	71.60%	EIII	30	37.04%	No	55	83.33%
Sí	23	28.40%	EIV	9	11.11%	<b>Causa éxitus</b>		
<b>Profundidad tumoral</b>			<b>Tipo histológico</b>			Éxitus relacionado	23	31.08%
T1	2	2.47%	Adenocarcinoma	58	71.60%	Exitus no relacionado con enfermedad	13	17.57%
T2	10	12.35%	Mucrosecretor	23	28.40%	No ha sido exitus	38	51.35%
T3	47	58.02%	<b>Grado de diferenciación</b>					
T4	22	27.16%	BD	16	19.75%			
			MD	39	48.15%			
			PD	3	3.70%			
			Mucosecretor	23	28.40%			

### 4.1.3.-Descripción de variables continuas

La tabla 4.1.3 muestra resultados descriptivos de las variables continuas. Así pues, la media del área vascular en CT fue de 178.99 (I.C.95% [165.42-192.56]); la media del “compactness” vascular en CT fue de 30.38 (I.C.95% [29.35-31.41]); la media de la densidad vascular en CT en la muestra de estudio fue de 22.30 (I.C.95% [20.77-23.82]); la media de densidad vascular en PT en la muestra de estudio fue de 27.00 (I.C.95% [24.66-29.34]); la media del área de fibrosis fue de 24507.53 (I.C.95% [22588.75-26426.32]); la media del perímetro de fibrosis en la muestra de estudio fue de 7622.02 (I.C.95% [7272.13-7971.91]); la media de densidad “compactness” de fibrosis en la muestra de estudio fue de 2734.46

(I.C.95% [2527.78-2941.15]) y la media de la densidad vascular en MM de la muestra de estudio fue de 110.19 (I.C.95% [100.17-120.22])

Tabla 4.1.3: Estadísticos descriptivos de las variables continuas

Variables	Media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mediana	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior				
Edad	68.04	65.43	70.64	68.00	11.780	38	99
Tamaño del tumor	4.905	4.426	5.384	4.500	2.1104	1.5	10.0
Media de área (CT)	178.9954	165.4248	192.5661	170.0780	61.76236	75.04	430.61
Media perímetro (CT)	66.3781	63.6151	69.1412	66.2544	12.57512	44.58	117.96
Media "compactness" (CT)	30.3872	29.3585	31.4159	30.2018	4.68187	22.68	45.88
Densidad vascular (CT)	22.30	20.77	23.82	21.65	6.933	11.40	48.80
Media de área (pt)	232.3819	213.1156	251.6481	225.2257	87.68392	106.62	478.46
Media perímetro (pt)	80.1712	76.2795	84.0629	81.0038	17.71175	49.24	143.69
Media "compactness" (pt)	35.6894	34.3140	37.0649	34.4740	6.25994	24.46	57.84
Densidad vascular (PT)	27.00	24.66	29.34	25.75	10.642	7.7	60.7
Media de área (F)	24507.5391	22588.7538	26426.3243	22889.3125	8622.23872	9484.13	50431.88
Media perímetro (F)	7622.0203	7272.1305	7971.9101	7719.6875	1572.26203	3765.75	11044.88
Media "compactness" (F)	2734.4685	2527.7800	2941.1570	2702.3151	928.77387	376.68	6833.59
Media de área (MM)	79.0139	72.4687	85.5591	73.4567	28.83706	34.49	183.52
Media perímetro (MM)	43.8201	41.2553	46.3849	42.6633	11.30006	25.96	72.56
Media "compactness" (MM)	26.8409	25.4709	28.2108	25.9253	6.03561	18.43	44.90
VASOS_MM	110.19	100.17	120.22	101.00	44.179	47	300

#### 4.2.- CORRELACION DE CT, PT MM Y F CON LAS VARIABLES CONTINUAS DEL ESTUDIO (EDAD,TAMAÑO TUMORAL).

(Nota:En el estudio de supervivencia se completará más adelante con las otras dos variables continuas SLE y SG)

##### 4.2.1.- Correlacion entre angiogénesis de zona CT con las variables continuas de estudio (edad,tamaño tumoral)

Como podemos ver en la **tabla 4.2.1.1** ni cuantitativa ni cualitativamente CT mostró correlación estadísticamente significativa con los parámetros continuos de estudio.

**Tabla 4.2.1.1.-: Resultados del análisis de correlación entre el grado de angiogénesis de la zona CT con la edad y el tamaño del tumor.**

			Edad	Tamaño del tumor
Media de área (CT)	Correlación de Pearson	de	.030	-.025
	Sig. (bilateral)		.792	.828
	N		81	77
Media perímetro (CT)	Correlación de Pearson	de	-.073	.000
	Sig. (bilateral)		.519	.998
	N		81	77
Media "compactness" (CT)	Correlación de Pearson	de	-.142	-.076
	Sig. (bilateral)		.206	.509
	N		81	77
Densidad vascular (CT)	Correlación de Pearson	de	.058	-.100
	Sig. (bilateral)		.607	.389
	N		81	77

**4.2.2.- Correlación entre angiogénesis de zona PT con las variables continuas de estudio(edad,tamaño tumoral).**

Ni cuantitativa ni cualitativamente PT mostró correlación estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros continuos de estudio.

**Tabla 4.2.2.1: Resultados del análisis de correlación entre el grado de angiogénesis de la zona PT con la edad y el tamaño del tumor.**

		Edad	Tamaño del tumor
Media de área (pt)	Correlación de Pearson	.051	.019
	Sig. (bilateral)	.653	.868
	N	81	77
Media perímetro (pt)	Correlación de Pearson	.006	-.001
	Sig. (bilateral)	.959	.993
	N	81	77
Media "compactness" (pt)	Correlación de Pearson	.029	-.063
	Sig. (bilateral)	.801	.589
	N	81	77
Densidad vascular (PT)	Correlación de Pearson	-.043	-.033
	Sig. (bilateral)	.702	.774
	N	81	77

**4.2.3.- Correlación entre angiogénesis de zona MM con las variables continuas de estudio(edad,tamaño tumoral).**

La **tabla 4.2.3.1** muestra los resultados del análisis de correlación entre el grado de angiogénesis de la zona MM con la edad y el tamaño del tumor. Ni cuantitativa ni cualitativamente CT mostró correlación estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros contínuos de estudio.

**Tabla 4.2.3.1: Resultados del análisis de correlación entre el grado de angiogénesis de la zona MM con la edad y el tamaño del tumor**

		Edad	Tamaño del tumor
Media de área (MM)	Correlación de Pearson	-.080	-.057
	Sig. (bilateral)	.491	.633
	N	77	73
Media perímetro (MM)	Correlación de Pearson	.014	-.074
	Sig. (bilateral)	.901	.533
	N	77	73
Media "compactness" (MM)	Correlación de Pearson	.073	-.111
	Sig. (bilateral)	.526	.350
	N	77	73
Densidad vascular (MM)	Correlación de Pearson	-.059	.106
	Sig. (bilateral)	.608	.370
	N	77	73

**4.2.4.- Correlación entre las determinaciones de fibrosis con las variables continuas de estudio (edad,tamaño tumoral).**

La **tabla 4.2.4.1** muestra los resultados del análisis de correlación entre las determinaciones de fibrosis con la edad y el tamaño del tumor. La media del perímetro de Fibrosis se correlacionó significativamente y de manera positiva con la edad ( $\rho=0.292$ ;  $p=0.009$ ). La media del "compactness" de fibrosis se correlacionó, pero sólo como tendencia estadística y de manera positiva, con la edad.

**Tabla 4.3.4.1: Resultados del análisis de correlación entre las determinaciones de fibrosis con la edad y el tamaño del tumor**

		Edad	Tamaño del tumor
Media de área (F)	Correlación de Pearson	.108	.034
	Sig. (bilateral)	.342	.771
	N	80	76
Media perímetro (F)	Correlación de Pearson	.292	.079
	Sig. (bilateral)	.009	.497
	N	80	76
Media "compactness" (F)	Correlación de Pearson	.201	.066
	Sig. (bilateral)	.074	.573
	N	80	76

#### 4.3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES MEDICIONES.

##### 4.3.1.- Correlación entre las diferentes mediciones tomadas de CT, PT, MM Y F.

Las tablas 4.3.1.1, 4.3.1.2, 4.3.1.3 y 4.3.1.4 muestran la correlación entre las diferentes mediciones (área, perímetro, “compactness” y densidad vascular) tomadas de CT, PT, MM y F.

Se obtuvo:

- correlación significativa negativa entre la media del perímetro vascular en CT y la media del perímetro de F ( $p=0.011$ );
- correlación positiva casi significativa entre la media del área vascular en CT y MM ( $p=0.095$ ), y entre la media del “compactness” vascular en CT y PT ( $p=0.061$ );
- correlación positiva significativa entre densidad vascular de CT con PT ( $p<0.001$ ) y MM ( $p=0.006$ ).
- correlación significativa positiva entre la media de la densidad vascular en CT y la media de la densidad vascular en PT ( $p<0.001$ ) y en MM ( $p=0.006$ ).

**Tabla 4.3.1.1: Correlaciones entre área CT, PT, MM y F.**

		área (CT)	área (pt)	área (MM)
área (pt)	Correlación de Pearson	.062	1	
	Significación (p)	.579	.	
área (MM)	Correlación de Pearson	.192	.008	1
	Significación (p)	.095	.944	.
área (F)	Correlación de Pearson	-.002	-.164	-.107
	Significación (p)	.985	.146	.353



**Tabla 4.3.1.2: Correlaciones entre perímetro CT, PT, MM y F**

		perímetro (CT)	perímetro (pt)	perímetro (MM)
perímetro (pt)	Correlación de Pearson	.148	1	
	Significación (p)	.184	.	
perímetro (MM)	Correlación de Pearson	.089	.017	1
	Significación (p)	.443	.886	.
perímetro (F)	Correlación de Pearson	-.282	-.122	.069
	Significación (p)	.011	.283	.552

**Tabla 4.3.1.3 Correlaciones entre "Compactness" CT, PT, MM y F**

		compactness (CT)	compactness (pt)	compactness (MM)
"compactness" (pt)	Correlación de Pearson	.208	1	
	Significación (p)	.061	.	
"compactness" (MM)	Correlación de Pearson	.009	.077	1
	Significación (p)	.941	.505	.
"compactness" (F)	Correlación de Pearson	.065	-.138	.115
	Significación (p)	.569	.223	.321

**Tabla 4.3.1.4 Correlaciones entre densidad vascular de CT, PT y MM.**

		Densidad vascular (CT)	Densidad vascular (PT)
Densidad vascular (PT)	Correlación de Pearson	.439	1
	Significación (p)	.000	.
Densidad vascular (MM)	Correlación de Pearson	.312	.169
	Significación (p)	.006	.141

### **4.3.2 Correlación entre las diferentes mediciones tomadas de fibrosis con la densidad vascular de las zonas tumorales CT,PT y MM.**

- Existe una correlación significativa positiva entre el área media de fibrosis con la media de la densidad vascular en PT ( $p=0.40$ ); entre el perímetro medio de fibrosis con la densidad vascular en CT ( $p=0.018$ ); y entre la media del “compactness” de fibrosis con la media de la densidad vascular en MM ( $p=0.003$ ).
- Existe una correlación positiva casi significativa entre la media del área de fibrosis con la media de la densidad vascular en CT ( $p=0.94$ ).
- Obtenemos una correlación significativa pero negativa entre la media del área de fibrosis con la media de la densidad vascular en MM ( $p=0.020$ ).

**Tabla 4.3.2.1 Correlaciones de área, perímetro y “compactness” de F con densidad vascular (CT, MM y PT)**

		Densidad vascular (CT)	Densidad vascular (MM)	Densidad vascular (PT)
Media de área (F)	Correlación de Pearson	.189	-.266	.230
	Sig. (bilateral)	.094	.020	.040
Media perímetro (F)	Correlación de Pearson	.263	.037	.105
	Sig. (bilateral)	.018	.751	.355
Media “compactness” (F)	Correlación de Pearson	.164	.338	-.024
	Sig. (bilateral)	.146	.003	.832

### **4.3.3.- Correlación entre las diferentes mediciones de angiogenesis dentro de cada una de las zonas de estudio.**

#### **4.3.3.1.- Correlaciones de la zona CT**

Se obtiene una correlación significativa positiva entre la media del área y perímetro vascular ( $p < 0,001$ ), y entre media del compactness y perímetro vascular ( $p < 0,001$ ). Y una correlación positiva casi significativa entre la media del área y “compactness” vascular ( $p = 0,075$ ). Se obtiene una correlación significativa pero negativa entre la media de la densidad vascular con el “compactness” y perímetro vascular en CT ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 4.3.3.1.1 Correlaciones zonas de CT**

		Media de area (CT)	Media perímetro (CT)	Media “compactness” (CT)
Media perímetro (CT)	Correlación de Pearson	.852	1	.638
	Sig. (bilateral)	.000	.	.000
	N	82	82	82
Media “compactness” (CT)	Correlación de Pearson	.198	.638	1
	Sig. (bilateral)	.075	.000	.
	N	82	82	82
Densidad vascular (CT)	Correlación de Pearson	-.132	-.369	-.463
	Sig. (bilateral)	.236	.001	.000
	N	82	82	82

#### **4.3.3.2.- Correlaciones de la zona MM**

Se obtuvo una correlación significativa positiva entre la media del área y perímetro vascular ( $p < 0.001$ ), así como entre la media del perímetro y “compactness” vascular ( $p < 0.001$ ). Y una correlación significativa positiva entre el área y “compactness” vascular ( $p < 0.001$ ). Obtuvimos una correlación significativa pero negativa entre la media de la densidad vascular y “compactness” vascular ( $p = 0.011$ ).

**Tabla 4.3.3.2.1: Correlaciones de zonas de MM**

		Media de área (MM)	Media perímetro (MM)	Media "compactness" (MM)
Media perímetro (MM)	Correlación de Pearson	.892	1	.897
	Sig. (bilateral)	.000	.	.000
	N	77	77	77
Media "compactness" (MM)	Correlación de Pearson	.617	.897	1
	Sig. (bilateral)	.000	.000	.
	N	77	77	77
Densidad vascular (MM)	Correlación de Pearson	-.034	-.181	-.287
	Sig. (bilateral)	.769	.116	.011
	N	77	77	77

**4.3.3.3.- Correlaciones de la zona PT**

Se obtuvo una correlación significativa positiva entre la media del área y "compactness" vascular, con el perímetro ( $p < 0.001$  y  $p < 0.001$  respectivamente), y entre la media del área con el compactness ( $p = 0.011$ ). También se obtuvo una correlación pero en este caso negativa y solo con tendencia a la significación, entre la densidad vascular y el área vascular medio en PT ( $p = 0.093$ )

**Tabla 4.3.3.3.1: Correlaciones de PT**

		Media de área (pt)	Media perímetro (pt)	Media "compactness" (pt)
Media perímetro (pt)	Correlación de Pearson	.868	1	.684
	Sig. (bilateral)	.000	.	.000
	N	82	82	82
Media "compactness" (pt)	Correlación de Pearson	.279	.684	1
	Sig. (bilateral)	.011	.000	.
	N	82	82	82
Densidad vascular (PT)	Correlación de Pearson	-.187	-.116	.164
	Sig. (bilateral)	.093	.298	.141
	N	82	82	82

#### **4.3. 4.-Correlaciones entre si de las diferentes mediciones tomadas de fibrosis (área, perímetro y “compactness”)**

Como vemos en la **tabla 4.3.4** obtuvimos una correlación significativa positiva entre las medias del perímetro de fibrosis con el área y compactness ( $p < 0.001$  y  $p < 0.001$  respectivamente). Y una correlación significativa pero negativa entre las medias del área y compactness de fibrosis ( $p = 0,008$ ).

**Tabla 4.3.4 Correlaciones entre las diferentes mediciones de Fibrosis**

		Media de área (F)	Media perímetro (F)	Media “compactness” (F)
Media perímetro (F)	Correlación de Pearson	.453	1	.648
	Sig. (bilateral)	.000	.	.000
	N	80	80	80
Media “compactness” (F)	Correlación de Pearson	-.292	.648	1
	Sig. (bilateral)	.008	.000	.
	N	80	80	80

#### **4.4.- RESULTADOS DE ANGIOGÉNESIS**

En este apartado se presentan resultados del análisis bivariante llevado a cabo de los parámetros obtenidos en las diferentes zonas tumorales (CT, PT y MM) con el resto de variables incluidas en el estudio.

Inicialmente se presentan los resultados que contrastan si existen diferencias estadísticamente significativas de medias de área, perímetro, “compactness” y densidad vascular entre los zonas de estudio CT, PT y MM, y se analiza su posible relación con grado de diferenciación, estadio Dukes, profundidad tumoral, ganglio y localización. Posteriormente se analiza para cada parámetro su posible relación con el resto de variables y finalmente se

estudia la angiogenesis dividiendo a la muestra en dos grupos, hiper e hipovasular, en relación a la media de la densidad vascular.

#### **4.4.1 Comparación CT, PT, MM.**

Como vemos en la **tabla 4.4.1** se obtuvo que existen diferencias estadísticamente significativas de medias de área, perímetro, “compactness” y densidad vascular entre las distintas zonas de estudio CT, PT y MM (Greenhouse-Geisser=115.56,  $p<0.001$ ; G-G=134.475,  $p<0.001$ ; F=54.103,  $p<0.001$ ; y G-G=124.63,  $p<0.001$ , respectivamente). Siendo las zonas PT las que presentan los valores superiores, tanto para las variables angiogénicas cuantitativas como cualitativas, seguida posteriormente por las zonas CT y finalmente las MM.

**Tabla 4.4.1: Diferencias en las mediciones entre las distintas zonas de estudio**

VARIABLE	CT	PT	MM
MEDIA ÁREA	179.610364	231.932217	79.013935
MEDIA PERÍMETRO	66.137930	79.900307	43.820053
MEDIA “COMPACTNESS”	30.117806	35.624198	26.840858
DENSIDAD VASCULAR	22.51	24.92	11.01

##### **4.4.1.1.- Medias de angiogénesis según parámetros de estudio**

A continuación se muestran los resultados del análisis realizado para determinar si los valores medios de área, perímetro, compactness y densidad vascular, en las zonas PT, CT y MM, tienen comportamiento similar independientemente de los parámetros de estudio (estadio de Dukes, profundidad tumoral, infiltración ganglionar, localización y grado de diferenciación).

##### **4.4.1.1.1.- Resultados Área**

La **tabla 4.4.1.1.1** muestra los valores medios de área de PT, CT y MM según los parámetros de estudio. De manera descriptiva se observa que, independientemente del parámetro de estudio, los valores medios de área PT son superiores a los de CT y éstos son

superiores a los de MM. Las pruebas estadísticas confirman que ninguno de los parámetros de estudio considerados modifican este comportamiento observado de  $PT > CT > MM$  de manera significativa. Sí se observa alguna excepción, como la media de área de PT en el estadio Dukes D, que en vez de ser superior a la observada para CT, es inferior (aunque esta excepción no llega a ser estadísticamente significativa con respecto al resto de estadios de duke considerados,  $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1,54$ ;  $gl=4,81$ ;  $p=0,18$ ).

**Tabla 4.4.1.1.1: Medias de área de PT, CT y MM según parámetros de estudio**

		Media de área (PT)	Media de área (CT)	Media de área (MM)
Estadio Duke ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1.54$ ; $p=0.18$ )	A-B1	258.8	190.7	93.9
	B2-B3	234.7	170.7	79.6
	C1-C3	239.0	184.0	70.1
	D	167.6	180.8	89.4
Profundidad tumoral ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.99$ ; $p=0.4$ )	T1-T2	254.4	187.7	91.3
	T3	218.8	179.6	73.0
	T4	248.2	174.7	85.4
Infiltración Ganglionar ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.38$ ; $p=0.63$ )	No	235.8	173.8	81.1
	Sí	229.0	186.4	73.4
Localización ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.8$ ; $p=0.5$ )	ASCENDENTE	229.0	177.1	76.1
	TRANSVERSO	224.2	139.7	82.2
	DESCENDENTE	239.3	196.6	82.6
Grado de diferenciación ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.49$ ; $p=0.7$ )	BD	251.0	195.1	91.5
	MD	216.3	176.0	79.0
	PD	244.1	175.0	70,7

#### 4.4.1.1.2.- Resultados Perímetro.

La tabla 4.4.1.1.2. muestra los valores de perímetro de PT, CT y MM según los parámetros de estudio. De manera descriptiva se observa que, independientemente del parámetro de estudio, los valores medios de perímetro de PT son superiores a los de CT y éstos son superiores a los de MM. Las pruebas estadísticas confirman que ninguno de los

parámetros de estudio considerados modifican este comportamiento observado de PT>CT>MM de manera significativa.

**Tabla 4.4.1.1.2.: Medias de perímetro de PT, CT y MM según parámetros de estudio**

		Media perímetro (PT)	Media perímetro (CT)	Media perímetro (MM)
Estadio Dukes ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1.53$ ; $p=0.18$ )	A-B1	87.5	71.5	47.3
	B2-B3	82.5	64.9	44.5
	C1-C3	78.0	66.7	40.1
	D	69.3	64.1	49.7
Profundidad tumoral ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.105$ ; $p=0.38$ )	T1-T2	86.4	70.6	46.4
	T3	77.7	66.7	41.9
	T4	81.5	63.4	46.6
Infiltración Ganglionar ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.9$ ; $p=0.4$ )	No	82.8	66.0	45.4
	Sí	76.8	66.4	41.6
Localización ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.36$ ; $p=0.82$ )	ASCENDENTE	78.4	64.9	42.1
	TRANSVERSO	82.2	61.0	43.7
	DESCENDENTE	81.7	70.3	46.6
Grado de diferenciación ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.47$ ; $p=0.74$ )	BD	84.2	70.6	46.3
	MD	79.0	65.1	45.0
	PD	79.1	65.6	40.3

#### 4.4.1.1.3.- Resultados de “Compactness”.

La **tabla 4.4.1.1.3.** muestra los valores medios de compactness de PT, CT y MM según los parámetros de estudio. De manera descriptiva se observa que, independientemente del parámetro de estudio, los valores medios de compactness PT son superiores a los de CT y éstos son superiores a los de MM. Las pruebas estadísticas confirman que ninguno de los parámetros de estudio considerados modifican este comportamiento observado de PT>CT>MM de manera significativa.



**Tabla 4.4.1.1.3.: Medias de “compactness” de PT, CT y MM según parámetros de estudio**

		Media “compactness” (PT)	Media “compactness” (CT)	Media “compactness” (MM)
Estadio Duke ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1.63$ ; $p=0.15$ )	A-B1	38.5	33.4	27.7
	B2-B3	36.8	30.0	27.4
	C1-C3	33.6	30.3	25.0
	D	35.6	27.8	30.1
Profundidad tumoral ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.85$ ; $p=0.49$ )	T1-T2	37.9	32.8	27.2
	T3	35.2	30.4	26.2
	T4	35.4	28.8	28.1
Infiltración Ganglionar ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1.15$ ; $p=0.32$ )	No	37.2	30.7	27.9
	Sí	33.8	29.6	25.7
Localización ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.89$ ; $p=0.47$ )	ASCENDENTE	35.0	29.4	25.7
	TRANSVERSO	38.9	31.2	26.9
	DESCENDENTE	35.5	31.3	28.7
Grado de diferenciación ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=1.46$ ; $p=0.22$ )	BD	35.6	31.4	26.6
	MD	36.4	29.8	28.2
	PD	34.6	30.5	24.9

(OBSERVACIÓN: EN ESTADIO DUKES SE OBTIENE SIGNIFICACIÓN, ESTO ES DEBIDO A QUE EN “D” LOS VALORES SON MUY SUPERIORES AL DEL RESTO DE ESTADIOS; EVIDENTEMENTE NO VALIDA LA RELACIÓN PT>CT>MM SINO QUE, PARA ESTA CATEGORÍA, ES TODAVÍA MÁS FUERTE; LAS VECES EN QUE HA HABIDO ALGUNA EXCEPCIÓN DESCRIPTIVA O SIGNIFICACIÓN, COMO OCURRE AHORA Y PARA EL ÁREA O EL COMPACTNESS, INTERVIENE EL ESTADIO “D”; HAY QUE TENER CUIDADO YA QUE ESTA CATEGORÍA ES LA QUE MENOS MUESTRA TIENE Y POR LO TANTO ESOS RESULTADOS SE DEBEN A LA FALTA DE MUESTRA Y NO AL PROPIO ESTADIO)

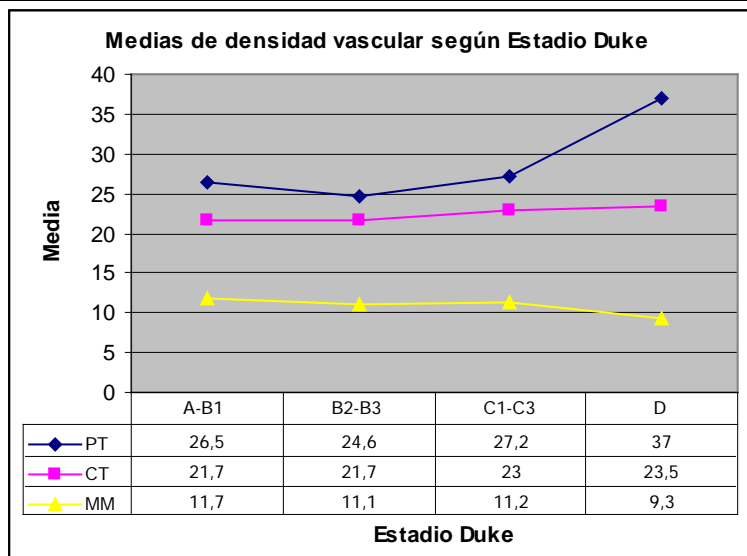
#### 4.4.1.1.4.- Resultados de densidad vascular.

La **tabla 4.4.1.1.4.** muestra los valores medios de densidad vascular de PT, CT y MM según los parámetros de estudio. De manera descriptiva se observa que, independientemente del parámetro de estudio, los valores medios de densidad vascular PT son superiores a los de CT y éstos son superiores a los de MM. Las pruebas estadísticas confirman que ninguno de los parámetros de estudio considerados modifican este comportamiento observado de PT>CT>MM de manera significativa.

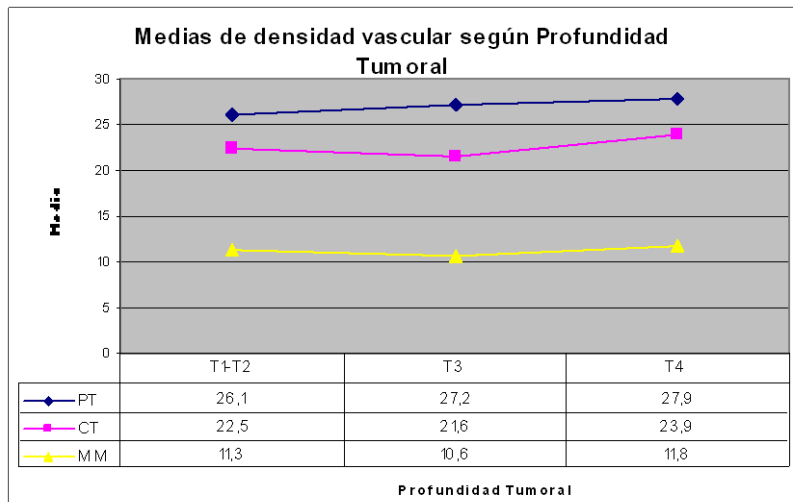
**Tabla 4.4.1.1.4: Medias de densidad vascular de PT, CT y MM según parámetros de estudio**

		Densidad vascular (PT)	Densidad vascular (CT)	Densidad vascular (MM)
Estadio Dukes ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=3$ ; $p=0.013$ )	A-B1	26.5	21.7	11.7
	B2-B3	24.6	21.7	11.1
	C1-C3	27.2	23.0	11.2
	D	37.0	23.5	9.3
Profundidad tumoral ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.3$ ; $p=0.84$ )	T1-T2	26.1	22.5	11.3
	T3	27.2	21.6	10.6
	T4	27.9	23.9	11.8
Infiltración Ganglionar ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.47$ ; $p=0.58$ )	No	26.3	21.7	10.8
	Sí	28.8	23.5	11.1
Localización ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.74$ ; $p=0.54$ )	ASCENDENTE	27.9	24.3	11.6
	TRANSVERSO	26.7	20.2	12.8
	DESCENDENTE	26.4	20.4	9.5
Grado de diferenciación ( $F_{\text{Greenhouse-Geisser}}=0.68$ ; $p=0.58$ )	BD	25.1	21.8	11.3
	MD	28.4	22.6	10.4
	PD	26.8	22.4	11.8

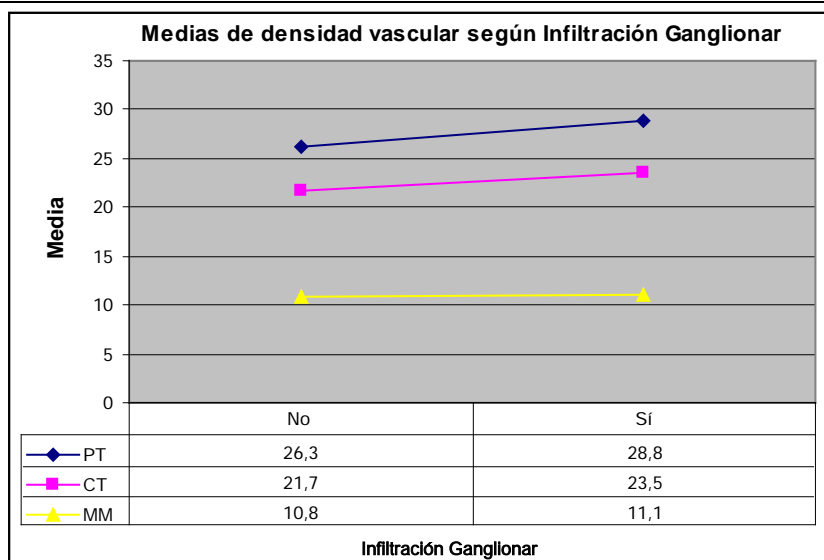
A continuación se muestran las gráficas en las que se visualiza como los valores medios de densidad vascular de PT son superiores a los de CT y éstos son superiores a los de MM según los distintos parámetros de estudio.



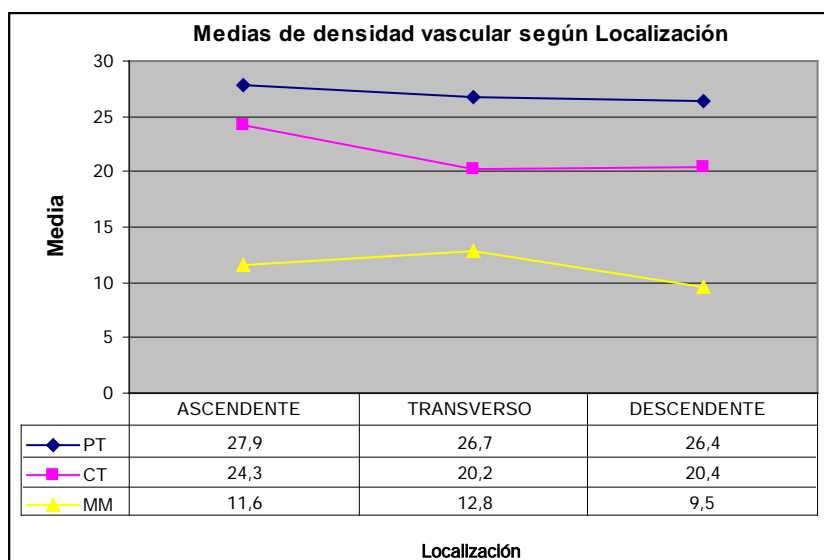
**Gráfica 4.4.1.1.4.1 Medias de densidad vascular en distintas zonas de estudio según el estadio de Dukes**



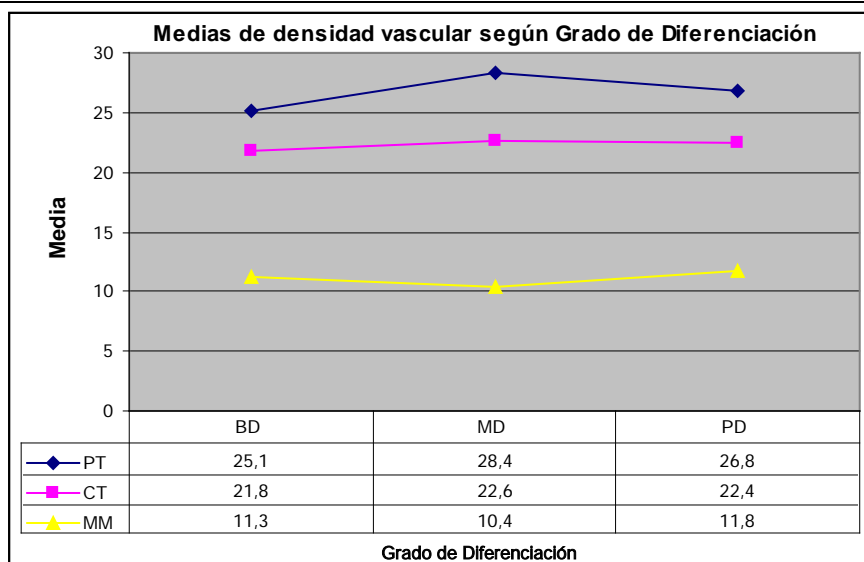
**Gráfica 4.4.1.1.4.2 Medias de densidad vascular en distintas zonas de estudio según la profundidad tumoral.**



**Grafica 4.4.1.1.4.3 Medias de densidad vascular en distintas zonas de estudio según la infiltración ganglionar.**



**Grafica 4.4.1.1.4.4 Medias de densidad vascular en distintas zonas de estudio según la localización tumoral.**



**Grafica 4.4.1.1.4.5 Medias de densidad vascular en distintas zonas de estudio según el grado de diferenciación.**

#### **4.4.2.-Resultados del análisis bivalente CT, PT, MM, con el resto de parámetros de estudio.**

##### **4.4.2.1.-CT**

El área de CT muestra un valor medio en localización transverso significativamente inferior al observado en localización descendente, mientras que en perímetro de CT es localización ascendente la que obtiene un valor medio inferior, aunque no llega a ser significativo. Respecto al Estadio de Dukes, el perímetro de CT muestra un valor medio en A-B1 superior al observado en el estadio D, aunque no llega a ser estadísticamente significativo. Resultado similar se obtiene con “compactness”. Respecto a profundidad tumoral, el grupo T1-T2 presenta una media de “compactness” superior a la obtenida en T4, no siendo estadísticamente significativas. Si se obtienen diferencias de medias estadísticamente significativas en cuanto a la afectación ganglionar, presentando N0 una media significativamente superior de “compactness” respecto a N2.

En cuanto a enfermedad metastásica se observó una tendencia a la significación, presentando un valor medio de “compactness” menor en el grupo de enfermos metastásicos. Por último,

individuos con localización ascendente presentaron una media de densidad vascular significativamente superior a la de los individuos con localización descendente.

**Tabla 4.4.2.1.: Resume los resultados obtenidos para el parámetro CT.**

<b>CT</b>	<b>Variables indep.</b>	<b>Prueba estadística</b>	<b>Significación (p)</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Área</b>	Localización	F=3.39	0.039	Transverso<Descendente
<b>Perímetro</b>	Localización	F=2.72	0.072	Ascendente<Descendente
	Estadio Duke	F=2.17	0.051	A-B1>D
<b>“Compactness”</b>				
	Profundidad Tumoral	F=3	0.056	T1-T2>T4
	Estadio Duke	F=2.62	0.057	A-B1>D
	Ganglios	F=3.32	0.041	N0>N2
	Enfermedad metastásica	F=2.82	0.097	Sí<No
<b>Densidad vascular</b>	Localización	F=3.61	0.032	Ascendente>Descendente

#### 4.4.2.2.- PT.

Tanto el área como el perímetro en PT mostraron un valor medio en los casos con enfermedad metastásica, significativamente menor que aquellos sin metástasis a distancia.

En cuanto al estadio de Dukes, vemos que los estadios A-B1 presentaron mayor área que los estadios D (aunque no llega a ser estadísticamente significativo, pero muestra una tendencia a la significación); lo mismo ocurre con el perímetro, ya que su valor medio fue menor en el estadio D que en el A-B1, aunque no llega tampoco a ser estadísticamente significativo.

Igualmente en cuanto al “compactness”, los enfermos en estadio A-B1 presentaron un valor medio de “compactness” mayor que los estadios D, sin llegar a ser estadísticamente significativo. Lo que sí alcanzó significación estadística fue que los enfermos con afectación ganglionar(N1) presentaron valores medios de “compactness” menores que los enfermos sin metástasis ganglionares(N0).

Los valores medios de densidad vascular tienden a ser significativamente mayores en los enfermos con enfermedad metastásica a distancia y significativamente mayores en los estadios D frente a estadios B2-B3, así como en los enfermos con afectación metastásica ganglionar N2 frente a N0 y N1

**Tabla 4.4.2.2.: Resume los resultados obtenidos para el parámetro PT.**

<b>PT</b>	<b>Variables indep.</b>	<b>Prueba estadística</b>	<b>Significación (p)</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Área</b>	Estadio Duke	F=2.1	0.1	A-B1>D
	Enfermedad metastásica	Brown-Forsythe=9.47	0.007	Sí<No
<b>Perímetro</b>	Estadio Duke	F=2.17	0.098	A-B1>D
	Enfermedad metastásica	Brown-Forsythe=10.36	0.005	Sí<No
<b>“Compactness”</b>	Estadio Duke	F=2.27	0.087	A-B1>D
	Ganglios	Brown-Forsythe=4.85	0.016	N0>N1
<b>Densidad vascular</b>	Estadio Duke	F=3.58	0.018	B2-B3<D
	Ganglios	Brown-Forsythe=4.08	0.026	N2>N0 y N1
	Enfermedad metastásica	Brown-Forsythe=4.08	0.071	Sí>No

#### **4.4.2.3.-. MM.**

En cuanto a los valores medios del área, perímetro y “compactness” en el borde sano, ninguna variable alcanzó significación estadística; sólo encontramos algunas variables que tienden a ser estadísticamente significativas:

-Los enfermos obstruidos tenían valores medios del área mayores en su borde sano que los que no lo estaban (p=0.051).

-Los tumores BD tenían valores medios del área en su borde sano mayores que los PD (p=0.08).

-Los adenocarcinomas tenían valores medios del área en su borde sano mayores que los adenocarcinomas mucoscretorios (p=0.077).

-Los tumores que no llegaron a dar afectación ganglionar(N0) tenían valores medios en su borde sano mayores de área y perímetro que los N1.

-Los tumores con diseminación metastásica a distancia (M1) también tenían valores medios mayores de área, perímetro y “compactness”, en su borde sano, que los M0.

-Los estadios tumorales C1-C3 tenían un perímetro medio menor en los vasos de su borde sano que los tumores en estadio D (p=0.082).

-En relación a la densidad vascular, los tumores de localización descendente tienen menor recuento vascular en su borde sano que los localizados en ascendente y transversal. Y en cuanto al tamaño, los tumores menores de 4-6 cm presentaron también menor recuento vascular en su borde sano que los  $\geq 6$  cm.

**Tabla 4.4. 2.3: Resumen de los resultados obtenidos para el parámetro MM**

MM	Variables indep.	Prueba estadística	Significación	Observaciones
<b>Área</b>	Grado diferenciación	F=2.61	0.08	BD>PD
	Estadio Dukes	F=2.33	0.081	A1-B1>C1-C3
	Obstrucción	F=3.92	0.051	Sí>No
	Tipo histológico	F=3.21	0.077	Adenocarcinoma>Mucrosecretor
<b>Perímetro</b>	Estadio Dukes	F=2.33	0.082	D>C1-C3
	Localización	F=2.61	0.08	Descendente<Ascendente y Transverso
<b>“Compactness”</b>	Enfermedad metastásica	F=2.77	0.1	Sí>No
<b>Densidad vascular</b>	Tamaño del tumor	F=2.47	0.09	4-6<(>=6)
	Localización	F=2.61	0.08	Descendente<Ascendente y Transverso



#### **4.4.3.- Resultados de las comparaciones al dividir la muestra en hipo e hipervascular en relación a la media de la densidad vascular.**

##### **4.4.3.1 Zonas CT**

- *No se encontraron diferencias significativas en CT* entre ambos grupos, en relación a:
  - la distribución de los pacientes por grado de diferenciación, tamaño tumoral, enfermedad metastásica, estadio de Dukes, aspecto macroscópico, grupos de edad, existencia o no de recidiva loco-regional o a distancia, ni por la profundidad tumoral.
- *Se encontraron diferencias casi significativas* entre ambos grupos en CT en relación a:
  - Afectación ganglionar: aunque en ambos grupos son más frecuentes los casos N0, seguido de los N1 y N2, en el grupo hipervascular fueron casi significativamente más frecuentes los N2 que en el grupo hipovascular, y en el grupo hipovascular fueron casi significativamente más frecuentes los casos N0 que en el grupo hipervascular ( $p=0.059$ ).
  - Localización tumoral: en el grupo hipervascular fue casi significativamente más frecuente la ascendente, seguida de la descendente y la transversa; en el grupo hipovascular la localización casi significativamente más frecuente fue la descendente seguida de la transversa y la ascendente ( $p=0.083$ ).
- *Se encontraron diferencias significativas* entre ambos grupos en relación a:
  - Sexo: en el grupo hipovascular fueron significativamente más frecuentes los hombres, mientras que en el grupo hipervascular son significativamente más frecuentes las mujeres ( $p=0.033$ )
  - Perímetro de fibrosis: en el grupo hipervascular existió significativamente mayor perímetro de fibrosis que en el grupo hipovascular.

#### 4.4.3.2.- Zonas MM

- *No se encontraron diferencias significativas* entre ambos grupos en relación a:
  - la distribución de los pacientes por tamaño tumoral, infiltración ganglionar, afectación metastásica, estadio Dukes, edad, recidiva loco-regional o a distancia, profundidad tumoral.
- *Se encontraron diferencias casi significativas entre ambos grupos en relación a:*
  - Localización tumoral: en el grupo hipovascular fue casi significativamente más frecuente la localización descendente que en el grupo hipervascular, siendo en este último grupo casi significativamente más frecuente la localización ascendente que en el hipovascular.
  - Sexo: en el grupo hipervascular fue casi significativamente más frecuentes las mujeres y en el hipovascular los hombres.
  - Grado de diferenciación: en el grupo hipovascular fueron casi significativamente más frecuentes los casos MD, mientras que en el grupo hipervascular lo fueron los PD.

#### 4.4.3.3.- Zonas PT

- *No se encontraron diferencias significativas ni casi significativas* al analizar las zonas PT entre el grupo hiper e hipovascular para ningún parámetro estudiado, salvo para la enfermedad metastásica, que fue casi significativamente más frecuente en el grupo hipervascular ( $p=0.068$ ).

La tabla 4.4.3 resume los resultados analíticos obtenidos del análisis bivariante de densidad vascular de CT, PT y MM (corte en media: hipo e hipervascular) con grado de diferenciación, tamaño tumoral, infiltración ganglionar, enfermedad metastásica, estadio de Dukes, aspecto macroscópico, sexo, grupos de edad, existencia o no de recidiva loco-regional o a distancia, profundidad tumoral, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

**Tabla 4.4.3: Análisis bivariante de Densidad vascular hipo e hipervascular de CT, PT y MM.**

Densidad vascular	VARIABLES INDEP.	PRUEBA ESTADÍSTICA	SIGNIFICACIÓN	OBSERVACIONES
CT	Infiltración ganglionar	$\chi^2=5.65$	0.059	Hipovascular-N0 Hipervascular-N2
	Localización	$\chi^2=4.91$	0.086	Hipovascular-descendente
	Sexo	$\chi^2=4.53$	0.033	Hipervascular-mujer
	Área F	T=-2.23	0.029	Hipervascular>hipovascular
	Perímetro F	T=-2.31	0.023	Hipervascular>hipovascular
MM	Grado de diferenciación	$\chi^2=6.62$	0.037	Hipervascular-PD Hipovascular-MD
	Localización	$\chi^2=5.05$	0.08	Hipovascular-descendente Hipervascular-ascendente
	Sexo	$\chi^2=2.83$	0.093	Hipervascular-mujer
PT	Enfermedad metastásica	$\chi^2=3.34$	0.068	Hipervascular-sí

#### 4.5.-RESULTADOS DE LA FIBROSIS:

##### 4.5.1.-Análisis bivariante Fibrosis (F).

- Los tumores que alcanzaron la profundidad T4 presentaron valores medios mayores de área de fibrosis que los T1 y de “compactness” que los T3 (p=0.1 y p=0.09, respectivamente, sin llegar a ser por tanto estadísticamente significativos).
- Los tumores bien diferenciados (BD) presentaron valores medios menores de área que los MD (sin alcanzar significación estadística, p=0.082) y significativamente menores de perímetro que los PD (p=0.045). Los valores medios de “compactness” en los tumores MD son menores que los PD, con tendencia a la significación estadística (p=0.07).

- 
- En cuanto al estadio, sólo llegaron a alcanzar tendencia a la significación estadística el perímetro de fibrosis, cuyos valores medios en los estadios C1-C3 fueron mayores que en los estadios A-B1 ( $p=0.076$ ).
  - Los tumores de colon ascendente presentaron significativamente ( $p=0.036$ ) menor valor medio de perímetro que los de colon descendente.
  - Los tumores ulcerados también presentaron unos valores medios significativamente menores de perímetro que los exofíticos y difusamente infiltrativos ( $p=0.009$ ), y de “compactness” que los difusamente infiltrativos ( $p=0.014$ ).
  - Los tumores de tamaño  $\geq 6$ cm presentaron valores medios mayores de “compactness” que los tumores más pequeños (de 4-6 cm), sin llegar a ser estadísticamente significativos ( $p=0.99$ ).
  - Los pacientes con algún tipo de recidiva loco-regional desarrollaron tumores con valores medios de “compactness” mayores que los enfermos sin recidiva loco-regional, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.
  - Lo mismo ocurrió en cuanto al tipo histopatológico y el “compactness”; los adenocarcinomas mucosecretores presentaron mayores “compactness” que los que no lo son ( $p=0.002$ ).
  - La edad mostró una asociación positiva y estadísticamente significativa en relación a los valores medios de perímetro, y con tendencia a la significación estadística en cuanto a los valores medios de “compactness” ( $p=0.009$  y  $p=0.074$ , respectivamente).
  - Los valores medios de perímetro mostraron una asociación negativa y estadísticamente significativa en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad y

---

supervivencia global ( $p=0.024$  y  $p=0.045$ , respectivamente). En relación al “compactness”, tanto para la supervivencia libre de enfermedad como para la

supervivencia global, existió una asociación negativa, que fue estadísticamente significativa para la primera ( $p=0.047$ ), y con tendencia a la significación para la supervivencia global ( $p=0.078$ ).

**Tabla 4.5.1: Muestra los resultados del análisis bivariante Fibrosis**

<b>E</b>	<b>Variables indep.</b>	<b>Prueba estadística</b>	<b>Signif. (p)</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Área</b>	Profundidad Tumoral	F=2.16	0.1	T1<T4
	Grado de diferenciación	F=2.58	0.082	BD<MD
<b>Perímetro</b>	Edad	Rho Pearson=0.292	0.009	Asociación positiva
	Estadio Dukes	F=2.38	0.076	A-B1<C1-C3
	Localización	F=3.46	0.036	Ascendente>Descendente
	Aspecto macroscópico	F=5.04	0.009	Ulcerado< Exofítico y Difusamente infiltrativo
	Grado de diferenciación	F=3.23	0.045	BD<PD
	Tipo histológico	F=4.09	0.047	Sí>No
	Recidiva loco-regional	F=3.08	0.084	Sí>No
<b>“Compactness”</b>	Edad	Rho Pearson=0.201	0.074	Asociación positiva
	Profundidad Tumoral (T1-T2. T3 y T4)	F=2.44	0.094	T3<T4
	Aspecto macroscópico	F=4.55	0.014	Ulcerado< Difusamente infiltrativo
	Grado de diferenciación	F=2.62	0.079	MD<PD
	Tipo histológico	F=5.6	0.02	Sí>No
	Recidiva loco-regional	F=4.49	0.038	Sí>No
	Tamaño del tumor	F=2.38	0.99	(4-6)<(>=6)

#### 4.6.-. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

Una vez realizado el análisis bivariante, el siguiente paso consistió en analizar factores asociados a cada zona de estudio (CT, PT, MM) en sus diferentes mediciones de angiogénesis (perímetro, área, densidad y “compactness”) y fibrosis (área, perímetro, “compactness”). Como modelo multivariante se optó por la regresión logística binaria, construyendo uno para cada zona y medición de angiogénesis (perímetro CT, densidad MM...), resultando 15 modelos multivariantes. Estos parámetros se dicotomizaron a partir de sus valores medios (ver tabla 4.6.1), siendo la categoría de referencia aquellos valores por debajo de la media. Como variables independientes, para cada modelo, se han incluido aquellas que en el análisis bivariante obtuvieron una significación inferior a 0.1 y otras que, aunque no tuvieran significación estadística, se consideraron clínicamente relevantes (ver tablas 4.6.1 y 4.6.2). Como método de inclusión/exclusión de variables se escogió el método de selección por pasos hacia atrás según la probabilidad del estadístico de Wald, considerando como probabilidad de salida 0.15.

**Tabla 4.6.1. Variables incluidas en los modelos de regresión logística binaria multivariante para las medidas de angiogénesis**

<u>Variables dependientes</u>			Variables independientes (entre paréntesis se indica la categoría de referencia)
Medida angiogénesis	Zona	Punto de corte (valor medio)	
Densidad	CT	22.3	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), sexo (varón), área F ( $\leq 24507.54$ ), perímetro F ( $\leq 7622.02$ ) y metástasis (No)
	PT	27	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	MM	11.02	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), sexo (varón), área F ( $\leq 24507.54$ ), tamaño del tumor ( $<4$ ) y metástasis (No)
Perímetro	CT	66.38	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	80.17	
	MM	43.82	
"compactness"	CT	30.39	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	35.7	
	MM	26.84	
Área	CT	179	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)
	PT	232.38	
	MM	79	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), obstrucción (no), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)

**Tabla 4.6.2. Variables incluidas en los modelos de regresión logística binaria multivariante para fibrosis**

<u>Variables dependientes</u>		Variables independientes (entre paréntesis se indica la categoría de referencia)
Medida fibrosis	Punto de corte (valor medio)	
Perímetro	7622	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), tamaño del tumor ( $<4$ ), aspecto macroscópico (exofítico), edad (continua), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)
"compactness"	2734.47	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0), tamaño del tumor ( $<4$ ), aspecto macroscópico (exofítico), edad (continua), tipo histológico (adenocarcinoma) y metástasis (No)
Área	24507.54	Localización (ascendente), grado diferenciación (BD), profundidad tumoral (T1-T2), infiltración ganglionar (N0) y metástasis (No)

Las tablas de 4.6.3 y 4.6.4 muestran los principales resultados en cuanto al diagnóstico y ajuste de cada modelo construido. Como se puede observar los modelos que presentaron mayor



significación son densidad y perímetro de CT, perímetro y “compactness” de F y “compactness” de PT.

**Tabla 4.6.3: Resultados en cuanto al diagnóstico y ajuste de cada modelo construido en relación a angiogénesis**

<u>VARIABLES DEPENDIENTES</u>		<u>MEDIDAS DE AJUSTE DEL MODELO</u>		
<b>Medida angiogénesis</b>	<b>Zona</b>	$\chi^2$ (sig.)	-2 log verosimilitud	R <sup>2</sup> Nagelkerke
<b>Densidad</b>	<b>CT</b>	19.041 (0.004)	89.4	0.285
	<b>PT</b>	3.34 (0.068)	107.45	0.054
	<b>MM</b>	10.82 (0.013)	89.7	0.184
<b>Perímetro</b>	<b>CT</b>	15.93 (0.003)	96.34	0.238
	<b>PT</b>	4.53 (0.033)	107.74	0.073
	<b>MM</b>	7.95 (0.094)	98.47	0.131
<b>“compactness”</b>	<b>CT</b>	8.82 (0.012)	103.16	0.138
	<b>PT</b>	18.55 (0.001)	90.95	0.276
	<b>MM</b>	3.532 (0.171)	102.96	0 <sup>a</sup>
<b>Área</b>	<b>CT</b>	6.69 (0.035)	105.29	0.106
	<b>PT</b>	3.56 (0.059)	108.42	0.057
	<b>MM</b>	12.34 (0.002)	91.46	0.2

0<sup>a</sup>: modelo sin variables significativas (únicamente constante)

**Tabla 4.6.4. Resultados en cuanto al diagnóstico y ajuste de cada modelo construido en relación a fibrosis**

<u>VARIABLES DEPENDIENTES</u>		<u>MEDIDAS DE AJUSTE DEL MODELO</u>		
<b>Medida fibrosis</b>	<b>Zona</b>	$\chi^2$ (sig.)	-2 log verosimilitud	R <sup>2</sup> Nagelkerke
<b>Perímetro</b>	<b>F</b>	23.31(0.003)	81.83	0.353
<b>“compactness”</b>	<b>F</b>	29.68(<0.001)	80.77	0.414
<b>Área</b>	<b>F</b>	2.11 (0.347)	110.45	0 <sup>a</sup>

0<sup>a</sup>: modelo sin variables significativas (únicamente constante)

En cuanto a la capacidad predictiva de los modelos (**Tablas 4.6.5 y 4.6.6**) estableciendo como punto de corte la probabilidad 0.5, los resultados fueron similares a los obtenidos respecto a su significación, siendo perímetro de F el que mayor porcentaje de predicción correcta presentó.

**Tabla 4.6.5: Muestra la capacidad predictiva de los modelos en relación a la angiogenesis**

<u>Variables dependientes</u>		<u>Medidas de predicción del modelo</u>		
Medida angiogénesis	Zona	FN <sup>1</sup>	FP <sup>2</sup>	PG <sup>3</sup>
Densidad	CT	80.9	51.5	68.8
	PT	93.5	20	61.7
	MM	77.5	54.5	67.1
Perímetro	CT	80.5	62.5	71.6
	PT	20	95.1	58
	MM	87.8	33.3	62.3
"compactness"	CT	27.9	94.4	59.3
	PT	66.7	69.7	67.9
	MM	100	0	61
Área	CT	44.2	81.6	61.7
	PT	18.6	94.7	54.3
	MM	80.4	58.1	71.4

<sup>1</sup>FN (falsos negativos): % de individuos que son clasificados por el modelo correctamente por debajo de la media de la zona de angiogénesis correspondiente

<sup>2</sup>FP (falsos positivos): % de individuos que son clasificados por el modelo correctamente por encima de la media de la zona de angiogénesis correspondiente

<sup>3</sup>PG (porcentaje global): % de individuos que son clasificados correctamente

**Tabla 4.6.6: Muestra la capacidad predictiva de los modelos en relación a la fibrosis.**

<u>Variables dependientes</u>		<u>Medidas de predicción del modelo</u>		
Medida Fibrosis	Zona	FN <sup>1</sup>	FP <sup>2</sup>	PG <sup>3</sup>
Perímetro	F	69.4	80	75
"compactness"	F	69.8	70.3	70
Área	F	100	0	53.8

<sup>1</sup>FN (falsos negativos): % de individuos que son clasificados por el modelo correctamente por debajo de la media de la zona de angiogénesis correspondiente

<sup>2</sup>FP (falsos positivos): % de individuos que son clasificados por el modelo correctamente por encima de la media de la zona de angiogénesis correspondiente

<sup>3</sup>PG (porcentaje global): % de individuos que son clasificados correctamente

A continuación pasamos a describir cada uno de los modelos finalmente obtenidos. Algunas observaciones de cara a la interpretación de los resultados son:

**Tener una OR>1 indica que la categoría de la variable independiente en cuestión, respecto a su categoría de referencia, es un factor de riesgo de tener valores de esa zona por encima de la media. Es decir, los individuos con esa característica tienen más**

**probabilidad que la característica de referencia de tener valores de esa zona por encima de la media (que es el punto de corte establecido para determinar las dos categorías de la variable dependiente) a igualdad del resto de características.**

Tener una  $OR < 1$  indica que la categoría de la variable independiente en cuestión, respecto a su categoría de referencia, es un factor de riesgo de tener valores de esa zona por encima de la media. Es decir, los individuos con esa característica tienen más probabilidad que la característica de referencia de tener valores de esa zona por debajo de la media (que es el punto de corte establecido para determinar las dos categorías de la variable dependiente) a igualdad del resto de características.

#### **4.6.1.- Análisis multivariante de angiogénesis**

##### **4.6.1.1 Densidad de CT**

Como factores asociados a la densidad de CT se obtienen: la profundidad tumoral, la infiltración ganglionar, el sexo y el perímetro de F. Así pues:

- La profundidad tumoral T3 y T4 actúan como factores protectores de tener valores de densidad de CT por encima de la media respecto a la profundidad tumoral T1-T2, aunque no llega a tener significación estadística; es decir, los casos T3 y T4 poseen más probabilidad que los T1-T2 de tener valores de densidad vascular por debajo de la media, no presentando significación estadística para los casos T4, y una tendencia a la significación para los T3.

- Respecto a la Infiltración Ganglionar, N1 y N2 son factores de riesgo respecto a N0, aumentando el riesgo conforme aumenta el nivel de infiltración ( $OR_{N1}=2.6$  y  $OR_{N2}=4.7$ ); ser N1 tiene 2.6 veces más riesgo que ser N0 de tener valores de densidad vascular en CT por encima de la media, no llegando a tener significación estadística. Ser N2 tiene 4.7 veces más riesgo que ser N0 de tener valores de densidad vascular en CT por encima de la media, alcanzando significación estadística ( $p=0.038$ ).
- También el riesgo es mayor en mujeres que en hombres ( $OR_{mujer}=2.89$ ). Ser mujer tiene 2.8 veces más riesgo de tener valores de densidad vascular en CT por encima de la media que ser hombre, alcanzando significación estadística ( $p=0.044$ ).
- Igualmente ocurre con el perímetro de F, donde los valores superiores a su media (7622.02) muestran casi 4 veces más de riesgo de tener valores de densidad de CT por encima de la media, alcanzando significación estadística ( $p=0.017$ ).

**Tabla 4.6.1.1: Muestra los factores asociados a la densidad vascular en CT**

Parámetro angiogénesis	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Densidad CT	Prof tum (T1-T2)			4.625	2	.099			
	Prof tum T3	-1.725	.893	3.730	1	.053	.178	.031	1.026
	Prof tum T4	-.847	.925	.839	1	.360	.429	.070	2.627
	Infil gang (N0)			4.984	2	.083			
	Infil gang N1	.969	.632	2.351	1	.125	2.635	.764	9.094
	Infil gang N2	1.555	.748	4.319	1	.038	4.733	1.093	20.503
	Sexo Mujer	1.061	.527	4.063	1	.044	2.890	1.030	8.113
	Perímetro F > 7622,02	1.349	.567	5.668	1	.017	3.853	1.269	11.697
Constante	-.977	.718	1.851	1	.174	.377			

#### 4.6.1.2 Densidad MM

Localización descendente respecto a ascendente actúa como factor protector de densidad vascular en MM. Es decir, los tumores de localización descendente tienen más probabilidad que los de localización ascendente de tener valores de densidad vascular en su borde sano por debajo

de la media, siendo estadísticamente significativo. Lo mismo ocurre en los que se localizan en transverso, aunque no de manera significativa.

También, valores de área de fibrosis altos (por encima de su media) tienen más probabilidad de tener valores bajos de densidad en MM, siendo casi estadísticamente significativo.

**Tabla 4.6.1.2 Muestra los factores asociados a la densidad vascular en MM**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Densidad MM	Localización (ascendente)			6.638	2	.036			
	Localización Transverso	-.393	.799	.242	1	.623	.675	.141	3.232
	Localización Descendente	-1.500	.583	6.621	1	.010	.223	.071	.699
	Área F >24507,5391	-.948	.516	3.372	1	.066	.388	.141	1.066
	Constante	.744	.412	3.263	1	.071	2.104		

#### 4.6.1.3 Densidad PT

La enfermedad metastásica es factor de riesgo de tener valores de densidad de PT altos (OR=3.58). Es la única zona que obtiene tendencia a la significación (p=0.081).

**4.6.1.3 Muestra los factores asociados a densidad vascular en PT**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Densidad PT	Enfermedad metastásica Sí	1.276	.732	3.044	1	.081	3.583	.854	15.031
	Constante	-.429	.243	3.121	1	.077	.651		

#### 4.6.1.4 Perímetro de CT

La infiltración ganglionar y el grado de diferenciación son factores asociados a perímetro de CT. N1 tiene 4 veces más riesgo respecto a N0 de tener valores de perímetro por encima de la media, mientras que N2, aunque sigue siendo factor de riesgo, no presenta significación estadística. Los grados de diferenciación MD y PD actúan como factores protectores respecto a

BD, siendo estadísticamente significativo en PD. Así pues, los tumores PD tienen más probabilidad que los BD de tener valores de perímetro por debajo de la media.

**Tabla 4.6.1.4 Muestra los factores asociados a perímetro vascular en CT**

Angiogénesis	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Perímetro CT	Infil gang (N0)			5.272	2	.072			
	Infil gang N1	1.413	.616	5.267	1	.022	4.109	1.229	13.739
	Infil gang N2	.386	.667	.335	1	.563	1.471	.398	5.443
	Grado dif (BD)			8.952	2	.011			
	Grado dif MD	-.987	.688	2.061	1	.151	.373	.097	1.434
	Grado dif PD	-2.219	.769	8.326	1	.004	.109	.024	.491
	Constante	.738	.606	1.486	1	.223	2.092		

#### 4.6.1.5 Perímetro PT

La enfermedad metastásica es factor protector de tener valores de perímetro de PT altos (OR=0,205).

**Tabla 4.6.1.5 Muestra los factores asociados a perímetro vascular en PT**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Perímetro PT	Enfermedad metastásica Sí	-1.584	.826	3.680	1	.055	.205	.041	1.035
	Constante	.198	.239	.688	1	.407	1.219		

#### 4.6.1.6.- Perímetro MM

Localización descendente respecto a ascendente actúa como factor de riesgo, mientras que transversal no presenta asociación estadística. Los tumores de localización descendente presentan 3 veces más de riesgo que los de localización ascendente de tener valores medios de perímetro en MM por encima de la media, siendo estadísticamente significativo.

Por otra parte, infiltración ganglionar N1 respecto a N0 actúa como factor protector, siendo casi estadísticamente significativo, mientras que N2 dista mucho de la significación. Los

tumores N1 tienen más probabilidad que los N0 de tener valores medios de perímetro en MM por debajo de la media, siendo casi estadísticamente significativo.

**Tabla 4.6.1.6 Muestra los factores asociados a perímetro vascular en MM**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Perímetro MM	Localización (ascendente)			4.482	2	.106			
	Localización Transverso	-0.015	.765	.000	1	.985	.985	.220	4.412
	Localización Descendente	1.127	.550	4.203	1	.040	3.087	1.051	9.070
	Infil gang (N0)			4.006	2	.135			
	Infil gang N1	-1.211	.624	3.772	1	.052	.298	.088	1.011
	Infil gang N2	-0.024	.644	.001	1	.971	.977	.277	3.449
Constante		-0.206	.398	.267	1	.605	.814		

#### 4.6.1.7. “Compactness” CT

Infiltración ganglionar aparece como único factor asociado a “compactness” de CT, actuando como factor protector en N2 respecto a N0. Es decir, los tumores N2 tienen más probabilidad que los N0 de tener valores medios de “compactness” en CT por debajo de la media, siendo estadísticamente significativo. N1 no muestra significación estadística.

**Tabla 4.6.1.7. Muestra los factores asociados al “compactness” vascular en CT**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
“compactness” CT	Infil gang (N0)			6.646	2	.036			
	Infil gang N1	.486	.537	.816	1	.366	1.625	.567	4.660
	Infil gang N2	-1.792	.819	4.790	1	.029	.167	.033	.829
	Constante	.000	.295	.000	1	1.000	1.000		

#### 4.6.1.8.- “Compactness” PT

Infiltración ganglionar N1 respecto a N0 es factor protector de tener valores de “compactness” PT por encima de la media. Es decir, los casos N1 presentan mayor probabilidad

que los N0 de tener valores vasculares medios de “compactness” en PT por debajo de la media, siendo estadísticamente significativa ( $p=0.022$ ). En el caso de N2 la asociación no es estadísticamente significativa.

En cuanto al grado de diferenciación, aunque el modelo mantiene esta zona, no se observa asociación estadísticamente significativa con “compactness” de PT.

**Tabla 4.6.1.8 Muestra los factores asociados al “compactness” vascular en PT**

Angiogénesis	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
“compactness” PT	Infil gang (N0)			9.747	2	.008			
	Infil gang N1	-2.552	.818	9.735	1	.002	.078	.016	.387
	Infil gang N2	-.434	.650	.446	1	.504	.648	.181	2.315
	Grado dif (BD)			4.539	2	.103			
	Grado dif MD	.618	.680	.827	1	.363	1.855	.490	7.030
	Grado dif PD	-.632	.742	.727	1	.394	.531	.124	2.274
	Constante	.080	.580	.019	1	.891	1.083		

#### 4.6.1.9.- Área CT

Los grados de diferenciación MD y PD actúan como factores protectores respecto a BD, aunque sólo de manera significativa en PD.

**Tabla 4.6.1.9: Muestra los factores asociados al área vascular en CT**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gf	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Área CT	Grado dif (BD)			6.154	2	.046			
	Grado dif MD	-.357	.608	.344	1	.558	.700	.213	2.305
	Grado dif PD	-1.509	.680	4.929	1	.026	.221	.058	.838
	Constante	.511	.516	.979	1	.323	1.667		

#### 4.6.1.10.- Área PT

Enfermedad metastásica aparece como factor protector, con tendencia a la significación estadística ( $OR_{\text{metástasis}}=0,24$ ). Los individuos con metástasis presentan más probabilidad que los no metastásicos de tener valores medios de área vascular en PT por debajo de la media.



**Tabla 4.6.1.10: Muestra los factores asociados a área vascular en PT**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Área PT	Enfermedad metastásica Sí	-1,414	,825	2,936	1	,087	,243	,048	1,226
	Constante	,028	,237	,014	1	,906	1,029		

#### 4.6.1.11.- Área MM

Obstrucción y metástasis aparecen como factores de riesgos asociados a área de MM (OR<sub>obstrucción</sub>=3,31; OR<sub>metástasis</sub>=7,34).

**Tabla 4.6.1.11: Muestra los factores asociados a área vascular en MM**

Variable dependiente	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
								Inf.	Sup.
Área MM	Obstrucción Sí	1,196	,557	4,613	1	,032	3,307	1,110	9,851
	Enfermedad metastásica Sí	1,993	,851	5,482	1	,019	7,340	1,384	38,937
	Constante	-,984	,314	9,841	1	,002	,374		

### 4.6.2.- Multivariante fibrosis.

#### 4.6.2.1.- Perímetro F

Grado de diferenciación, profundidad tumoral, aspecto macroscópico y tamaño del tumor están asociados a perímetro de F, con los siguientes resultados:

- MD y PD son factores de riesgo respecto a BD, observándose que es mayor el riesgo a medida que disminuye el grado de diferenciación, siendo estadísticamente significativo en PD; es decir, los PD presentan 7.2 veces mas riesgo que los MD de tener valores medios de perímetro de fibrosis por encima de la media (OR=7.225;p=0.34.)

- T3 y T4 también actúan como factores de riesgo, aumentando éste a mayor profundidad, y mostrándose tendencia a la significación ( $OR_{T3}=5.6$ ;  $p=0.70$ ) ( $OR_{T4}=7.1$ ;  $p=0.78$ ).
- Respecto al aspecto macroscópico, el ulcerado es factor protector respecto al exofítico (presenta menos probabilidad de tener valores de perímetro de F por encima de la media), mientras que el diseminado infiltrativo no presenta significación estadística.
- Por último, tamaños del tumor por encima de 4 presenta menos probabilidad de tener valores de perímetro de F superiores a la media. Es decir, los tumores de 4-6 cm presentan más probabilidad que los menores de 4 cm de tener valores de perímetro de fibrosis por debajo de la media, siendo estadísticamente significativo ( $OR=0.21$ ;  $p=0.031$ ); y con tendencia a la significación para los  $> 6$ cm.

**Tabla 4.6.2.1: Muestra los factores asociados a perímetro de fibrosis**

Fibrosis	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	Gl	Sig.	OR	I.C.95%	
Perímetro F	Grado dif (BD)			4.568	2	.102			
	Grado dif MD	1.160	.828	1.964	1	.161	3.191	.630	16.168
	Grado dif PD	1.978	.932	4.500	1	.034	7.225	1.162	44.911
	Prof tum (T1-T2)			3.573	2	.168			
	Prof tum T3	1.740	.960	3.286	1	.070	5.697	.868	37.376
	Prof tum T4	1.972	1.119	3.106	1	.078	7.185	.802	64.395
	Aspecto Macros (Exofítico)			10.529	2	.005			
	Aspecto Macros Ulcerado	-2.100	.687	9.333	1	.002	.122	.032	.471
	Aspecto Macros Dis infiltrat	-1.109	.787	.019	1	.890	.897	.192	4.192
	Tamaño tumor(<4)			4.939	2	.085			
	Tamaño tumor 4-6	-1.549	.716	4.674	1	.031	.213	.052	.865
	Tamaño tumor>6	-1.329	.796	2.790	1	.095	.265	.056	1.259
	Constante		-956	.986	.939	1	.333	.385	

#### 4.6.2.1.- “Compactness” F

- La localización descendente actúa como factor protector respecto a la ascendente de tener valores de “compactness” de F por encima de la media.

- Infiltraciones ganglionares N1 y N2 se muestran como factores de riesgo, aunque sólo de manera significativa en N1 ( $OR_{N1}=5.8$  y  $OR_{N2}=1.61$ ). Es decir, los casos N1 presentan más riesgo que los N0 de tener valores medios de “compactness” por encima de la media, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.02$ ).
- Respecto a profundidad tumoral, no se observó significación estadística.
- El aspecto macroscópico ulcerado fué factor protector respecto al exofítico, mientras que el diseminado infiltrativo no presentó significación estadística.
- Por último, metástasis actúa como factor de riesgo ( $OR= 11.76$ ).

**Tabla 4.6.2.2: Muestra los factores asociados a “compactness” de fibrosis**

Fibrosis	Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
“compactness” F	Localización (ascendente)			7.257	2	.027			
	Localización Transverso	.014	.975	.000	1	.989	1.014	.150	6.847
	Localización Descendente	-2.006	.781	6.602	1	.010	.135	.029	.621
	Infil gang (N0)			5.543	2	.063			
	Infil gang N1	1.752	.747	5.504	1	.019	5.764	1.334	24.906
	Infil gang N2	.475	.821	.334	1	.563	1.608	.321	8.038
	Prof tum (T1-T2)			4.296	2	.117			
	Prof tum T3	-.894	.962	.865	1	.352	.409	.062	2.692
	Prof tum T4	.465	1.050	.197	1	.657	1.593	.204	12.460
	Aspecto Macros (Exofítico)			9.125	2	.010			
	Aspecto Macros Ulcerado	-1.743	.720	5.869	1	.015	.175	.043	.717
	Aspecto Macros Dis infiltrat	.799	.826	.935	1	.334	2.222	.440	11.217
	Metástasis Sí	2.465	1.100	5.024	1	.025	11.764	1.363	101.545
Constante	.437	.890	.241	1	.623	1.549			

#### 4.7.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.

Con el fin de estimar modelos para datos de tiempos de espera hasta el suceso casual de un evento con casos censurados presentes, se utilizaron los procedimientos de Kaplan-Meier y la regresión de Cox. El procedimiento de Kaplan-Meier nos permitió contrastar, de manera independiente, la igualdad de las distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de los factores incluidos en el estudio a través de la prueba de Breslow. Una vez identificados aquellos factores pronóstico que eran estadísticamente significativos, se evaluaron sus efectos de manera conjunta mediante el modelo multivariante de Cox. Este proceso se realizó para la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y para la Supervivencia Global (SG). Como evento se definió aquellos casos en los que la muerte estaba relacionada con la enfermedad de estudio. Los casos censurados son aquellos casos para los que no se registró el evento (pérdida del individuo, muerte no relacionada con la enfermedad o seguir vivo hasta la finalización del estudio)

##### 4.7.1.- Supervivencia global

La **tabla 4.7.1.1** muestra los resultados obtenidos del análisis de supervivencia de **Kaplan-Meier** en aquellos modelos en los que se ha detectado asociación estadísticamente significativa o casi significativa ( $p < 0.1$ ). En ella se incluye el factor de estudio, la categoría del factor, el tiempo medio de supervivencia (no se ha incluido la mediana ya que en muchos casos el porcentaje de casos censurados supera el 50%), su error estándar, el porcentaje de casos censurados, la prueba de Breslow y su significación estadística.

- Estadio Dukes: El estadio de Dukes presentó una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia global ( $p < 0.001$ ). Y como podemos ver en la tabla VII.A.1, conforme progresa el estadio de Dukes existe una progresiva disminución del tiempo medio de supervivencia ( $\text{Sup}_{B2-B3}=115$ ,  $\text{Sup}_{C1-C3}=89$ ,  $\text{Sup}_D=13$  meses).
- Profundidad Tumoral: Al igual que el estadio de Dukes, presentó una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia global ( $p=0.001$ ). A mayor profundidad de penetración en la pared existe una progresiva disminución de la supervivencia global ( $\text{Sup}_{T1-T2}=142$ ,  $\text{Sup}_{T3}=111$ ,  $\text{Sup}_{T4}=51$  meses).
- Infiltración ganglionar: La infiltración ganglionar también presentó una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia global ( $p=0.001$ ). Y como podemos ver en la tabla VII.A.1, conforme progresa la afectación ganglionar existe una progresiva disminución del tiempo medio de supervivencia ( $\text{Sup}_{N0}=131$ ,  $\text{Sup}_{N1}=109$ ,  $\text{Sup}_{N2}=26$  meses)
- La enfermedad metastásica a distancia también se asoció significativamente con la supervivencia global ( $P < 0.001$ ), presentando los que poseen metástasis a distancia 16 meses de tiempo medio de supervivencia frente a los 119 meses de los que carecían de dicha afectación.
- Recidiva locorregional y a distancia también se asociaron significativamente con la supervivencia global ( $P < 0.001$  en ambas).
  - Los que presentaron recidiva locorregional tienen un tiempo medio de supervivencia de 27 meses y los que no de 133.
  - Los que presentaron recidiva a distancia tuvieron 25 meses de supervivencia media frente a los 138 de los que no.

- “Compactness” vascular en CT se asoció casi significativamente con la supervivencia global ( $p=0.0679$ ). Los casos que presentaron unos valores medios de “compactness” vascular en CT iguales o por debajo de la media presentaron 91 meses de tiempo medio de supervivencia. Los casos que presentaron valores medios de “compactness” vascular en CT por encima de la media tuvieron 124 meses de tiempo medio de supervivencia.
- “Compactness” de Fibrosis se asoció significativamente con la supervivencia global ( $p=0.0337$ ), presentando mayor tiempo de supervivencia media los casos que tenían valores medios de “compactness” de fibrosis igual o por debajo de la media (124 meses frente a 69 meses).

**Tabla 4.7.1.1: Resultados Supervivencia Global (Kaplan-Meier)**

Factor	Categoría	Tiempo de Supervivencia (Media)	Error Estándar	% casos censurados	Prueba Breslow	Significación
Estadio Dukes	A-B1	-	-	100	40.42	<0.001
	B2-B3	115	8	85.2		
	C1-C3	89	11	55.2		
	D	13	3	25		
Profundidad Tumoral	T1-T2	142	10	90.9	13.73	0.001
	T3	111	9	74.4		
	T4	51	10	45		
Infiltración ganglionar	N0	131	8	85	36.13	<0.001
	N1	109	12	71.4		
	N2	26	6	15.4		
Enfermedad Metastásica	Sí	16	3	22.2	39.48	<0.001
	No	119	7	75.4		
Recidiva Locorregional	Sí	27	5	9.1	39.50	<0.001
	No	133	6	85.4		
Recidiva Distante	Sí	25	4	0	55.49	<0.001
	No	138	6	88.9		
“Compactness” CT	<=media	91	10	60	3.33	0.0679
	>media	124	10	79.4		
“Compactness” F	<=media	124	9	79.5	4.51	0.0337
	>media	69	8	55.9		

El siguiente paso fue estudiar el efecto conjunto de estos factores predictivos significativos, introduciéndolos en modelo de Cox. Como método de exclusión de variables se escogió el de selección por pasos hacia atrás según la probabilidad del estadístico de Wald,

considerando como probabilidad de salida 0.15. Otro de los criterios que determinó la construcción del modelo de Cox, fue el porcentaje de perdidos que se producía al considerar

todas esas variables, yendo desde el 34.1% (con todas las variables) hasta el 11%. Este rango tan amplio de perdidos, viene provocado fundamentalmente por los factores predictores de estadio Dukes y ambas recidivas (locorregional y distante). Así pues, inicialmente se presentan los resultados del modelo sin incluir estos factores (aprovechando el máximo tamaño de muestra), analizando posteriormente los resultados obtenidos cuando consideramos todas las variables, con el fin de contrastar ambos modelos.

La **tabla 4.7.1.2** muestra los resultados del modelo de Cox en el que se han incluido los factores predictivos de profundidad tumoral, infiltración ganglionar, enfermedad metastásica, “compactness” de CT y de F obteniendo como factores predictivos significativos la profundidad tumoral, la infiltración ganglionar y la enfermedad metastásica, actuando todos ellos como factores de riesgo. El modelo es estadísticamente significativo ( $-2 \log$  de la verosimilitud=150.29;  $\chi^2=58.89$ ,  $p<0.001$ ). Así pues, un individuo con profundidad tumoral T3 respecto a otro con profundidad tumoral T1-T2, y a igualdad de condiciones en el resto de parámetros (infiltración ganglionar y los N2, 3,7; siendo dicho riesgo sólo enfermedad metastásica), tiene 1,5 veces más riesgo de presentar el evento de estudio (muerte). En el caso de los individuos con profundidad T4, el riesgo es casi 5 veces mayor. En ambos casos, el riesgo no es estadísticamente significativo, aunque sí muestra tendencia a la significación. Con infiltración ganglionar ocurre de manera similar que con profundidad tumoral (los casos N1 presentan 1.8 veces mayor riesgo de morir que los N0 estadísticamente significativo para los N2 con una  $p=0.42$ ), mientras que tener enfermedad metastásica tiene casi 7 veces más riesgo de morir que un individuo que no la ha tenido, con una  $p=0.005$ .

**Tabla 4.7.1.2: Modelo de Cox. Supervivencia Global.**

Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	G1	Sig.	OR	I.C.95%	
							Inf.	Sup.
Prof tum (T1-T2)			6.720	2	.035			
Prof tum T3	.416	1.096	.144	1	.705	1.516	.177	12.998
Prof tum T4	1.587	1.103	2.069	1	.150	4.889	.562	42.502
Infil gang (N0)			4.152	2	.125			
Infil gang N1	.622	.597	1.084	1	.298	1.863	.578	6.006
Infil gang N2	1.318	.650	4.116	1	.042	3.737	1.046	13.356
Enfermedad metastásica	1.939	.686	7.990	1	.005	6.952	1.812	26.672

Aunque estadio Dukes y ambas recidivas elevaban el porcentaje de muestra perdida, sí nos pareció interesante estudiar los resultados del modelo que incluye todas las variables significativas del análisis de Kaplan-Meier. La **tabla 4.7.1.2.1** muestra los resultados del último paso (modelos final), obteniendo como factores de riesgo significativos ambas recidivas y el “compactness” de F, y como factor protector el “compactness” de CT. La muestra que se pierde debido a ambas recidivas, presenta un mayor porcentaje de casos de T4 (profundidad tumoral), N2 (infiltración ganglionar), metástasis y estadio Dukes D, siendo estas dos últimas significativas ( $p < 0.001$ ). Además, los casos perdidos tienen una SLE y una SG significativamente inferior a la observada en los casos válidos. Por último, la muestra válida y de casos perdidos es similar para compactness de CT y F. Esto indica que el modelo anteriormente obtenido es más válido que en el que a continuación se expone, ya que la muestra que se pierde está asociada a varios parámetros y a las variables de estudio (SLE y SG), perdiendo éste fiabilidad.

Presentar recidiva locorregional conlleva 26 veces mayor riesgo de morir que no presentarla ( $p < 0.001$ ). Igualmente ocurre con la recidiva a distancia, su existencia da 75 veces mayor riesgo de morir que no presentarla ( $p < 0.001$ ).

Presentar un “compactness” vascular medio en CT por encima de la media conlleva más probabilidad, que los que lo tienen por debajo de la media, de sobrevivir. Y a la inversa,



presentar un “compactness” de fibrosis por encima de la media conlleva 5 veces mayor riesgo que los que lo tienen por debajo de la media de presentar menor valor de supervivencia global, es decir mayor probabilidad de morir. Los resultados sobre “compactness” de CT y F indican una posible asociación, que hay que tomar con cautela debido al porcentaje de casos perdidos (23.2%) y a la asociación encontrada entre la muestra perdida y varios de los parámetros de estudio.

**Tabla 4.7.1.2.1: Modelo de Cox. Supervivencia Global.**

Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	GI	Sig.	OR	I.C.95%	
							Inf.	Sup.
Recidiva Locorregional Sí	3.279	.718	20.880	1	.000	26.554	6.506	108.390
Recidiva Distante Sí	4.327	.922	22.026	1	.000	75.746	12.431	461.554
“Compactness” CT $\geq$ 30.39	-1.404	.714	3.872	1	.049	.246	.061	.994
“Compactness” F $\geq$ 2734.47	1.609	.753	4.567	1	.033	5.000	1.143	21.880

#### **4.7.2.- Supervivencia libre de enfermedad**

La **tabla 4.7.2.1** muestra los resultados obtenidos del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en aquellos modelos en los que se ha detectado asociación estadísticamente significativa o casi significativa ( $p < 0,1$ ). En ella se incluye el factor de estudio, la categoría del factor, el tiempo medio de supervivencia (no se ha incluido la mediana ya que en muchos casos el porcentaje de casos censurados supera el 50%), su error estándar, el porcentaje de casos censurados, la prueba de Breslow y su significación estadística. Los resultados son similares a los obtenidos con la Supervivencia Global.

El estadio de Dukes, la profundidad tumoral y la infiltración ganglionar, muestran una asociación significativa con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,0013$ ;  $p = 0,001$  respectivamente). Conforme aumenta la categoría de estos factores, como podemos ver en la siguiente tabla, disminuye la media de SLE.

El presentar enfermedad metastásica sincrónica, o el que aparezca una recidiva locorregional o a distancia, también presenta una significativa menor SLE.

“Compactness” vascular medio en CT igual o menor de la media tiene una SLE de 87 meses; y mayor de la media asciende a 122 meses de SLE ( $p = 0,062$ ). Igualmente ocurre con el “compactness” de Fibrosis y SLE ( $p = 0,0465$ ).

**Tabla 4.7.2.1: Resultados Supervivencia Libre de Enfermedad (Kaplan-Meier)**

<b>Factor</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tiempo de Supervivencia (Media)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>% casos censurados</b>	<b>Prueba Breslow</b>	<b>Significación</b>
<b>Estadio Dukes</b>	A-B1	-	-	100	41.13	<0.001
	B2-B3	113	9	85.2		
	C1-C3	87	12	55.2		
	D	0	0	25		
<b>Profundidad Tumoral</b>	T1-T2	141	10	90.9	13.25	0.0013
	T3	110	9	74.4		
	T4	45	11	45		
<b>Infiltración ganglionar</b>	N0	129	8	85	35.75	<0.001
	N1	108	13	71.4		
	N2	18	7	15.4		
<b>Enfermedad Metastásica</b>	Sí	5	3	22.2	44.21	<0.001
	No	117	8	75.4		
<b>Recidiva Locorregional</b>	Sí	17	4	9.1	40.51	<0.001
	No	132	7	85.4		
<b>Recidiva Distante</b>	Sí	17	3	0	51.44	<0.001
	No	136	6	88.9		
<b>“Compactness” CT</b>	<=media	87	11	60	3.47	0.0627
	>media	122	10	79.4		
<b>“Compactness” F</b>	<=media	122	10	79.5	3.96	0.0465
	>media	65	9	55.9		

El siguiente paso fue estudiar el efecto conjunto de estos factores predictivos significativos, obteniendo resultados similares a los de la Supervivencia Global.

La **tabla 4.7.2.2** muestra los resultados del modelo de Cox en el que se han incluido los factores predictivos de profundidad tumoral, infiltración ganglionar, enfermedad metastásica, compactness de CT y de F obteniendo como factores predictivos significativos la profundidad tumoral, la infiltración ganglionar y la enfermedad metastásica, actuando todos ellos como factores de riesgo. El modelo es estadísticamente significativo ( $-2 \log$  de la verosimilitud=150,37;  $\chi^2=61,43$ ,  $p<0,001$ ). Así pues, un individuo con profundidad tumoral T3 respecto a otro con profundidad tumoral T1-T2, y a igualdad de condiciones en el resto de parámetros (infiltración ganglionar y enfermedad metastásica), tiene 1.7 veces más riesgo de presentar el evento de estudio (muerte). En el caso de los individuos con profundidad T4, el riesgo es de 4.5 veces mayor. En ambos casos el riesgo no es estadísticamente significativo, aunque sí muestra tendencia a la significación. Con infiltración ganglionar ocurre de manera similar que con profundidad tumoral, mientras que tener enfermedad metastásica tiene 10 veces más riesgo de morir que un individuo que no la ha tenido.

**Tabla 4.7.2.2: Modelo de Cox. Supervivencia Libre de Enfermedad.**

Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	G1	Sig.	OR	I.C.95%	
							Inf.	Sup.
Prof tum (T1-T2)			4.882	2	.087			
Prof tum T3	.535	1.090	.241	1	.624	1.707	.202	14.453
Prof tum T4	1.499	1.108	1.829	1	.176	4.475	.510	39.265
Infil gang (N0)			5.473	2	.065			
Infil gang N1	.532	.596	.795	1	.373	1.702	.529	5.478
Infil gang N2	1.384	.594	5.423	1	.020	3.990	1.245	12.785
Enfermedad metastásica	2.353	.695	11.468	1	.001	10.516	2.694	41.044

La tabla 4.7.2.2.1 muestra los resultados del modelo final, que en este caso se han considerado todas las variables significativas en Kaplan-Meier, obteniendo como factores de riesgo significativos ambas recidivas y como factor protector el compactness de CT. Hay que tener en cuenta las mismas consideraciones que las apuntadas para SG.

**Tabla 4.7.2.2.1: Modelo de Cox. Supervivencia Libre de Enfermedad.**

Variable indep. (categoría de referencia)	$\beta$	E.T.	Wald	G1	Sig.	OR	I.C.95%	
							Inf.	Sup.
Recidiva Locorregional Sí	2.869	.588	23.773	1	.000	17.617	5.560	55.819
Recidiva Distante Sí	3.890	.782	24.765	1	.000	48.933	10.572	226.492
"Compactness" CT $\geq$ 30,39	-1.489	.625	5.683	1	.017	.226	.066	.767



## **V.-DISCUSSION**



Para el cáncer colorrectal, uno de los tumores malignos más frecuentes, aunque el estadio en el momento del diagnóstico es el factor pronóstico más importante, son necesarios otros factores predictores del riesgo de recaída, además de los sistemas clínico- patológicos de estadiaje usados actualmente (TNM/Dukes), por diversas razones:

1°/Una considerable fracción de tumores colorrectales N- aproximadamente el 10% de los pacientes con estadio A de Dukes y entre el 30%-40% del estadio B, pueden desarrollar recurrencia local o metástasis a distancia años después del tratamiento quirúrgico estándar (**Olson et al 1980**); no siendo la quimioterapia adyuvante rutinariamente administrada en este grupo porque ningún estudio de quimioterapia adyuvante realizado ha demostrado todavía un efecto beneficioso para la supervivencia (**Moertel 1990, 1995**).

2°/En el estadio B2/II (T3, T4, N0M0) la supervivencia a los 5 años varía del 60% al 80% (**Cohen AM 2000**).

3°/La existencia de N+ no siempre predice claramente unos resultados más desfavorables (**Wolkmark et al 1986**). La quimioterapia adyuvante es administrada rutinariamente tras la cirugía a pacientes con cáncer de colon N+. Sin embargo, solo el 15% de ellos se benefician de una mejora en la supervivencia, mientras que el 85% restante están expuestos a la toxicidad, coste e inconvenientes de la quimioterapia, sin recibir ningún beneficio demostrado (**Moertel CG 1990**).

Así pues, la identificación y tratamiento adyuvante de los pacientes con tendencia a la recaída, mejoraría la supervivencia del cáncer colorrectal sin el riesgo de sobretratamiento. Por lo que es importante encontrar otros indicadores que puedan predecir el riesgo de recaída o de desarrollar metástasis y que nos ayuden a cribar a los pacientes de estadios precoces con



alto riesgo, los cuales puedan necesitar un tratamiento quimioterápico preventivo u otra terapia adyuvante.

El sistema TNM proporciona una clasificación del cáncer colorrectal, ya que proporciona datos del mismo en cuanto a la profundidad de invasión en la pared (T), existencia de ganglios linfáticos afectados o no (N) y existencia o no de metástasis a distancia (M). En cambio, el estadiaje tumoral supone una adaptación de la información proporcionada por la clasificación TNM a uno de los cuatro estadios propuestos (I, II, III, IV), con la finalidad de englobar el tumor en una serie de grupos lo más homogéneos posibles en cuanto a comportamiento tumoral, pronóstico y tratamiento. En este sentido, se hacen evidentes las deficiencias del actual sistema TNM, pues no tiene en cuenta otros factores con evidente significación pronóstica, como por ejemplo el grado de diferenciación, el componente mucinoso mayor al 50%, así como la presencia de infiltración venosa, linfática o perineural, entre otros. La clasificación de Dukes, además de las limitaciones anteriores, también tiene otras, por ejemplo: el cáncer “precoz” limitado a la submucosa no puede identificarse de forma específica. Del mismo modo, esta clasificación no subdivide el estadio C en subgrupos en relación al número de ganglios o su localización; hechos que sí contempla el sistema TNM y que tiene gran repercusión pronóstica. Otras limitaciones importantes derivan de la calidad del espécimen, es decir, de la resección y del procesado de la pieza. También existe una notable variabilidad inter-observador que puede hacer variar por ejemplo, el porcentaje del estadio A entre el 5% y el 30%. Por otro lado, el número promedio de ganglios aislados puede variar ampliamente y condicionar la migración de estadio p.ej del “B” al “C” o del “II” al “III”. El número de ganglios es muy importante como factor pronóstico; así la presencia de 1 a 4 ganglios afectos supone una tasa de supervivencia del 50%-55%, mientras que la presencia de 5 o más ganglios positivos descenden la supervivencia al 22-28%.

Por otro lado, el estudio de los caracteres biológicos de los tumores en estadio B2/II revela un subgrupo de pacientes de alto riesgo que se podrían beneficiar de terapia adyuvante postoperatoria. Un análisis por el NCCTG ha demostrado que la presencia de ADN aneuploide y una alta fracción de fase-S medido por citometría de flujo podría caracterizar a un grupo de pacientes en el estadio B2/II con un pronóstico similar a los pacientes con

ganglios + **(Witzig TE 1991)**. De manera similar se ha demostrado que las deleciones alélicas del brazo largo del cromosoma 18(18q) se asocian a peor pronóstico en pacientes con estadio B2 **(Jen JK 1994)**.

Así, en un intento de superar las limitaciones de los sistemas actuales de estadiaje, (TNM /Dukes), se han introducido una serie de parámetros adicionales que permitirán estratificar a los pacientes en una serie de grupos “pronóstico” lo mas homogéneos posibles en relación a la complejidad de las distintas opciones terapéuticas.

La determinación de la densidad de angiogénesis en el carcinoma primario representa actualmente una línea de investigación prometedora en el conocimiento del comportamiento y pronóstico tumoral. Numerosos estudios avalan la hipótesis de que la angiogénesis es necesaria para el crecimiento de los tumores sólidos **(Folkman et al. 1990, Weidner 1991)**, facilita dos procesos responsables del fenotipo maligno de los tumores como son la capacidad invasiva y metástasis **(Liotta et al. 1974, Skobe et al. 1997)** y que, desarrolla un papel determinante en la sensibilidad tumoral al tratamiento con quimioterapia y radioterapia **(Milas L et al. 1988)**. La cinética de crecimiento tumoral se correlaciona con la concentración de factores angiogénicos en la sangre de pacientes con cáncer colorrectal avanzado **(Dirix et al 1996, 1997)**. Aunque la fracción de proliferación de un tumor no depende del número de microvasos, las células tumorales son menos propensas a realizar apoptosis en tumores bien vascularizados **(Holmgren et al. 1995, Lu et al. 1997)**. La invasividad de diversos tipos de carcinoma “in situ” puede predecirse por el elevado contaje microvascular al otro lado de la membrana basal **(Hanahan et al 1996)**.

En tumores humanos, la evidencia de que la cuantificación de la angiogénesis mediante el contaje vascular, podría predecir la capacidad de metastatizar y supervivencia de los pacientes, fué publicado inicialmente para el melanoma cutáneo **(Srivastava A 1988)** y posteriormente ha sido documentada para otros tipos de tumores, entre ellos el de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cabeza y cuello, próstata y tumor testicular de células germinales **(Weidner N 1991, Macchiarini P 1992, Gasparini G 1993, Wakui S 1992, Olivarez D 1994)**.

Datos sobre la angiogénesis tumoral y sus implicaciones clínicas y pronósticas no han sido tan extensamente investigados en tumores del tracto gastrointestinal, y con resultados contradictorios en el cáncer de colon. Por ello, y junto a la necesidad de determinar otras variables pronósticas que nos expliquen la discrepancia de resultados en casos con el mismo estadio según los sistemas actuales de homogeneización de los pacientes, nos hemos planteado estudiar la angiogénesis mediante morfometría en el cáncer de colon, así como la reacción desmoplásica para poder responder a las preguntas:

- ¿Son la angiogénesis y la reacción desmoplásica variables pronósticas independientes ?.
- ¿Podrían estas variables darnos información sobre el comportamientos del cáncer de colon ?.

La respuesta a esta y otras cuestiones son el objeto fundamental de este estudio.

### 5.1.-DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

Nosotros, al igual que la mayoría de los estudios realizados sobre la significancia pronóstica de la angiogénesis en pacientes con cáncer colorrectal (**Saclarides et al. 1994, Frank et al. 1995, Takahashi et al. 1995 y 1997, Tomisaki et al. 1996, Engel et al. 1996, Takebayashi et al. 1996<sup>a</sup> y 1996<sup>b</sup>, Tanigawa et al. 1997, Galindo et al. 2000**), hemos realizado un estudio con un diseño retrospectivo, de base hospitalaria, constituido por una cohorte de 406 pacientes. Otros autores como **Vermeulen et al. 1999, Lindmark et al. 1996 y Prall F et al. 2003** realizaron un estudio prospectivo de la densidad vascular intratumoral y supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal.

Se ha realizado una **selección muestral** rigurosa en base a una serie de criterios de inclusión y exclusión, expuestos en el apartado de material y métodos, con la finalidad de obtener una serie lo más homogénea posible. Todos los pacientes incluidos presentan

adenocarcinoma de colon, no de recto, como primer y único diagnóstico de cáncer, han sido sometidos a cirugía como pauta de tratamiento inicial y presentan márgenes quirúrgicos libres.

La importancia de la metodología en la evaluación de la microvascularización tumoral ha sido expuesta recientemente por **Schor et al 1998**, llegando a la conclusión de que ésta depende de los siguientes factores: tratamiento previo de las muestras tisulares (empleo de RT y/o QT), método de cuantificación de la angiogénesis (áreas de mayor densidad microvascular, densidad microvascular media y volumen vascular), marcadores endoteliales y subjetividad por parte del observador. En su estudio sobre la microvascularización en el carcinoma de mama no encuentran diferencias significativas entre el tejido tumoral y los casos controles, sugiriendo la posibilidad de que tales resultados sean consecuencia de una deficiente metodología. Otros autores han apreciado que ocasionalmente el aumento de la neovascularización aparece en muestras de tejido normal (**Chomette 1989**). En estudios realizados sobre angiogénesis y cáncer de colon también hay resultados contradictorios, como hemos expuesto anteriormente (**Saclarides et al. 1994, Frank et al. 1995; Takahashi et al. 1995 y 1997, Tomisaki et al. 1996, Engel et al. 1996, Takebayashi et al. 1996a y 1996b, Tanigawa et al. 1997 frente a Bossi et al. 1995, Lindmark et al. 1996**), que se suelen atribuir a diferencias metodológicas.

En cuanto a la **localización**, la mayoría de los estudios de angiogénesis y cáncer de colon incluyen las localizaciones colónica y rectal indistintamente (**Bossoi 1995, Tomisaki 1996, Vermeulen 1995 y 1999, Takebayashi 1996, Lindmark 1996, Engel 1996, Tanigawa 1997, Banner 1998, Povlopoulos 1998**). Nosotros al igual que **Frank et al. 1995, Takahashi et al. 1997, Fox et al. 1998** hemos incluido sólo a los adenocarcinomas de colon para homogeneizar la muestra evitando así diferencias en cuanto:

1º/ A la técnica quirúrgica / Factor cirujano (**Porter GA 1998, Quirke P 1986**). Pues mientras en el cáncer de colon la mayoría de las recidivas locales se presentan junto con enfermedad diseminada (**Abulafi y Williams 1994**), en el cáncer de recto se presentan casi siempre solas; lo que supone que la técnica quirúrgica es decisiva y hasta cierto punto con resultados cirujano-dependiente. Diversos estudios han encontrado al factor cirujano como un factor pronóstico independiente (**Chapuis P 2002, Read TE 2002, Heald RJ 1998**).

2º/Al tratamiento adyuvante recibido. En el cáncer de recto está indicada la radioterapia pre o postoperatoria en los pacientes de alto riesgo (T3-4 y/o N+) (**GITSG 71-**

**75, NCCTG 79-4751, Marsh et al 1994, Cedemark et al 1995, Gerard et al 1988,**

**EORTC, Swedish rectal cancer trial 1997**), no así en el cáncer de colon, donde el papel de la radioterapia es muy limitado debido a la escasa incidencia de recidivas locales tras la cirugía (3%-4%); ya que el colon es un órgano intraperitoneal, móvil, donde técnicamente es posible obtener márgenes quirúrgicos muy amplios, y donde la aplicación de radioterapia presenta alta morbilidad dada las relaciones anatómicas existentes y la movilidad de las asas de intestino delgado y del propio intestino grueso.

3°/A las distintas vías de diseminación inherentes a sus diferentes relaciones anatómicas; así en los tumores de colon el margen mesocólico es normalmente amplio pero el estado del margen circunferencial es particularmente importante en el cáncer rectal debido a la proximidad anatómica de las estructuras pélvicas, que condiciona que los márgenes radiales que se obtienen en la resección del tumor sean muy escasos, siendo la recidiva local el patrón de fallo más frecuente en los estadios II y III. La diseminación del tumor en el mesorrecto y la cantidad de resección mesorrectal se han involucrado recientemente como factores pronóstico en el cáncer de recto. **Cawthorn et al 1990** observaron que aquellos pacientes con infiltración del mesorrecto menor de 4mm. tenían una supervivencia del 55% a los 5 años, mientras que aquellos enfermos con más de 4mm. de infiltración mesorrectal sobrevivían solamente el 25% a los 5 años; además un reciente estudio histológico realizado por **Scott et al 1995** ha evidenciado que la diseminación mesorrectal se extiende mas allá de la intramural, habiéndose encontrado depósitos tumorales unos 3cm. mas allá del tumor primario. Por esta razón, la mayoría de los estudios aleatorizados incluyen QT y RT en los dos estadios (II y III), a diferencia del cáncer de colon, donde no se incluye la radioterapia en el tratamiento, y la quimioterapia adyuvante en el estadio II es controvertida (**Chau I 2002**) no indicándose de forma generalizada salvo en el subgrupo de pacientes con tumores de alto riesgo (perforación, obstrucción intestinal, invasión venosa, linfática o perineural, adherencia/infiltración de órganos vecinos, grado pobremente diferenciado) que tienen peor supervivencia, y por ello se les aconseja tratamiento adyuvante igual que en el estadio III.

Otro factor considerado, **cirugía como tratamiento inicial**, es determinante en la valoración no sólo del grado de angiogénesis, sino de las características histopatológicas (índice mitótico, grado de diferenciación, profundidad máxima de invasión tumoral), y pronósticas (bordes quirúrgicos), ya que éstas únicamente son valorables en el análisis de la

---

pieza histopatológica completa, no pudiéndose determinar correctamente con el estudio del bloque histopatológico correspondiente a la toma de biopsia (**Anneroth 1984 y 1987**). Carcinomas que hayan sido previamente irradiados o sometidos a QT presentaran modificaciones tisulares derivadas de tales tratamientos.

Desde el punto de vista pronóstico, la importancia de **los márgenes quirúrgicos** ha sido puesta de manifiesto por distintos estudios (**De Quay et al. 1999, Adam IJM 1995, Ratto C 1998**).

Para la **determinación de la microvascularización tisular** se han empleado distintas técnicas. Durante la década de los 60, ésta se valoró a través de la inyección vascular con tinta china (**Kos 1960, Zinse 1960**), presentando resultados escasamente específicos ya que únicamente se teñía una escasa proporción del total de los vasos neoformados. Este procedimiento se basaba en la inyección de tinta china en la córnea del conejo, la cual permanecía estable de forma indefinida. En el momento en el que se producía la neovascularización, las áreas adyacentes a los vasos se teñían con la tinta y se detectaban partículas de dicho pigmento en los ganglios linfáticos homolaterales.

Posteriormente se introdujeron técnicas inmunohistoquímicas dirigidas a la detección de *Fosfatasa Alcalina* (**Stafl et al 1975**), *Vimentina* (**Wakui 1992**) y *Lecitina* (**Svrvivasta 1988**).

Estas técnicas han quedado sustituidas en la actualidad por otras técnicas inmunohistoquímicas en las que para la identificación de microvasos se usan anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos de las células endoteliales. Dentro del amplio rango de anticuerpos específicos endoteliales humanos disponibles actualmente distinguimos dos categorías: los marcadores celulares pan-endoteliales y los anticuerpos frente al endotelio activo/proliferante. Además de las células endoteliales, otros constituyentes de la pared

vascular pueden teóricamente ser utilizados para visualizar el grado de vascularización intratumoral; entre ellos distinguimos los pericitos (*índice de cobertura por pericitos*) y *componentes de la lámina basal* (**Vermeulen PB et al. 1996, Eberhard A et al. 2000**).

En el cáncer de colon la mayoría de los autores que han estudiado la neoangiogénesis han empleado el *Factor VIII o de vW* como factor antigénico (**Roncucci et al. 1992, Saclarides TJ 1993, Frank RE 1995, Tomisaki S 1996, Vermeulen PB 1995, Takebayashi Y1996, Lindmark G 1996, Takahashi Y1997, Banner BF 1997, Fox SH 1995, Prall F 2003**), si bien presenta el inconveniente de teñir simultáneamente vasos linfáticos (**Bosari 1992**) y de no teñir parte de los endotelios capilares de los tejidos tumorales (**Vermeulen PB 1995**).

Otros investigadores (**Bossi et al. 1995, Vermeulen et al. 1999, Engel et al. 1996**) en sus estudios sobre la angiogénesis y cáncer de colon usaron el *CD31 o PECAM* para la determinación de la microvasculatura; éste posee el inconveniente de que puede tener reacciones cruzadas con fibroblastos, células plasmáticas y mielomonocitos; otra desventaja del CD31 es la frecuente pérdida antigénica debido a las fijaciones que contienen ácido acético.

Un análisis reciente de densidad microvascular intratumoral en cáncer de mama sugiere que *anti-CD34* puede ser el anticuerpo más reproducible y seguro para estudios de rutina (**Martin L 1995**). Es por ello, junto con las recomendaciones de la primera conferencia internacional de consenso sobre metodología y criterios de evaluación de angiogénesis (**Vermeulen PB et al 1996**), que en nuestro estudio, al igual que en el de otros autores (**Tomisaki et al 1996, Tanigawa et al 1997, Galindo Gallego et al 2000**), se ha empleado el factor CD34, que posee una mayor sensibilidad, permitiendo tanto la identificación de capilares y arteriolas con una moderada reacción cruzada frente a fibroblastos y células endoteliales tumorales (**Macchiarinni 1992, Salven et al. 1997**), proporcionando una mejor información pronóstica que la obtenida con anti FVIII (**Tanigawa N 1996**). El recuento vascular mediante CD34 es 3-4 veces más alto que con vWF (**Tanigawa N 1996, 1997**). Sin embargo el CD34 no discrimina entre vasos de tejido sano y aquellos neoformados por la acción tumoral o entre aquellos que se encuentran en un estado quiescente de los que son producto de migración y proliferación endotelial. Este hecho, exige una rigurosa selección de los microvasos y del estroma a estudiar, seleccionando únicamente aquellos que guardan

relación con el tumor. Por ello, se han considerado únicamente aquellas áreas de estroma adyacentes al tejido tumoral y los microvasos situados en el seno del tumor y en la interfase tumor-huésped (área de mayor vascularización); excluyendo todas aquellas áreas no

relacionadas con el tumor (tejido benigno adyacente al mismo), o zonas esclerosadas intratumorales, zonas necróticas y hemorrágicas.

Además el CD34, al igual que el factor de vonWillebrand, presenta el inconveniente de que marca una proporción de vasos linfáticos (aunque en menos proporción que este último), y aunque se asume que las neoplasias no forman nuevos vasos linfáticos (**van Netten JP 1995**), el marcaje de vasos linfáticos preexistentes puede inducir falsos positivos en el microrecuento vascular.

Recientemente, algunos autores como **Prall F et al 2003** han empleado un doble inmunomarcaje con *factor VIII / Ki67* para determinar el endotelio proliferante. Para ello han usado el anticuerpo MiB-1 frente al antígeno nuclear Ki67 de las células en fase no G0, pudiéndose establecer así la proporción de células endoteliales con actividad proliferativa.

En nuestro estudio obtuvimos tinción positiva para el Ac CD34 en todas las muestras analizadas (n=81). Otros estudios que han empleado el Ac frente al factor VIII han obtenido en escasa proporción muestras no aptas para su posterior análisis (**Hogmo 1999, Wiggins 1995**).

Siguiendo las recomendaciones de **Weidner et al 1991**, debido a la heterogeneidad de secciones histológicas tumorales, hemos **determinado la angiogénesis en las zonas calientes o “hot spot”**, al igual que la mayoría de los autores que han estudiado la angiogénesis en el cáncer colorrectal, debido a que las áreas vasculares “hot spot” derivan de los clones de células tumorales con mayor capacidad angiogénica y serán estas células la que predominantemente entraran en la circulación, influyendo más en el comportamiento del tumor por su mayor probabilidad de dar metástasis vascularizadas.

**Vermeulen et al 1995** observaron el doble de proliferación de células endoteliales en las áreas vasculares “hot spot” del cáncer de colon comparado con áreas vasculares tumorales no seleccionadas, y encontraron que la densidad vascular en las diferentes zonas “hot spot” de un tumor separadas por tejido tumoral con baja densidad vascular eran similares. Esto les

sugiere que la densidad vascular es un parámetro estable en todas las regiones del tumor y puede ser punteado o insinuado como una característica biológica del mismo. Lo cual es



---

relevante si la angiogénesis llega a ser un factor pronóstico en el carcinoma colorrectal.

Así pues, la determinación de estas regiones es crítica a la hora de establecer la potencial asociación entre progresión tumoral y angiogénesis; sin embargo, este es el punto más subjetivo de todo el proceso, por ser observador dependiente.

Hemos estudiado la **angiogénesis separadamente en el centro tumoral y en el adyacente tejido sano peritumoral**, ya que diversos estudios han mostrado una diferencia cualitativa en la arquitectura vascular entre la parte central y periférica del tumor (**Fox et al 1998, Konerding et al 2001**).

El método de análisis por **digitalización de imagen** ha sido empleado en el presente estudio con la finalidad de realizar una cuantificación de la densidad microvascular que supere los métodos tradicionales basados en la determinación semicuantitativa mediante recuento a través de microscopía óptica (**Weidner et al 1992**), obteniendo un procedimiento que disminuye el error humano, incrementa la especificidad, permite la exploración de aquellas áreas más significativas del tumor y que nos permite además hacer un estudio morfométrico de angiogénesis y reacción desmoplásica. Entre los autores que al igual que nosotros han utilizado el análisis de imagen, destacamos los trabajos de **Pritchard AJ et al. 1995** quienes realizaron un estudio cuantitativo y morfométrico de angiogénesis en el cáncer colorrectal mediante análisis de imagen e inmunomarcaron con QB/end/10 y JC70.

**Pavlopoulos et al. 1998** realizaron un estudio de angiogénesis mediante inmunomarcaje con factor VIII en el cáncer de colon, usando análisis de imagen para la cuantificación de la densidad microvascular así como para la determinación de siete características morfológicas, entre las que destacamos: área, perímetro, “compactness” ( $\text{perímetro}^2/\text{área}$ ) y factor de forma ( $4\pi \times \text{área}/\text{perímetro}$ ).

**Konerding et al. 2001** realizaron un estudio de la arquitectura microvascular en tres dimensiones de lesiones precancerosas y cáncer de colon, inmunomarcando con FVIII y VEGF, usando un programa de análisis de imagen para la reconstrucción en 3D

---

## 5.2.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.2.1.-Determinación de angiogénesis

**5.2.1.1.-Estudio topográfico descriptivo de la arquitectura vascular tumoral versus borde sano (PT –CT vs. MM).**

#### Densidad vascular

- *PT y/o CT > MM:*

En cuanto a la determinación cuantitativa de la angiogénesis (densidad vascular), hemos encontrado que es mayor en todas las regiones tumorales (CT, PT) que en el control sano (MM)(PT y/o CT >MM).

Coincidimos pues con la mayoría de los autores, que han estudiado la angiogénesis tumoral en el cáncer de colon confrontada con un control sano (**Konerding et al 2001, Skinner et al 1995, Fox et al 1998, Bossi P et al 1995, Vermeulen PB et al 1995...**), y corroboramos así el papel de la angiogénesis en la biología del cáncer de colon, postulado ya en 1971 por Folkman para los tumores sólidos. Sin embargo, nuestro estudio, a diferencia del de Bossi et al 1995 y Skinner et al 1995, carece del análisis de la angiogénesis en las etapas intermedias del desarrollo tumoral, según el modelo de tumorogénesis de **Fearson y Vogelstein 1990**, para poder establecer conclusiones sobre el posible papel de la angiogénesis en la progresión tumoral de este tipo de cáncer.

En contraposición a nuestros resultados, están los de otros autores como **Mylnek et al y Porschen** et al 1994, quienes encontraron un volumen vascular reducido en los carcinomas comparado con el colon normal. Las diferencias con estos dos estudios pueden ser atribuidas a diferencias metodológicas: Mylnek usó la fosfatasa alcalina como marcador histoquímico para determinar los vasos dentro de las secciones histológicas; esta técnica sólo demuestra células endoteliales en la fase arterial de la malla microvascular por lo que una considerable fracción de vasculatura tumoral podría no ser considerada. Poschen et al 1994 usaron un anticuerpo monoclonal frente a un epítipo de células endoteliales humanas para demostrar la vasculatura, y sus valores son considerablemente menores que los de Skinner et al porque probablemente reflejan la dificultad de medir parámetros vasculares en tejidos deshidratados donde los vasos están colapsados, y porque el epítipo de las células endoteliales normales, blanco del anticuerpo, no sea completamente expresado en el tejido tumoral (**Ohtani y Sasano**). Dichos autores tampoco seleccionaron las zonas “hot spot” de las secciones tumorales.

**Pritchard AJ 1995**, comparando con mucosa normal el centro de los carcinomas colorrectales pobremente diferenciados, encontró que era significativamente menos vascularizado mientras que el centro de los moderadamente diferenciados era más vascularizado, pero tan solo 1.4 veces mayor que la mucosa normal. Aunque Pritchard AJ et al al igual que nosotros realizaron determinaciones de la densidad vascular en diferentes regiones tumorales de 20 adenocarcinomas colorrectales, determinando la distribución del flujo sanguíneo en el tumor y en su entorno para posteriormente compararla con los patrones obtenidos en animales de experimentación y tumores humanos, sus resultados no son del todo comparables con los nuestros debido a las evidentes diferencias metodológicas.

Las regiones tumorales definidas por Pritchard AJ et al, no se corresponden con las nuestras, pues el autor habla de centro y periferia tumoral para referirse al tumor estrictamente hablando, y nosotros cuando hablamos de periferia tumoral nos referimos al tejido sano peritumoral adyacente, y a diferencia de él, que no selecciona las áreas, nuestros resultados hacen referencia a la media de 10 seleccionadas áreas vasculares “hot spot” de las distintas regiones tumorales (CT, PT, MM). Además dicho autor, sólo analiza los vasos con una luz claramente definida.

---

- *PT>CT*:

Al comparar los resultados del análisis de la densidad vascular entre las distintas regiones tumorales, como vemos en la **Tabla 4.4.1**, coincidimos con Konerding et al 2001 y encontramos que es significativamente mayor en las áreas “hot spot” del adyacente tejido peritumoral que en las áreas “hot spot” intratumorales (PT>CT).

Este descenso de la densidad vascular en el centro del tumor puede ser resultado de fenómenos de compresión vascular que conducen a isquemia y necrosis. Goldacre y Sylven 1962, Warren 1970 y Folkman 1985 encontraron que entre los factores que pueden contribuir a esta compresión se incluyen la acumulación de fluidos extracelulares debidos a la hiperpermeabilidad vascular y pobre drenaje linfático, así como a la descontrolada proliferación de células neoplásicas. La necrosis central es un hallazgo común en los carcinomas implantados en los animales de experimentación cuando alcanzan 1-2cm<sup>3</sup> (**Goldacre and Sylven 1962**), así como en carcinomas humanos, particularmente en los casos pobremente diferenciados (**Pritchard et al 1995**).

Por otra parte, y **dado que hemos medido la angiogénesis en las zonas PT, no sólo en el estroma submucoso, sino que también en la mucosa, cabe la hipótesis de que en PT la mayor angiogénesis no es por vascularización preexistente sino que por inducción tumoral.**

Hay otros muchos autores que al igual que nosotros, en diversos tumores malignos, encuentran que los tejidos del huésped presentan un incremento de la densidad vascular adyacente al borde invasivo; y ello es probablemente debido a la liberación de factores angiogénicos por parte del tumor (**Folkman 1985**). Por ejemplo, Goldmann 1908 y Thompson et al 1987 publicaron una densidad vascular incrementada en los tejidos del huésped adyacente a carcinomas transplantados en ratón; Srivastava et al 1986, encontró lo mismo en los tejidos adyacentes al melanoma maligno de humanos.

Nuestros resultados difieren de otros autores como Bossi et al 1995 y Fox et al 1998. Bossi et al. 1995, encontraron que la mucosa de transición presenta mayor grado de angiogénesis que la mucosa normal, pero menor que dentro del tumor. Estos resultados no son del todo comparables a los nuestros dado que cuando nosotros hablamos de periferia tumoral nos referimos al adyacente tejido sano peritumoral (estroma y/o mucosa) y no sólo a la

mucosa de transición. Fox et al 1998, cuando estudia los tumores en estadios precoces (T1/T2) encuentra que la densidad vascular es significativamente mayor en el tumor que en el tejido normal adyacente; sin embargo, en estadios avanzados (T3/T4), encuentra la misma densidad microvascular en ambas zonas. Sin embargo, al igual que nos ocurre con los hallazgos obtenidos por Bossi, nuestros resultados no son del todo comparables a los de Fox dado que estos últimos, aunque sí seleccionan las zonas “hot spot” intratumorales, a la hora de determinar la densidad vascular en el adyacente tejido normal eligen los campos al azar, sin seleccionar las áreas más vascularizadas, con lo cual pueden infraestimar la densidad vascular en dichas zonas.

**Nosotros hemos encontrado que globalmente la zona tumoral (PT y/o CT) tienen mayor densidad vascular que el borde sano (MM), y que PT tiene mayor densidad vascular que CT, independientemente del resto de los factores clínico-histopatológicos analizados (grado de diferenciación, profundidad, estadio de Dukes, afectación ganglionar o localización tumoral) (ver tabla 4.4.1.1.4).**

A diferencia de los estudios de Fox et al donde esa diferencia regional no se mantiene en los estadios T3/T4 (CT=PT), y los de Pritchard AJ et al 1995 quienes encontraron modificaciones en dicha observación en relación al grado de diferenciación tumoral. Sin embargo, como comentamos antes, nuestros resultados no son del todo comparables a los estudios mencionados dadas las evidentes diferencias metodológicas y a la desviación de los estándares que dichos autores realizan a la hora de determinar la densidad vascular.

La mayoría de los estudios realizados sobre la importancia pronóstica de la angiogénesis en los distintos tumores se ha centrado en la determinación cuantitativa de la densidad vascular, pasando por alto otros parámetros que pueden tener significado pronóstico tales como: la complejidad de la malla microvascular y el tamaño y forma de los microvasos.

Los estudios sobre la distribución de los vasos sanguíneos tumorales se han realizado sobre todo en tumores espontáneos o inducidos en animales de experimentación (**Goldmann 1908, Goldacre and Sylven 1962, Thompson et al. 1987**).

El estudio de Pavlopoulos et al. 1998, fue el primero en estudiar la significancia pronóstica de características morfométricas de la microvascularización en pacientes con cáncer de colon, además de la densidad microvascular, para establecer la relación entre angiogénesis con factores clínico-histopatológicos y de pronóstico. Nuestro estudio, al igual que el de este autor, también estudia diversas características morfométricas y las evalúa mediante análisis de imagen en las regiones “hot spot”; pero a diferencia de él, que usa el factor VIII, nosotros usamos anti CD34 como marcador inmunohistoquímico, y segregamos el estudio analizando las distintas regiones tumorales.

Tener información acerca de la distribución de los vasos sanguíneos en y alrededor del tumor puede ser importante para: 1°/el conocimiento acerca del crecimiento tumoral y la capacidad metastásica, 2°/ el desarrollo de terapias antitumorales, 3°/ la efectividad de la radioterapia, 4°/explicar resultados clínicos y pronóstico.

#### Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos.

- $PT-CT > MM$

En cuanto al estudio morfométrico de la angiogénesis, como vemos en la **tabla 4.4.1**, coincidiendo con los trabajos de Skinner et al 1995, Konerding et al 2001 y Pritchard et al 1995, todas las variables morfométricas estudiadas en nuestro caso ( área, perímetro y “compactness”), son también mayores en el tumor que en el borde sano.

- $PT > CT$

Al igual que ocurre con la densidad vascular, encontramos que las medias del área, perímetro y “compactness” vascular, son también mayores en la periferia (PT) que en el centro tumoral (CT) y estas diferencias se mantienen estadísticamente significativas, independientemente de cual sea el grado de diferenciación, estadio de Dukes, profundidad y localización tumoral (**ver tablas de 4.4.1.1.1 a 4.4.1.1.3 y gráficas de 4.4.1.1.4.1 a 4.4.1.1.4.5**).

Nuestros resultados están en consonancia con los hallazgos de Konerding en que la arquitectura vascular tumoral difiere de la microvascularización de los tejidos normales, pero también las diferencias son significativas dentro del tumor (PT frente CT).

El que encontremos un mayor “compactness” vascular medio en PT en relación a CT puede ser reflejo del mayor colapso vascular **o a que los vasos sean mas aberrantes secundario a una mayor neoangiogénesis en esta zona tumoral.**

Así podemos decir, que la angiogénesis estudiada tanto cuantitativa como cualitativamente es mayor en el tejido peritumoral adyacente que en CT y que en MM.

#### **5.2.1.2.-Estudio de correlación**

En el estudio de correlación de las distintas zonas tumorales entre sí y el borde sano (CT/PT/MM), como vemos en las **tablas 4.3.1.1 a 4.3.1.4**, encontramos una correlación significativamente positiva entre las densidades vasculares de CT con PT ( $p < 0.001$ ) y MM ( $p = 0.006$ ); así como una correlación positiva casi significativa entre área de CT y MM ( $p = 0.095$ ), y entre compactness CT y PT ( $p = 0.061$ ).

Así podríamos decir que:

-1°/ La arquitectura vascular tumoral es distinta pero se ve influenciada, o sea correlacionada positivamente, por la arquitectura vascular del tejido preexistente sobre el que se desarrolla el tumor. Cuanto mayor es el número de vasos de un tejido y mayor es el área de sus vasos, el tumor que se desarrolle en él, tendrá una mayor densidad y área vascular.

-2°/Además, y dado que el sentido de la correlación es doble, habría que considerar que el que se correlacione positivamente el área de CT y MM, así como la densidad vascular de CT y MM, puede ser reflejo de la acción sistémica de los factores angiogénicos.

-3°/Estos hallazgos también apoyan el concepto de que una vez que se desarrolla el tumor en el escenario tumoral (CT/PT), los mismos factores con actividad angiogénica que influyen o interactúan en la zona CT, también lo hacen en PT (tejido estromal adyacente al tumor), existiendo una estrecha interacción entre el tumor y tejidos adyacentes del huésped, estroma peritumoral, corroborando así la evidencia de otros muchos autores (**Kathy DM et al. 2001, Takahashi Y et al. 1995, O’Byrne KJ et al. 2000, Barbera-Guillem E et al. 2002**).

### 5.2.1.3.- Análisis bivariante-multivariante.

#### Localización tumoral

- Densidad vascular

Tanto en el análisis bivariante como cuando dividimos a la muestra en hiper/hipovascular, tenemos que los tumores localizados en colon ascendente presentan una mayor densidad vascular, tanto en CT como en MM, que los localizados en colon descendente. Confirmándose estos resultados en el análisis multivariante sólo para la zona MM, donde los tumores de descendente presentan mayor probabilidad que los de ascendente de tener valores medios de densidad vascular por debajo de la media ( $p=0,01$ ).

La mayoría de la literatura revisada entre los que estudian la relación existente entre la localización tumoral y la angiogénesis (**Pietra et al. 2000, Banner et al. 1997, Vermeulen et al. 1999, Tanigawa et al. 1997, Giatromanolaki et al. 1999, Lee JC et al. 2000, Shan YS et al. 2003, Fenjvesi A 2003**) no encuentran correlación entre ambos, sólo en un estudio de Banner et al 1998 encontraron que los mayores recuentos vasculares se encuentran en los tumores de colon ascendente y los menores en colon descendente, pero a diferencia de nosotros, ellos no llegan a encontrar tal diferencia estadísticamente significativa.

Este hallazgo de unos mayores recuentos vasculares en colon derecho en relación a otras localizaciones estaría en consonancia con el incremento observado en los últimos años en la incidencia de los carcinomas proximales. Igualmente la patología molecular también muestra diferencias según la localización. Tumores con altos niveles de inestabilidad de los microsatélites (MSI-H) ó mutación del protooncogén Ras se localizan con más frecuencia en el ciego, colon ascendente y colon transversal (**Jass JR et. 1998, Rashid A et al. 1999, Tang WY et al. 1999**). Y como expusimos en la introducción, esta mutación está implicada en la elevación de factores angiogénicos, como el VEGF (**Rak J 1995**).



### ☛ *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos*

Hemos encontrado, sólo en el bivariante, perdiendo la significación en el multivariante, que los tumores que se localizan en colon descendente presentan un área vascular media en CT significativamente mayor ( $p=0.039$ ) que los localizados en colon transversal, y un perímetro vascular medio en CT, casi significativamente más grande ( $p=0.072$ ) que los tumores localizados en colon ascendente. Reflejando quizás unos menores niveles de angiogénesis en esta localización descendente dado que los vasos neoformados son más pequeños. Además, corroborando estos hallazgos tenemos el previo en relación a la menor densidad vascular de los tumores localizados en descendente.

**Los vasos de los bordes sanos no muestran diferencias en cuanto a la forma en unas localizaciones y otras. Sin embargo, los vasos del centro del tumor y del borde sano son mayores en el colon descendente.**

### Sexo

#### ● *Densidad vascular*

En el análisis multivariante encontramos que ser mujer conlleva 2.8 veces más riesgo de tener valores de densidad vascular en CT por encima de la media que los hombres, alcanzando la significación estadística ( $p=0,044$ ).

Nuestros resultados, al igual que los de Pietra N et al 2000, sugieren que la densidad vascular se correlaciona significativamente con el sexo, teniendo valores mayores de densidad vascular las mujeres en relación a los hombres. Esta observación podría estar relacionada con su diferente estado hormonal ya que estudios publicados previamente han mostrado que los estrógenos y los antagonistas estrogénicos pueden modular la angiogénesis tumoral en modelos animales (**Banerjee SK et al 1997, Cockerill GW et al 1995, Gagliardi AR et al 1996, Nakamura J et al 1996**), y aunque el papel de los estrógenos en el control de la angiogénesis en humanos no está claro aún (**Marinho A et al 1997; Siitonen SM et al 1995**), algunos autores opinan que los antagonistas estrogénicos podrían tener un papel en futuros

tratamientos no citotóxicos del cáncer colorrectal (**Hanauske AR 1996, Saclarides TJ 1997**).

A pesar de ello, nuestros resultados difieren de la mayoría de los autores que estudian la angiogénesis y el cáncer colorrectal, pues la mayoría de ellos no encuentran asociación entre la densidad vascular y el sexo (**Choi HJ et al 1998...**)

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos*

El tamaño y forma de los vasos no muestra ninguna asociación con el sexo.

#### Profundidad tumoral

- *Densidad vascular*

En el análisis multivariante hemos encontrado, con una tendencia a la significación estadística ( $p=0,053$ ), que los tumores que alcanzan la profundidad tumoral T3 presentan más probabilidad que los T1-T2 de tener valores medios de densidad vascular en CT, por debajo de la media de la misma ( $OR=0,178$ ).

Podríamos intentar explicar este resultado diciendo que la angiogénesis es necesaria para el crecimiento tumoral inicial hasta la submucosa, no siendo tan necesaria una vez que el tumor alcanza la muscular propia. Ello va en consonancia con la consideración de Bossi et al 1995 de que la angiogénesis es un suceso que ocurre precozmente en la tumorogénesis colorrectal. Por otra parte, la muscular propia es una zona de la pared intestinal muy bien vascularizada, y esta microvascularización preexistente pudiera ser suficiente para facilitar el crecimiento y diseminación tumoral en y desde este nivel de penetración, sin necesidad de neoangiogénesis (**Leedy et al 1994, Prall et al 2003**). Aunque, para corroborar esta hipótesis, deberíamos determinar la densidad vascular, además de con el CD34, con el CD105, el cual según los trabajos de Akagi K et al 2002, es un marcador más específico de neoangiogénesis en el cáncer de colon, pues marca las células endoteliales con actividad proliferativa; y del

cociente de dicho marcaje, quizás sí se pudiera establecer el índice de neoangiogénesis específica para cada profundidad de invasión tumoral.

Otros autores que también han estudiado la relación entre la profundidad de infiltración de la pared y la densidad vascular, tampoco han encontrado asociación significativa entre ellas (**Vermeulen et al 1999, Tomisaki MD et al 1996, Choi HJ et al 1998, Pietra N et al 2000**). Sin embargo, Takebayashi Y et al 1996, inmunomarcando con antiCD34 y Tanigawa N et al 1997 y Tarta C et al 2002, inmunomarcando con anti FVIII, vieron una asociación estadísticamente significativa entre la profundidad de penetración en la pared y la densidad vascular, encontrando que la densidad vascular se incrementaba significativamente conforme el tumor infiltraba más profundamente en el espesor de la pared, y apoyando así la hipótesis de que la progresión tumoral puede relacionarse con la angiogénesis.

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos*

Solo en el análisis bivalente, y sin llegar a alcanzar la significación estadística, obtenemos que los tumores que alcanzan la profundidad T1-T2, presentan valores medios de “compactness” vascular en CT mayores que los T4.

Luego, aunque sólo como tendencia a la significación estadística, en T1-T2 los vasos en CT, son mayores en número que los T3 y T4, **y con un mayor “compactness”. Son pues, más irregulares, pudiéndose interpretar estas características como que los tumores, al principio, muestran neovascularización intratumoral que se desarrolla con el tiempo, cuando el tumor infiltra a mayor profundidad, haciéndose más regulares en forma y disponiéndose en menor número por unidad de superficie.**

*En cuanto al estadio de Dukes:*

- Densidad vascular:

El estadio de Dukes solo ha sido considerado en el análisis bivalente, y no en el análisis multivalente, debido a que es la expresión de otros tres factores (profundidad de invasión, afectación ganglionar y metástasis), que sí que han sido considerados.

Sólo en el análisis bivariante encontramos una asociación significativa ( $p=0,018$ ) entre la densidad vascular en PT y el estadio D. Siendo la media de la densidad vascular en PT de los estadios D significativamente mayor a la de los estadios B2-B3. Igualmente, cuando dividimos a la muestra en dos grupos (hipo/hipervascular), obtenemos que los individuos con enfermedad metastásica a distancia se encuentran más frecuentemente en el grupo hipervascular de PT, aunque esto último, no llega a alcanzar significación estadística ( $p=0,068$ ).

Así, podríamos decir, que es el adyacente tejido sano el lugar determinante para la diseminación metastásica a distancia de la enfermedad, dado que es en la zona PT, y no en CT, donde los tumores con afectación metastásica presentan una significativa mayor densidad vascular que los tumores B2-B3.

Nosotros, a diferencia de otros autores (**Takebayashi Y et al 1996, Tomisaki SI et al 1996, Pavlopoulus PM et al 1998, Choi HJ et al 1998**), no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la densidad vascular entre los distintos estadios; no hemos visto ni un aumento, ni una disminución progresiva de la densidad vascular, conforme avanza el estadio. Pero, sí que encontramos, que la densidad vascular es significativamente mayor en tejido tumoral (PT y/o CT) que en el borde sano (MM); y que el estadio mas avanzado, el estadio D, o sea, el metastático a distancia, presenta una significativa mayor densidad vascular en PT que los estadios B2-B3. Esto, junto con el hallazgo también corroborado por otros autores (**Vermeulen et al 1999, Tanigawa et al 1997, Tomisaki et al 1996, Saclarides et al 1993**), de que los pacientes con enfermedad metastásica se distribuyen con más frecuencia en el grupo hipervascular (en nuestro caso de PT), sigue apoyando la hipótesis de Bossi P et al 1995, Pavlopoulus PM et al 1998 y evidenciado en estudios de experimentación (**Folkman J et al 1989**), y en otras extirpes tumorales p.ej mama y cervix (**Weidner N et al 1991, Bosari S et al 1992, Guidi A et al 1994, Hanahan D 1996, Dobbs SP 1997**), así como en nuestros resultados en relación a la densidad vascular tumoral y la profundidad tumoral, de que **la angiogénesis es un temprano y crítico suceso en la tumorogénesis colorrectal, y que para que el fenómeno metastásico tenga lugar tiene que existir un incremento sobreañadido en la densidad vascular (Mac Cawley LJ 2000, Liotta LA 1998).**

Otros autores, no encuentran ninguna correlación significativa entre el estadio de Dukes y la densidad vascular en el carcinoma colorrectal (**Lindmark G et al 1996, Vermeulen PB et al 1999, Bossi P et al 1995, Galindo Gallego ; et al 2000, Shan YS et al 2003**); ni entre la densidad vascular y el riesgo de metástasis en distintos tumores: mama, melanoma (**Hall NR et al 1992, Van Hoef M et al 1993, Carnochan P et al 1991**).

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos*

En cuanto a las características morfométricas vasculares, perímetro y “compactness”, obtenemos, aunque sólo con tendencia a la significación estadística, y sólo en el análisis bivalente que sus medias en el estadio D, tanto en las zonas CT como PT, son menores que en el estadio A-B1 ( $p=0.051$ ,  $p=0.098$  respectivamente para el perímetro y  $p=0.057$ ,  $p=0.098$  para el “compactness”). Es decir, en el estadio D la neoangiogénesis es mayor y sus vasos son más pequeños (menor perímetro), y menos **irregulares**, lo cual podría facilitar el intercambio transvascular. Este menor “compactness” del estadio D podría ser reflejo del incremento en la presión intraluminal, probablemente atribuible a la obstrucción existente, fruto del desorden estructural, **o a que los vasos neoformados en los tumores más incipientes en estadios más precoces de Dukes, son más irregulares, alcanzando un perímetro más redondeado a medida que el tumor progresa.**

Las condiciones hemorreológicas son dignas de investigación, pues pueden influir en el potencial proliferativo y metastásico tumoral. Se ha documentado que los patrones de flujo intravascular, pueden influir en la remodelación de la malla microvascular, a través de varios mecanismos, como la intususcepción (**Patan S et al 1996**).

Al igual que ocurre con la densidad vascular, nuestros resultados tampoco coinciden con los de Pavlopoulos PM et al 1998, en cuanto a las características morfométricas vasculares, ya que estos autores encontraron que conforme progresa el estadio de Dukes, existe un significativo descenso en la densidad vascular y un aumento en los valores de área y perímetro, sin encontrar diferencias en cuanto al “compactness”. Sin embargo, encuentran concordancia en el punto en que es el estadio con más densidad vascular, es decir, el que más vasos neoformados presenta el que tiene los vasos más pequeños (área, perímetro). Lo que nos

ayuda a plantear la hipótesis de que: los vasos neoformados son más pequeños y menos colapsados que los vasos maduros.

**Con los datos obtenidos en el análisis de la profundidad tumoral y estadio de Dukes podemos inferir que los tumores incipientes (T1-T2) muestran en su centro mayor densidad vascular que disminuye en los tumores más evolucionados (T3). En la periferia del tumor ocurre lo contrario: la densidad vascular es mayor en los tumores en estadio D de Dukes.**

**Con respecto a la forma de los vasos, tanto en el centro del tumor como en la periferia, en estadios más incipientes (A-B1 vs. D) los vasos son más irregulares; siendo también así, aunque sólo en CT, para los tumores más incipientes (T1-T2).**

*En cuanto a la enfermedad metastásica:*

- *Densidad vascular*

En el análisis multivariante encontramos con una tendencia a la significación estadística que los casos con enfermedad metastásica a distancia presentan 3,5 veces más riesgo, que los no metastáticos, de tener valores medios de densidad vascular en PT por encima de la media ( $p=0,081$ ).

Coincidimos con Vermeulen et al 1999, Tanigawa et al 1997, Tomisaki et al 1996, Saclarides et al 1993, Yamamura T et al 2001, Takahashi et al 1997, Choi HJ et al 1998 en que la densidad vascular en la zona tumoral, en nuestro caso en PT, es mayor en los tumores con enfermedad metastásica hematogena que los que no presentan tal diseminación (M1 vs M0).

A diferencia de los autores anteriormente citados, que sólo realizan la determinación de la densidad vascular en la zona tumoral, salvo Saclarides que sólo lo hace en la periferia tumoral, hemos determinado la densidad vascular tanto en la zona tumoral CT como en la periferia tumoral PT. Ello nos permite sugerir lo anteriormente mencionado, es la zona PT y no la CT el lugar clave para el desarrollo del fenómeno metastásico.

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos.*

Los pacientes con enfermedad metastásica en el momento diagnóstico inicial presentan en CT un casi significativo menor “compactness” vascular medio ( $p=0.097$ ) y en PT una significativa menor área ( $p=0.007$ ) y menor perímetro medio de sus vasos ( $p=0.005$ ). En el análisis multivariante el “compactness” pierde significación, y se mantienen para el perímetro y área, como una tendencia a la significación. Así, los casos con afectación metastásica a distancia, presentan más probabilidad que los no metastásicos, de tener valores medios de área y perímetro en PT por debajo de la media.

Yamamura et al 2001 encontraron que los tumores de colon con metástasis hepáticas presentan unos significativos mayores recuentos vasculares en comparación con los no metastásicos, y que el diámetro de sus vasos es significativamente mayor que el de estos últimos. Así, es posible que una mayor luz vascular facilite a las células tumorales invadir los microvasos, asociándose así a la formación de metástasis. Coincidiendo con estos resultados están los de Tsuji T et al 2002, quienes también encontraron que el diámetro microvascular puede ser un parámetro fundamental responsable de la intravasación de células tumorales, facilitándose así el primer eslabón metastásico. Estos autores observaron que aunque con la progresión tumoral disminuía el recuento vascular, se incrementaba el diámetro vascular de forma significativa.

Nosotros, al igual que Yamamura et al 2001, Tsuji T et al 2002, hemos realizado un estudio morfométrico de la vascularización tumoral en el cáncer de colon, pero a diferencia de ellos, no hemos determinado el diámetro vascular sino el área, perímetro y “compactness vascular”; el que encontremos en la enfermedad metastásica una significativa menor área y perímetro vascular creemos que está en consonancia con una significativa mayor densidad vascular. Los vasos neoformados son más pequeños (menor área y menor perímetro), pero a su vez presentan un menor “compactness vascular”, lo cual refleja una mayor luz vascular en relación a los no metastásicos, facilitándose probablemente así la intravasación tumoral.

En cuanto a la afectación ganglionar

• *Densidad vascular*

En el análisis multivariante obtenemos que la afectación nodal ganglionar N1 y N2 son factores de riesgo respecto a N0 de tener valores de densidad vascular en CT por encima de la media (2,6 y 4,7 veces más respectivamente que N0), aunque sólo llega a alcanzar significación estadística en N2.

Así, podemos decir que la angiogénesis interviene en el fenómeno metastásico ganglionar, relacionándose con el potencial biológico maligno del tumor. Y al igual que nosotros, otros investigadores, han encontrado una asociación significativa positiva entre la densidad vascular y la afectación ganglionar nodal, tanto en el cáncer de colon (**Saclarides et al 1994, Tanigawa et al 1997, Takebayashi Y et al 1996, Choi HJ et al 1998, Oh-e et al 2001**) como en otros tumores malignos, p.ej melanoma (**Srivastava et al 1988**), mama (**Weidner N et al 1992, Horak E et al 1992, Bosari S et al 1992, Arapandoni-Dadioti et al 1999**), próstata (**Halvorsen et al 2000**).

Otros autores, sin embargo, no han encontrado asociación entre los recuentos vasculares y la afectación ganglionar nodal, así en el cáncer de colon (**Bossi et al 1995, Galindo Gallego M et al 2000, Tomisaki et al 1995, Shan YS et al 2003**), mama (**Ogawa et al 1995, Hansen et al 2000**).

Nuestros resultados están en consonancia con los hallazgos de Akagi K (2000), quien realizó un estudio de la expresión de VEGF-C en tejidos de cáncer colorrectal en humanos, indicando sus datos una amplia correlación entre la expresión de VEGF-C y metástasis ganglionar nodal. VEGF-C es un ligando para los receptores tipo 3 de VEGF (VEGFR-3), cuya expresión tiene lugar no sólo en los vasos linfáticos, sino que también en el endotelio de los vasos sanguíneos, estimulando pues tanto la linfangiogénesis como la angiogénesis.

La mayoría de los autores que estudian la relación entre la densidad vascular con la afectación ganglionar, lo hacen considerando la afectación ganglionar como presente o ausente



(Saclarides et al 1994, Tomisaki et al 1996, Takebayashi Y et al 1996, Tanigawa et al 1997, Bossi et al 1995). A diferencia de ellos, nosotros distinguimos tres grupos N0, N1 y N2;

probablemente esta diferencia metodológica podría explicar en parte la diferencia en los resultados. Así, Vermeulen et al 1999 no encuentran diferencias cuando consideran la muestra en N- vs N+, y sí cuando distinguen entre N+ ( $\leq 3$ ) vs. N+ ( $> 3$ ).

Muy en desacuerdo con nuestros resultados están los de Prall et al 2003, quienes encuentran que la media de la densidad vascular en las zonas “hot spot” es menor en los casos con afectación ganglionar vs N-. Ellos consideran que la neoangiogénesis precede al carcinoma colorrectal, pero altos recuentos vasculares no impactan en la supervivencia. Y por otra parte, consideran que podría ser que la angiogénesis no tuviera lugar en el fenómeno metastásico nodal ganglionar.

- Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos (“compactnes”)

Los tumores N0 presentan vasos más irregulares, tanto en el centro como en la periferia del tumor, que los N2 y N1 respectivamente. Los tumores N1 y N2 tienen un tamaño vascular en el centro del tumor mayor que los tumores N0. Estos hallazgos, en relación al “compactness”, son paralelos a los encontrados al analizar la profundidad tumoral y el estadio de Dukes.

En cuanto al tamaño tumoral.

- Densidad vascular

No encontramos, ni en el análisis bivariante ni en el análisis multivariante, asociación significativa entre el tamaño tumoral y la angiogénesis (estudiada tanto cualitativa como cuantitativamente) en ninguna zona tumoral CT o PT.

Aunque los tumores sólidos proliferan automáticamente hasta un tamaño de unos pocos mm de diámetro, crecimientos sobreañadidos requieren de la angiogénesis (Folkman J 1990, Rofstad EK 1984).

Al igual que la mayoría de los autores que estudian la angiogénesis en relación al tamaño tumoral, lo hicimos en función del mayor diámetro tumoral, y al igual que ellos, no encontramos asociación significativa (**Tomisaki SI et al 1996, Vermeulen PD et al 1999, Tanigawa N et al 1997, Pavlopoulos PM et al 1998, Banner BF 1998, Shan YS et al 2003, Tarta et al 2002**). Sin embargo, Takebayashi et al 1996 encontró que el tamaño tumoral se correlacionaba significativamente con el conteo microvascular ( $p=0,001$ ), y sus resultados le sugirieron que las fases precoces y últimas del crecimiento tumoral colorrectal son facilitadas por la angiogénesis. Wapnir EL et al 2001, han postulado que dado que los tumores sólidos son tridimensionales, más que la determinación del diámetro mayor, sería el cálculo del volumen tumoral (ellos usaron la fórmula de la elipse para el cáncer de mama) el que nos daría más información de la importancia de la angiogénesis en el crecimiento tumoral, haciendo referencia a su tamaño. Así, expresando el tamaño en función del mayor diámetro ellos no encuentran variaciones significativas entre los distintos grupos de tamaño; sin embargo, sí que la encuentran cuando determinan el recuento microvascular en función del volumen tumoral.

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos*

No encontramos asociación alguna en cuanto a la determinación morfométrica de la angiogénesis y el tamaño tumoral, ni en el análisis bivariante ni en el análisis multivariante.

*En cuanto al grado de diferenciación tumoral.*

- *Densidad vascular*

La determinación cuantitativa de la angiogénesis no se asocia significativamente en ninguna zona tumoral con el grado de diferenciación tumoral.

Pavlopoulos PM et al 1998, encontraron que la densidad vascular es más baja en los tumores moderadamente diferenciados (MD) que en los pobremente diferenciados (PD); sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística ( $p=0,178$ ). Diversos autores sí

llegan a encontrar asociación significativa entre la densidad vascular tumoral y el grado de diferenciación, siendo los PD los que se asocian a los mayores recuentos vasculares en

comparación a los BD (Tanigawa N et al 1997, Galindo Gallego et al 2000, Hiroto O-e et al 2001, Choi H et al 1998, Fenjvesi A 2003). Sin embargo, otros autores al igual que nosotros, (Tomisaki S-I et al 1996, Vermeulen et al 1998, Bossi et al 1995, Lindmark et al 1996; Takebayashi Y et al 1996, Tarta C et al 2002, Pietra N et al 2000, Shan YS et al 2003) tampoco encuentran asociación entre el grado de diferenciación y la determinación de angiogénesis.

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos.*

En el análisis multivariante, los tumores PD presentan más probabilidad que los BD de tener valores medios de perímetro y área vascular en CT por debajo de la media ( $p=0,004$  y  $p=0,036$  respectivamente). En relación al “compactness”, en el análisis multivariante se mantiene el modelo en esta zona, y encontramos que los PD tienen más probabilidad que los BD de tener valores de compactness por debajo de la media en PT; pero dicha asociación no es significativa.

Nuestros resultados están en consonancia con los de Pavlopoulos PM et al 1998, que al igual que nosotros, realizaron un análisis de parámetros morfométricos y encontraron variaciones morfológicas cuantitativas en el patrón vascular entre los distintos grados de diferenciación. Ellos encuentran que los tumores BD presentan unos mayores valores de “compactness” en relación a las neoplasias PD. Y al igual que estos autores, pensamos que estos hallazgos pueden sugerir una incrementada presión intraluminal en las neoplasias PD, atribuible probablemente a la obstrucción resultante del desorden estructural.

### Obstrucción.

- *Densidad vascular*

No encontramos asociación, ni con tendencia a la significación, en relación a la determinación cuantitativa de la angiogénesis y la existencia de obstrucción en ninguna zona tumoral.

En la revisión realizada de la literatura sólo hemos encontrado un estudio que analice la angiogénesis y las complicaciones preoperatorias, el de Pietra N et al 2000, quienes al igual que nosotros, no encuentran ninguna asociación significativa entre la existencia de dichas complicaciones y la angiogénesis, considerada cuantitativa o cualitativamente, en ninguna zona tumoral (CT/PT).

- *Área, Perímetro y Factor de forma de los vasos.*

Al igual que ocurre con la densidad vascular, no encontramos ninguna asociación entre la existencia de obstrucción y el área, perímetro o “compactness” vascular en las zonas tumorales. Pero, sí encontramos en el análisis multivariante que los tumores obstruidos presentan casi 3 veces más probabilidad que los no obstruidos de tener valores medios de área vascular en su borde sano por encima de la media ( $p=0,032$ ).

No hemos encontrado ningún resultado similar en la literatura revisada.

## **5.2.2.-Determinación de fibrosis .Reacción Desmoplásica.**

### **5.2.2.1.-Reacción desmoplásica y angiogénesis**

En el análisis multivariante encontramos que unos valores medios de perímetro de fibrosis por encima de la media representan un factor de riesgo significativo (cuatro veces más riesgo), respecto a valores de dicho perímetro por debajo de la media, de tener valores de densidad vascular en el centro tumoral (CT) por encima de la media.

Igualmente, en el análisis bivariante, ocurre con el área de fibrosis y la densidad vascular en CT; que los tumores con unos valores medios de área de fibrosis por encima de la media se suelen encontrar más frecuentemente en el grupo de los tumores hipervasculares en CT ( $p=0,029$ ); sin embargo ello pierde su significación en el análisis multivariante.

Así, de los resultados de nuestro estudio se puede deducir que: existe una asociación significativa entre la densidad vascular en CT y el área, pero sobre todo con el perímetro de

fibrosis. Por otra parte, es un resultado a esperar, dado que es múltiple la evidencia; algunos de los mismos factores de crecimiento que están implicados en la angiogénesis también lo

están en la activación de los miofibroblastos e intervienen en la formación de la matriz extracelular (Dvorak HF 1992, Gospodaronicz D 1987; Walker RM A 2001).

**No hemos encontrado en la literatura revisada, ningún trabajo que realice un estudio simultáneo de angiogénesis y reacción desmoplásica en el cáncer de colon.**

Vermeulen PB et al 2001, estudiaron las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal y observaron que crecían en tres patrones distintos con diferente grado de angiogénesis y desmoplasia. En el patrón de crecimiento desmoplásico había significativamente más microvasos (CD 34 +) que en el resto de los patrones, y además, el porcentaje de vasos inmaduros, que no estaban cubiertos por pericitos, era también mayor.

**5.2.2.2.- Determinación de fibrosis y su asociación con otras variables clínico-patológicas:**

- Área y Perímetro de fibrosis.

#### *Grado de diferenciación tumoral*

Cuando medimos el perímetro de fibrosis vemos, tanto en el análisis bivariante como en el multivariante, que sus valores son mayores conforme progresa la **indiferenciación tumoral**. Así, en el análisis multivariante obtuvimos que los tumores PD presentan un riesgo mayor de 7 veces en relación a los BD de tener valores medios de PF por encima de la media. Sólo en el análisis bivariante, y no en multivariante, y sin llegar a alcanzar significación estadística, encontramos además que el área de fibrosis de los tumores MD es mayor a la de los BD. Coincidimos pues con Ichiro Nakada et al 1998, quienes encontraron que son los tumores con más indiferenciación (en su caso los MD vs BD) los que asocian reacción desmoplásica.

#### *Profundidad tumoral*

En el análisis multivariante, aunque no llegue a alcanzar la significación estadística, obtenemos que a mayor penetración tumoral en el espesor de la pared, mayor es el riesgo de tener valores superiores a la media de perímetro de fibrosis, en relación a la categoría de referencia T1-2. Así, los tumores T3 presentan casi 6 veces más riesgo que los T1-2, y los T4, 7 veces más. En ello coincidimos con las observaciones de Ohtani y Sasano 1983, y las de Ichiro Nakada et al 1998, quienes sugieren que los carcinomas sólo inducen una vigorosa reacción desmoplásica tras producirse la invasión a través de la muscularis mucosae.

Aunque no se conoce cual es el papel exacto de la reacción desmoplásica, distintos autores postulan la hipótesis de considerarla como una reacción del huésped frente a la neoplasia, con intención de aislarla e impedir su progresión (**Hewitt et al 1993, Barsky y Gopalakrishna 1987, Schurch W 1981, Seemayer TA 1979, Miura S et al 1993, Watanabe SH et al 1995**). Desde esta perspectiva parece lógico pensar que sean los tumores más indiferenciados los que tienen más capacidad de penetrar a través de la pared en los que sea necesario generar más esta reacción. Por otra parte, esta reacción es consecuencia del efecto de una serie de factores de crecimiento, muchos de ellos con acción angiogénica, liberados tanto por las células tumorales como estromales (fibroblastos, miofibroblastos), por mecanismos auto y/o paracrinos (**Walter RM A et al 2001, Hauptmann S et al 2003, Shao et al 2001**). Y son los tumores con mayor capacidad invasiva, los más indiferenciados y los que sobrepasan la submucosa, los que poseen mayor capacidad histológica de interacción con las células del estroma circundante generando desmoplasia (**Naito L et al 1982; Hewitt et al 1993; Fisher et al 2000**).

#### *Localización tumoral*

La **localización tumoral** ascendente se ha mostrado, aunque sólo en el análisis bivariante, como una variable independiente en relación al perímetro de fibrosis; los tumores de dicha localización presentan unos valores medios de perímetro de fibrosis mayores que los de la localización descendente ( $p=0,036$ ). Ya en el estudio de angiogénesis también obtuvimos que la localización ascendente tenía unos valores mayores de densidad vascular, siendo estos

vasos más pequeños (menor perímetro) en CT. Así, parece que en este medio más neoangiogénico es donde se genera también más desmoplasia.

### *Estadio tumoral*

Los tumores que llegan a alcanzar los estadios más avanzados, C1-C3 versus A-B1, presentan unos valores superiores de perímetro de fibrosis; este resultado solo se observa en el análisis bivariante como tendencia a la significación estadística; esta variable no se incluyó en el estudio multivariante.

### *Recidiva loco-regional*

Los tumores que presentan recidiva locoregional presentan mayor perímetro de fibrosis respecto a los que no la presentan; solo en el análisis bivariante y como tendencia a la significación estadística.

Si sólo determinamos el área y perímetro de fibrosis podríamos decir, según nuestros resultados, que esta reacción medida en el adyacente borde tumoral y generada según la hipótesis de diversos autores (**Hewitt et al 1993, Barsky and Gopalakrishna 1987, Schurch W 1981, Seemayer TA 1979, Miura S et al 1993, Watanabe SH et al 1995**), con la intención de frenar la diseminación tumoral, fracasa en su objetivo. Obtenemos que los tumores de estadios más avanzados y los que recidivan son, aunque sólo en el análisis bivariante, los que presentan mayores valores de perímetro de fibrosis.

Sin embargo, cuando estudiamos la reacción desmoplásica a través de su “compactness”, vemos en el análisis multivariante que son precisamente los tumores con capacidad metastásica, tanto ganglionar como a distancia, los que presentan unos significativos valores superiores de “compactness” en relación a sus categorías de referencia.

Tener valores mayores de “compactness” tiene una significación distinta, de tenerlos de perímetro de fibrosis, cuanto mayor es el compactness, aunque las medidas de perímetro de fibrosis sean mayores, más irregular es la reacción desmoplásica

---

*“Compactness” de fibrosis*

*Afectación metastásica ganglionar*

Los tumores con afectación ganglionar N1 presentan en el análisis multivariante un significativo mayor riesgo (casi seis veces) de tener unos valores medios de “compactness” de fibrosis por encima de la media, en relación a los N0.

*Metástasis a distancia*

En el multivariante, aquellos tumores que presentan metástasis a distancia poseen casi 12 veces mayor riesgo que los que no la presentan de tener valores medios de “compactness” de fibrosis por encima de la media.

Así pues, es en los tumores con capacidad metastásica donde tenemos una reacción desmoplásica más irregular.

*Recidiva loco-regional.*

En el análisis bivariante vimos como el “compactness” de fibrosis es mayor en los que presentan recidiva locorregional frente a los que no.

*Componente mucosecretor.*

El “compactness” de fibrosis es mayor en los que presentan componente mucosecretor frente a los que no lo presentan; perdiendo la significación en el análisis multivariante.

*Profundidad tumoral.*

Solo como tendencia a la significación estadística en el análisis bivariante, en los tumores T4 el “compactness” es mayor que en los T3.



*Grado de diferenciación.*

En los PD versus MD, también es mayor el “compactness” medio de fibrosis; solo en el análisis bivalente y como tendencia a la significación estadística.

*Localización tumoral.*

En el análisis multivariante, los tumores de localización descendente presentan mayor probabilidad que los de localización ascendente de tener valores medios de “compactness” de fibrosis por debajo de la media ( $p=0,043$ ); luego, los tumores de localización ascendente, presentan una reacción desmoplásica de mayor perímetro y “compactness” que los de localización descendente. Comportándose en este sentido igual que los tumores con mayor capacidad invasiva.

En la revisión realizada de la literatura no hemos encontrado ninguna referencia al respecto.

**Fruto de estos resultados podría pensarse que esta reacción desmoplásica, que se genera más extensamente (mayor perímetro o área de fibrosis) en los tumores más invasivos (los PD vs MD, T3 y T4 vs T1 -T2, mucosecretores vs no mucosecretor, recidivados loco-regionalmente vs no recidivados, C1-C3 vs A-B1), se desestructura también más, es mas irregular en ellos (mayor “compactness” medio de fibrosis). Así, estos tumores generan en el huésped una mayor reacción, pero por otra parte, poseen una maquinaria más potente, p.ej. las enzimas degradativas de la matriz, entre otros mecanismos, para remodelarla y permitir a sus células fenotípicamente mas invasivas atravesar dicha barrera para poder propagarse. Estos resultados están en consonancia con los de otros autores (Zeng Z.S et al 1996; Gatenby y Taylor 1990; Shiozawa J 2000; Adachi Y 2001).**

Son pocos los estudios que hemos encontrado que hayan estudiado la relación existente entre la reacción desmoplásica y el cáncer de colon; destacamos el de Hewitt RE et al 1993, Ichiro Nakada et al 1998, Offerhaus G et al 1990, Ueno H et al 2004.

---

Nishimura R et al 1998 han estudiado la significación de la presencia de focos de fibrosis en el cáncer colorrectal. Algo más frecuentemente estudiado ha sido la estructura de las membranas basales en el cáncer colorrectal (**Havenith MG et al 1988, Daneker GW et al 1987, Hewith et al 1991, Burtin P et al 1982, Foster SJ et al 1986**).

**De nuestro estudio se puede deducir un paralelismo, cuando hablamos de alto “compactness” de fibrosis, con los resultados de otros autores cuando hablan de débil reacción desmoplásica (Hewitt et al 1993), componente estromal inmaduro (Ueno H et al 2004) o altos niveles de metaloproteinasas (MMPs), en pacientes con cáncer colorrectal (Zeng et al 1996, Shiozawa J et al 2000, Adachi Y et al 2001).**

Nosotros, al igual que estos autores, que encuentran mayores niveles de MMPs en los tumores PD frente a los MD, en los que alcanzan mayor nivel de penetración en la pared, en los casos con afectación ganglionar frente a los que no la presentan, en los metastásicos a distancia vs no metastásicos; encontramos también en estos casos mayores valores de “compactness”. Quizás, el que la reacción desmoplásica sea más irregular en estas situaciones sea reflejo de la acción de estas metaloproteinasas; las cuales, precisamente se generan más en un medio más neoangiogénico. Y son en estas situaciones ( la localización ascendente, los tumores más indiferenciados, los metastásicos tanto ganglionar como a distancia), en las que encontramos los mayores valores de densidad vascular. Así parece, que en este medio más neoangiogénico es donde por un lado se genera también más desmoplasia, pero por otro, esta es menos compacta, más irregular. Ciertamente, como expusimos en la introducción, existe un paralelismo entre el proceso de generación de neovasos y la cascada metastásica, comparten una vía común. Muchos de los mecanismos necesarios para la generación de brotes vasculares son también necesarios para que las células tumorales invadan la pared del colon hasta llegar a la corriente sanguínea. Así, parece lógico que la mayor neovascularización potencie el desarrollo de este suceso. Entre estos mecanismos comunes destacamos la ruptura de la membrana basal y de la matriz extracelular realizada por las MMPs, las cuales son secretadas tanto por las células endoteliales, como estromales (miofibroblastos). Sugiriéndose así, en estas situaciones, un mayor “turn over” estromal para las proteínas de matriz, sobre todo colágeno. Por un lado se generan más (mayor área, mayor perímetro de

fibrosis); pero por otro lado, esta respuesta estromal puede verse frenada, desestructurada, por la presencia de factores inhibitorios presentes en el borde invasivo de estos carcinomas (**Gatenby RA y Taylor 1990, Adachi Y 2001, Shiozawa J 2000**). Consecuentemente, la matriz estromal en estos tumores puede estar sujeta a remodelación más que ser una estructura estática. En consonancia con esta idea, está el estudio de Hewitt et al 1993, en el que en la periferia tumoral de algunos carcinomas encontraron mediante ISH altos niveles de síntesis de colágeno I, mientras que su determinación con inmunohistoquímica apreciaba niveles disminuidos. Ello probablemente sea secundario a los altos niveles de MMPs en el borde invasivo de los carcinomas colorrectales (**Hewitt 1991; Zeng ZS 1996; Shiozawa J et al 2000**).

¿Por qué se asocia una respuesta desmoplásica con alto “compactness” en la periferia tumoral a una incrementada capacidad invasiva y metastásica?

-Se ha sugerido que la desdiferenciación glandular es una característica del borde invasivo de las células del cáncer colorrectal, considerada como el primer y crucial paso en la invasión tumoral, y que puede ser debido a una deficiencia de colágeno I en estos sitios (**Hewitt et al 1993**). Así, factores tisulares del huésped pueden estar implicados en la iniciación y mantenimiento del proceso de desdiferenciación (**Gabbert et al 1985**). **Ueno H et al 2004** observaron que los mayores índices de brotes tumorales germinativos por campo se encuentran en los casos con estroma inmaduro. Nosotros encontramos un mayor compactness de fibrosis en los casos PD vs MD, lo que puede representar que el borde del tumor es más “infiltrativo” en el estroma en vez de “empujar” al mismo

-Los estudios de David G and Bernfield 1981 de cultivos celulares y desarrollo embrionario sugieren que el colágeno I tiene un efecto estabilizante morfogénico. Por analogía, la actividad invasiva e integridad de la membrana basal extracelular en sitios específicos del carcinoma colorrectal puede depender del balance entre la síntesis de colágeno I y la producción intersticial de colagenasa por las células del adyacente tejido conectivo. Así, los miofibroblastos producen tanto componentes de la matriz como enzimas capaces de degradarla (MMPs), (**Martin M 1996**). .

Nosotros, a diferencia de Hewitt et al 1993, no hemos comparado la reacción desmoplásica entre las distintas zonas tumorales, sino sólo adyacente al borde invasivo; pero

nuestros resultados concuerdan con dicho autor en el sentido de que la débil respuesta desmoplásica, en nuestro caso el alto “compactness” de la misma en el borde invasivo, se asocia a una incrementada capacidad invasiva y metastásica (siempre y cuando admitamos que la débil respuesta desmoplásica de Hewitt sea equivalente a un alto “compactness” nuestro).

También apoya esta hipótesis Barsky y Gopalakrishna 1987 quienes encontraron que la L-3,4 hidroxiprolina induce inhibición de la respuesta desmoplásica conduciendo a un incremento de las metástasis espontáneas en los melanomas murinos de experimentación.

Estas observaciones coinciden con las de Miura S et al 1993 en el cáncer colorrectal y con las de Watanabe SH et al 1995 en el carcinoma gástrico; estos últimos estudiando la reacción estromal mediante la determinación de la proliferación de miofibroblastos y síntesis de colágeno I y III consideraron que tanto la proliferación de miofibroblastos como la síntesis de estroma tumoral eran una obvia respuesta del huésped frente a la neoplasia.

Otros autores han estudiado el depósito de colágeno IV y laminina en las membrana basales de los pacientes con cáncer colorrectal encontrando una relación significativa entre depósitos discontinuos o ausentes de dicho colágeno en las membranas basales y tumores más indiferenciados, con mayor profundidad de infiltración en la pared, con una mayor tendencia a la diseminación metastásica, ganglionar y a distancia, así como unas supervivencias más cortas (**Burtin et al 1983, Forster SJ et al 1986, Stenback et al 1985, Havenith et al 1988, Hewitt RE et al 1991,1994** ).

Estos hallazgos, y su correlación con la supervivencia, sugieren que la membrana basal (MB) en los carcinomas colorrectales puede tener una función de barrera. Además, la evidencia muestra un paralelismo entre el estado de las membranas basales y el del estroma extracelular (**Hewitt RE et al 1994**). Hewitt RE et al 1994, realizaron un estudio sobre la influencia local de los tejidos del huésped en la continuidad de la membrana basal en los carcinomas colorrectales, y sus resultados les sugirieron que los tejidos del huésped pueden influir en la actividad invasiva a través de su efecto en la continuidad de la membrana basal. Así, observaron que para los carcinomas colorrectales es evidente la marcada asociación entre la discontinuidad de la membrana basal epitelial, donde el tumor es adyacente a un estroma

deficiente en colágeno I, con un marcado potencial maligno. Sin embargo, cuando estudian las muestras de tejido metastásico de cáncer de colon en ganglios linfáticos o en hígado, encuentran una tendencia a mayor continuidad de las membranas basales.

De estos trabajos, y del nuestro, surge la idea de que tanto el estado de las membranas basales, como de los focos de fibrosis, así como de la reacción desmoplásica, no son definitivos ni estáticos. Tanto las membranas basales como el estroma están en continua formación y destrucción, y el resultado de este balance puede ser que se modifique en los distintos tiempos en función de los distintos factores generadores e inhibidores o degradativos, facilitando o dificultando así los fenómenos de invasividad y metástasis (factores de crecimiento, metaloproteinasas). Y ello, probablemente, como reflejo del estado de la interacción entre células neoplásicas y las adyacentes mesenquimales. Así mismo, parece existir un paralelismo entre el estado de las membranas basales y los niveles de colágeno I (principal componente de la matriz extracelular). Pero para conocer mejor la función exacta de la reacción desmoplásica, además de su cuantificación morfométrica y estudio estructural, sería importante conocer las concentraciones de las moléculas que la componen, como se deduce de los trabajos de Hauptmann S et al 2003, Ueno H et al 2004.

### **5.2.3.-Análisis de supervivencia**

#### **5.2.3.1.-Factores clínico -patológicos tradicionales**

En el *análisis de Kaplan-Meier (K-M)*: el *estadio de Dukes*, la *profundidad tumoral*, *afectación ganglionar*, *enfermedad metastásica*, *recidiva locoregional* y *a distancia*, presentan asociación significativa con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG).

De manera que, conforme progresa la categoría de estas variables independientes, existe una disminución progresiva del tiempo medio de supervivencia, tanto de la SG como de la SLE.

Para el *análisis de Cox*: debido al porcentaje de casos censurados hemos construido dos modelos; en el primer modelo, el más valido, en el que no hemos considerado ni al estadio de Dukes ni a ambas recidivas, obtenemos como factores predictores significativos la *profundidad tumoral*, la *infiltración ganglionar* y la *enfermedad metastásica*.

- Para la profundidad tumoral, tanto en cuanto a SLE como para SG, el riesgo no es estadísticamente significativo, aunque sí muestra tendencia a la significación. Así por ejemplo, para la SG, un individuo con profundidad tumoral T3 respecto a otro con profundidad tumoral T1-T2, y a igualdad de condiciones en el resto de parámetros (infiltración ganglionar y enfermedad metastásica), tiene 1,5 veces más riesgo de presentar el fenómeno de estudio (muerte). En el caso de los individuos con profundidad T4, el riesgo es casi 5 veces mayor. En ambos casos el riesgo no es estadísticamente significativo, aunque sí muestra tendencia a la significación.
- Con la afectación ganglionar ocurre en el análisis de Cox igual que con la profundidad tumoral; siendo dicho riesgo sólo estadísticamente significativo para N2, tanto en relación a la SG como SLE.
- La enfermedad metastásica sí alcanza la significación estadística en el análisis de Cox tanto para la SG como para la SLE. Así, para la SG un individuo con enfermedad metastásica tiene 7 veces más riesgo de morir que un individuo que no la ha tenido, con una  $p=0,005$ ; y para la SLE 10 veces más que un individuo que no la ha tenido.

En el segundo modelo del análisis de Cox, en el que se incluyen a ambas recidivas y al estadio de Dukes, sólo *ambas recidivas*, y no el estadio de Dukes, alcanzan valor como predictores significativos tanto para la SG como para la SLE

### **5.2.3.2.-Angiogenesis**

La densidad vascular no presenta asociación pronóstica alguna, ni con la SG ni con SLE. Sin embargo, la determinación morfométrica de la misma a través y sólo a través de su “compactness”, se ha mostrado en el análisis de *Kaplan Meier* como variable pronóstica independiente para ambas supervivencias, la SG y SLE. Así, el “*compactness*” vascular en

*CT* se asocia casi significativamente con la SG ( $p=0,0679$ ) y la SLE (0,062); **los casos que presentan unos valores medios de compactness vascular en CT iguales o por debajo de la media presentan 91 meses de tiempo medio de supervivencia global y 87 de SLE; los casos que presentan valores medios de compactness vascular en CT por encima de la media presentan 124 meses de tiempo medio de SG y 122 de SLE.**

En el análisis de Cox el compactness vascular en CT pierde su valor como factor predictivo en el primer modelo, el más válido, en el que no incluimos ni el estadio de Dukes ni ambas recidivas porque elevan el porcentaje de muestra perdida. Sin embargo, en el segundo modelo de Cox, en el que sí incluimos a dichas variables, el *compactness vascular en CT* toma valor significativo como factor protector en cuanto a la SG y SLE. Así, tener un “compactness” vascular medio en CT por encima de la media conlleva más probabilidad, que los que lo tienen por debajo de la media, de sobrevivir.

En nuestro estudio, a diferencia de otros autores, que sí han encontrado asociación entre un mal pronóstico y altos recuentos de densidad vascular ( **Saclarides et al 1994, Frank et al 1995, Tomisaki SI et al 1996, Engel et al 1997, Takebayashir et al 1996a y 1996b, Takahashi et al 1997, Tanigawaτ et al 1997, Choi HJ et al 1998, Vermeulen PB et al 1999, Fenjvesi A 2003**), no hemos encontrado una asociación pronóstica en el cáncer de colon entre la determinación cuantitativa de la angiogénesis y la SG/SLE .

Coincidimos pues con Bossir et al 1995, Pavlopoulosτ et al 1998, Fox et al 1998, Sternfeld et al 1999, Pietra N et al 2000, Tarta C et al 2002, quienes tampoco encontraron correlación entre la densidad vascular y supervivencia en el cáncer colorrectal. Otros autores, sí encontraron una asociación significativa entre altos recuentos vasculares ( IMD ) y mayor supervivencia ( **Lindmarkτ et al 1996, Prall F et al 2003, Abdalla et al 1999, Shan YS et al 2003**), ( los que presentan τ tanto en el bivalente como en el multivalente ).

Las discrepancias entre estos estudios son a menudo atribuidas tanto al diseño de los mismos como a diferencias en la metodología ( **Vermeulen et al 1999, Pietra N et al 2000, Banner BF et al 1997, Hasan J et al 2002**); por ejemplo: a los diferentes tipos de anticuerpos

usados para inmunomarcarse los vasos (FVIII versus CD31, versus CD34), a las diferencias en el tamaño de campo a la hora de realizar el conteo, a la experiencia del observador. Sin embargo, probablemente como apunta Prall F et al 2003, además del problema metodológico existen otros factores relacionados con las características biológicas de este tipo de cáncer y el tejido base sobre el que se origina; por ejemplo: el cáncer de mama crece en un tejido conectivo más avascular mientras que el de colon infiltra dentro de unas capas ampliamente vascularizadas, y a la hora de determinar la densidad vascular con los anticuerpos panendoteliales habituales es muy difícil discriminar entre vasos neoformados y preexistentes. Pero por otra parte, como se ha demostrado en algunos estudios, el cáncer de colon a diferencia del de pulmón no es de los tumores del tipo no angiogénico, ya que existe un alto número de células endoteliales proliferantes determinado a través del doble marcaje Ki67/FVIII (**Pezzella et al 1997, McGuire et al 1997**). Luego, la neoangiogénesis se hace presente en el cáncer colorrectal, pero la densidad microvascular no tiene impacto en la supervivencia. Prall F et al 2003, también señalan como otra posible explicación para esta ausencia de significación pronóstica la asociación existente entre la alta densidad microvascular con la respuesta linfocítica. El infiltrado linfocítico podría elaborar mediadores angiogénicos, y así estimular la proliferación de microvasos. Así, un mejor pronóstico asociado con alta densidad microvascular podría ser un epifenómeno, y la verdadera razón para el buen pronóstico sea la reacción del huésped frente al cáncer como reflejo de la respuesta linfocítica.

Sin embargo, coincidimos con Pavlopoulos PM et al 1998 en que aunque no encontramos significación pronóstica en la determinación de la densidad vascular en las áreas hot spots, es la determinación de una de las características morfométricas de la angiogénesis, en nuestro caso el “compactness” vascular en CT y en el de estos autores el TVA (área vascular total), la que nos da información pronóstica. El área vascular total hace referencia a la proporción de área intensamente inmunomarcada en relación al total de superficie inmunomarcada, y el “compactness” vascular es una de las características de los vasos inmunomarcados que expresa la relación existente entre el perímetro y el área ( $\text{perímetro}^2/\text{área}$ ). Tener un mayor “compactness” vascular medio supone tener unos vasos más colapsados (o más irregulares), lo



cual teóricamente dificultaría el intercambio transvascular, disminuyendo la posibilidad de que las células tumorales entren en el torrente circulatorio y por tanto dificultando el proceso de invasión y metástasis. Así, de esta manera se justificaría el **aumento de la SLE y SG en los enfermos que ante idénticas determinaciones de densidad vascular presentan unos mayores valores de “compactness”** o inferiores de TVA. Estos datos corroboran nuestros resultados previos en relación al “compactness” vascular medio en PT y CT, en el análisis multivariante, donde vimos que los casos N1 y N2 respectivamente tenían mayor probabilidad que los N0 de tener valores medios de “compactness” por debajo de la media. Pavlopoulos también encontró un incremento significativo de las ramificaciones vasculares en los estadios precoces de los carcinomas en comparación con los adenomas, permaneciendo dichas ramificaciones inalteradas a través de los distintos estadios de Dukes. Por lo tanto, manifiesta una diferencia significativa entre la malla neovascular con la del tejido normal, siendo ello de importancia pronóstica significativa como lo demostró su estudio de Kaplan Meier.

En nuestro estudio, al igual que en otros muchos que estudian la angiogénesis en el cáncer de colon, vemos como la neoangiogénesis está presente en este proceso; hemos visto al igual que otros autores unos significativos mayores recuentos vasculares en el tejido enfermo en relación al sano; la evidencia de otros trabajos como los de Vermeulen 1995, Prall F et al 2003, que han determinado la fracción de células proliferantes, también corroboran esta observación. Sin embargo, parece lógico pensar que aunque la angiogénesis es un suceso presente en el cáncer de colon no sea sólo su determinación cuantitativa el único factor que pueda o no tener transcendencia pronóstica, sino que su estudio morfométrico estructural también es clave en este aspecto, como lo han puesto de manifiesto los trabajos de Pavlopoulos et al 1998, Yamamura T et al 2001, Prall F et al 2003. Prall F et al, encuentran que los pacientes con una densidad vascular por encima de la media asocian un mejor pronóstico en relación a los que lo tienen por debajo de la media; sin embargo, al igual que nosotros, encuentran una asociación entre las características estructurales de la malla microvascular y el pronóstico; así encuentran una asociación significativa entre un mayor desorden estructural y una menor densidad vascular, asociándose ello a un peor pronóstico en cuanto a la supervivencia. No sólo el que exista más

densidad vascular favorece la diseminación metastásica, sino que además esos vasos presenten un mayor desorden estructural, unas membranas basales rotas, un menor “compactness”...Y además de estos puntos, existen otros muchos, y muy diversos factores que son clave para que toda la cascada metastásica llegue a su fin, como por ejemplo: proteínas que controlan el ciclo celular, la apoptosis, receptores de matriz, moléculas de adhesión, MMPs.....

**Tabla comparativa pronóstico cáncer colon**

Autores que encuentran asociación entre mal pronóstico y altos recuentos vasculares	No asociación	Buen pronóstico asociado a altos recuentos vasculares.
Saclarides 1994 Frank 1995 Tomisaki SI 1996 Engel 1997 Takebayashi 1996 Takahashi 1997 Tanigawa 1997 Choi HJ 1998 Vermeulen PB 1999 Fenjvesi A 2003	Bossi 1995 Pavlopoulos 1998 Fox 1996 Sternfeld 1999 Pietra N 2000 Tarta C 2002	Lindmark 1996 Prall F 2003 Abdalla 1999 Shan YS 2003

**5.2.3.3.-Desmoplasia.**

Al igual que ocurre con la angiogénesis, en la desmoplasia sólo el “compactness” de fibrosis se presenta en el *análisis de Kaplan Meier* como variable pronóstica independiente, en este caso, a diferencia del “compactness” vascular, como factor de riesgo y alcanzando la significación estadística tanto para la SG (p=0,0337) como para la SLE (p=0,0465). Los individuos que presentan un valor medio de “compactness” de fibrosis igual o por debajo de la media tienen un tiempo medio de supervivencia global de 124 meses y 122 de SLE; y los que lo tienen por encima de la media presentan 69 meses de tiempo medio de SG y 65 meses de tiempo medio de SLE.

**A mayor “compactness” de fibrosis, menor supervivencia; es decir, a fibrosis más irregular, menor supervivencia.**

En el *análisis de Cox*, al igual que para la angiogénesis, el “compactness” de fibrosis pierde su valor pronóstico en el primer modelo, manteniéndolo en el segundo sólo para la SG. Los individuos con un “compactness” de fibrosis por encima de la media conlleva 5 veces mayor riesgo que los que lo tienen por debajo de la media de presentar valores menores de supervivencia global.

Los resultados en el segundo modelo de Cox sobre el “compactness” vascular de CT y de fibrosis indican una posible asociación que hay que tomar con cautela debido al porcentaje de casos perdidos (23,2%) y a la asociación encontrada entre la muestra perdida y varios de los parámetros de estudio.

Nuestros resultados están en consonancia con los de otros autores que han estudiado el impacto de las enzimas degradativas de la matriz extracelular y membranas basales en la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon. Debido a que el colágeno IV es el mayor componente de las membranas basales y su pérdida se asocia a alto potencial metastásico a distancia y pobre pronóstico (**Forster SJ et al 1986**), diversos autores han estudiado la significancia pronóstica de las MMPs que lo destruyen selectivamente (MMP-2y MMP-9). Así, Zeng ZS 1996, encontró que los niveles de MMP-9 RNA son un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad, tanto en el análisis univariante como en el multivariante; y solo en el univariante para la supervivencia global (quizás reflejando el corto tiempo de seguimiento). Bernhard EJ et al 1994 observaron que la expresión de MMP-9 se asocia al fenotipo metastásico. Y en consonancia con estos resultados están también los de Tutton MG et al 2003.

El aumento de la expresión de cathepsin B en los estadios III/IV del cáncer colorrectal se asocia con corta supervivencia, en comparación a los que no la expresan (**Campo et al 1994**). También en el cáncer de mama se ha visto que el aumento de la expresión de cathepsin D se asocia a un pobre pronóstico (**Joensuu H et al 1995**).

---

Mulcahy HE et al 1994 encontraron que un aumento en la expresión de u-PA en el estadio B de Dukes se asocia a corta supervivencia.

Adachi Y et al 2001 vieron que los pacientes con cáncer de colon Matrilysn + tienen una significativa menor supervivencia que aquellos Matrilysn -.

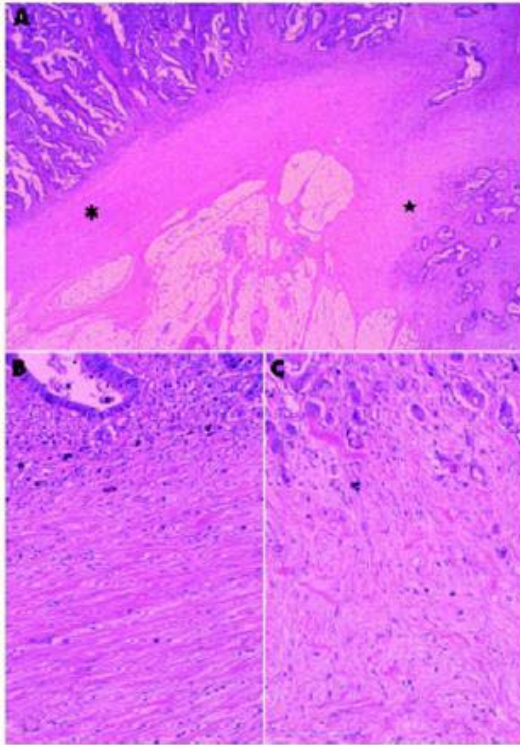
Igualmente, en este sentido coincidimos con los autores que han determinado el inmunomarcaje del colágeno IV de las membranas basales en pacientes con cáncer de colon. Entre ellos, con Havenith MG 1988, quien observó que el depósito de colágeno IV en las membranas basales se presenta como un factor pronóstico independiente; así, los estadios Cy D de Dukes con un depósito limitado presentaban una supervivencia significativamente más corta. Offerhaus 1990, determinó la expresión de colágeno IV mediante inmunohistoquímica en la interfase tumor-estroma. En el análisis univariante, perdiendo la significación en el multivariante, el depósito de colágeno IV mostraba una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia; a mayor depósito mayor supervivencia.

En un estudio reciente de Ueno H et al 2004, se realizó una categorización morfológica del componente fibrótico estromal en los adenocarcinomas de recto que penetran la muscular propia en tres categorías (maduro, intermedio, inmaduro) en función de sus características histológicas estudiaron su relación con el comportamiento y respuesta inmune del huésped. Observaron que esta categorización, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, se correlaciona con los resultados en cuanto a supervivencia de los pacientes y podría ser útil para predecir dichos resultados. La supervivencia a los 5 y 10 años eran peor en el grupo de estroma inmaduro, seguido del intermedio, siendo la mejor supervivencia para el de estroma maduro. Los valores de supervivencia específica a los cinco años eran para cada grupo 79,5%, 54,5%, 27,2%, respectivamente. Conforme progresa la maduración del estroma aumenta significativamente el número promedio de células T y disminuye el número de brotes invasivos. Influyendo significativamente ambos (Nº de brotes y categorización del estroma) en la supervivencia.

Nosotros no hemos realizado una caracterización histológica del componente estromal, pero sí un estudio morfométrico ayudados por un sistema de análisis de imagen. Y encontramos un paralelismo en nuestros resultados, en cuanto a supervivencia, con los de Ueno H et al 2004, cuando hablamos de alto “compactness” de fibrosis y componente estromal inmaduro.

**Estos resultados apoyan la hipótesis que considera a la reacción desmoplásica como barrera frenadora del avance invasivo tumoral; cuando esta reacción se desestructura (es más irregular) o presenta componentes más inmaduros, se asocia a supervivencias más cortas.**

Para confrontar nuestros resultados con los de Ueno H le hemos aplicado el método del análisis de imagen (“Threshold”) a las imágenes que aparecen en su trabajo, publicado en la revista Gut 2004, y tras calcular el “compactness” de las mismas, se corrobora el paralelismo con nuestros resultados. Pues, conforme progresa la inmadurez del estroma, aumenta el compactness del mismo; así obtuvimos un compactness de 290 para la imagen A (estroma maduro), 508 para la imagen B (estroma intermedio), 899 para la imagen C (estroma inmaduro).



Categorización histológica del componente fibrotico estromal según Ueno H et al 2004.

Imagen A: estroma maduro

Imagen B: estroma intermedio

Imagen C: estroma inmaduro.



Resultado de la aplicación del análisis de imagen (“threshold”) a las tres categorías estromales de Ueno H et al 2004.

Conforme progresa la inmadurez del estroma evidenciamos una mayor irregularidad del componente fibrotico estromal, reflejándose en el aumento progresivo del “compactness” (Fig A 290, Fig B 508, Fig C 899).





## **VI.-CONCLUSIONES**

1. La cuantificación de la angiogenesis, en las áreas “hot spot” de las diferentes zonas tumorales nos ha permitido conocer que la arquitectura vascular tumoral de los adenocarcinomas de colon, difiere de la microvasculatura del colon sano, y que dentro del mismo tumor existe diferente distribución entre zona central y la periférica, manteniéndose dichas diferencias, independientemente de cual sea el grado de diferenciación, localización, profundidad tumoral, estadio de Dukes e infiltración ganglionar.
  
2. La fibrosis tumoral o reacción desmoplásica se relaciona con la densidad vascular. Los tumores que dan lugar a una fibrosis más extensa, en cuanto a perímetro, son los que presentan los mayores recuentos vasculares en la zona centro tumoral.
  
3. Una densidad vascular en la periferia tumoral por encima de la media conlleva más riesgo de tener enfermedad metastásica a distancia, que tener dicha densidad por debajo de la media
  
4. A mayor indiferenciación tumoral, mayor capacidad para generar un mayor perímetro de fibrosis.
  
5. Los tumores con enfermedad metastásica a distancia, son los que generan un contorno más irregular en su reacción desmoplásica
  
6. El análisis de imagen ha permitido conocer y valorar parámetros morfológicos de angiogenesis y desmoplasia en los adenocarcinomas de colon con significación pronóstica. Así la irregularidad vascular en el centro del tumor y el contorno irregular de la fibrosis (determinadas morfométricamente por su “compactness”) se han mostrado como variables pronóstico independientes para la supervivencia global y libre de enfermedad. La densidad vascular, sin embargo, no presenta asociación con ningún tipo de supervivencia.



## **VII.- BIBLIOGRAFIA.**



---

Abdalla SA, Behzad F, Bsharah S et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol. Report* 1999; 6 : 839-842.

Abulafi AM, Williams NS. Local recurrence of colorectal cancer: the problem, mechanisms, management and adjuvant therapy. *Br J. Surg* 1994; 81: 7-19.

Acerio R, Polentarutti N, Bottazzi B et al. Effect of hydrocortisone on the macrophage content, growth and metastasis of transplanted murine tumors. *Int J Cancer* 1984; 33: 95.

Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, Nishi M, Endo T, Imai K. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 2001; 95(5): 290-4.

Akagi K, Ikeda Y, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K. Vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *British Journal of Cancer* 2000; 83(7): 887-891.

Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M, Abe T. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131: S 109-13.

Aguayo A, Estey E, Kantarjian H et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94 : 3717-3721.

Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulson R, Smith P, Barnes D et al. Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol* 1998; 152: 721-728.

Albini A, Barillari G, Benelli R, et al. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type I Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 : 4838-4842.

Allgayer H, Babic R, Beyer BCM, Grutzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW. Prognostic relevance of MMP-2(72 KD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncol* 1998; 55 : 152-160.

American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer, ed 2. Philadelphia: JB Lippincott, 1983.

American Joint Committee on Cancer . Colon and rectum. In: Beahrs OH, Henson DE, Hutter RV, Myers MH, eds. Manual for staging of cancer, ed 3. Philadelphia: JB Lippincott, 1988: 75.

Anand-Apte B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of Metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1997; 38: 817-823.

Arenberg DA, Strieter RM. Angiogenesis In Serhan CN, Ward PA, eds. *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*. Totowa, Humana Press 1999:29-49.

Arapandoni-Dadioti P, Giatromanolaki A, Trihia A, Harris AL, Koukourakis MI. Angiogenesis in ductal breast carcinoma. Comparison of microvessel density between primary tumour and lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999; 137: 145-150.

Armitage NC, Ballantyne KC, Evans DF, Clarke P, Sheffield J, Hardcastle JD. The influence of tumor cell DNA content of survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1990; 62: 852.

Asahara T, Bauters C, Cheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995(suppl II); 92: 365-371.

Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139: 846.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 1994; 16: 901-906.

Ausprunk DH, Folman J. The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest* 1978; 38: 284-294.

Axelsson K, Ljung B-ME, Moore Li DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 997-1006.

Azmi TI, O'Shea JD. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab Invest* 1984; 38: 284-294.

Bais C, Santomasso B, Coso O, et al. G-protein coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 1998; 391:86-89.

Ban S, Kamada K, Mitsuki N, Goto Y, Shimizu Y, Takahama M, Shibata T. Phenotypic change of muscularis mucosae in early invasive colorectal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2000 Nov; 53(11): 878-81.

Banner BF, Whitehouse R, Baker SP, Swanson RS. Tumour angiogenesis in stage II colorectal carcinoma. Association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 733-737.

Banerjee SK, Sarkar DK, Weston AP, De A, Campbell DR. Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumor may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1155-1161.

---

Barbera-Guillem, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune potentiate the process. *Cancer Res* 2002, Dec 1; 62(23): 7042-9.

Barsky SH, Gopalakrishna R. High metalloproteinase inhibitor content of human cirrhosis and its possible conference of metástasis resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 102.

Barsky SH and Gopalakrishna R. Increased invasión and spontaneous metástasis of BL6 melanoma with inhibition of the desmoplastic response in C57BL6mice. *Cancer Res* 1987; 47: 1663-1667.

Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altmen J, Deuel TF. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4132.

Beiz JG, KIm I, Frackelton AR Jr. Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci .USA* 1991; 88: 2021-2025.

Belien JAM, Somi S, De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cáncer. *J Clin Pathol* 1999; 52: 184-192.

Belotti D, Vergani V, Drudis T, et al. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1843-1849.

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 VEF. *Development* 1998; 125: 1591-1598.

Berger G, Hanahan D, Coussens LM. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 995-1002.

Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9(92 Kda genatinase/collagenase )to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4293-4297.

Bielefeldt-Ohmann H, Jarnick AG, Fitzpatrick DR. Molecular pathobiology and immunology of malignant mesothelioma. Review article. *J Pathol* 1996; 178: 369-378.

Bingham SA. Diet and colorrectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans* 2000 Feb; 28 (2): 12-6.



Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union. cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1075-1107.

Black MM, Zachrau RE, Hankey BF, Wesley M. Skin Window reactivity to autologous breast cancer. An index of prognostically significant cell-mediated immunity. *Cancer* 1988; 62: 72.

Bognel C, Rekacewics C, Mankarios H, et al. Prognostic value of neural invasion in rectal carcinoma: a multivariate analysis on 339 patients with curative resection. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 894.

Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer* 1996; 69(1): 47-9.

Bosari S, Lee A k, De Lellis RA, Wiley BD, Heatley G J and Silverman M L. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761.

Bradley BA, Evers BM. Molecular advances in the etiology and treatment of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1997; 6(3): 143-146.

Broders AC. The grading of carcinoma. *Minn Med* 1925; 8: 726.

Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Woltzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer* 1997; 71: 612-619.

Bronzert DA, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, Lippman ME. Synthesis and secretion of platelet derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5763-5767.

Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Anti-integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; 96: 1815-1822.

Brown LF, Van de Water L, Harvey VS, Dvorak HF. Fibrinogen influx and accumulation of crosslinked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. *Am J Pathol* 1998. Mar; 130(3): 455-65.

Brown Lf, Guidi AJ, Tognazzi K, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and vascular stroma formation in neoplasia: insights from in situ hybridization studies. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 569-575.

---

Bruce WR, Wolever TMS, Giacca A. Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer* 2000; 37: 19-26.

Brustmann H, Riss P, Naude S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary: a Quantitative histologic study. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 20-26.

Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM, Mammalian. DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 533-64.

Burian M, Quint C, Neuchrist C. Angiogenic factors in laryngeal carcinomas: Do they have prognostic relevance?. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 289-292.

Burtin P, Chavanel G, Foidart JM et al. Alterations of the basement membrane and connective tissue in human metastatic lymph nodes. *Int J Cancer* 1983; 31: 719-726.

Burtin P, Chavanel G, Foidart JM et al. Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: An immunofluorescence study. *Int J Cancer* 1982; 30: 13-20.

Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessels formation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 251-256.

Byrne K.J.O, Dalglish A.G, Browning MJ, Steward W.P, Harris A.L. The relationship between angiogenesis and immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *European Journal of Cancer*.2000; 36: 151-169.

Cagir B, Nagy MW, Topham A, Rakimic J, Fry RD. Adenosquamous carcinoma of the colon, rectum, and anus: epidemiology, distribution, and survival characteristics. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 258-263.

Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF et al. Cathepsin B expression in colo-rectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 1994; 145: 301-309.

Cawthorn SJ, Parums DV, Gibbs NM, A'Hern RP, Caffarey SM, Broughton CIM, Marks CG. Extent of mesorectal spread and involvement of lateral resection margin as prognostic factors after surgery for rectal cancer. *Lancet* 1990; 335: 1055-1059.

Cedemark B. For the Stockholm Colorectal Cancer Study Group. The Stockholm II trial on preoperative short term radiotherapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomised trial. *Proc. ASCO* 1994; p 198.

Chalkey H. Method for the quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943; 3: 47-53.

Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 1985; 72: 698.

Chapuis P, Bokey L, Fahrer M, Sinclair G, Comm M, Bogduk N. Mobilization of the rectum. Anatomic concepts and the bookshelf revisited. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1-9.

Charpin C, Devictor B, Bergeret D, et al. CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas-correlation with current prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 443-448.

Chau I, Cunningham D. Adjuvant chemotherapy in colon cancer:state of the art. *Educational Book Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 228-39.

Chiarotto JA. A quantitative analysis of the regulation in oxygen levels required to induce-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)mRNA in cervical cancer cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80: 1518-24.

Chin K, Kurashima Y, Ogura T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular cell lines. *Oncogene* 1997; 15: 437-442.

Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J. Angiogenic activity as a marker of neoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* 1980; 192: 762-71.

Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998; 55: 575-581.

Chomette G, Auril M, Tranbaloc P et al. Intraepithelial neoplasm of the uterine cervix and angiogenesis: morphologic study. *Arch Anat Cytol Pathol* 1989; 37: 73-79.

Chung DC. Molecular prognostic. Markers and colorectal cancer: the search goes on. *Gastroenterology* 1998; 114:330-1332

Clarke R, Dickson RB, Lippman ME. Hormonal aspects of breast cancer. Growth factors, drugs and stromal interactions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1992; 12: 1-23.

Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA. Angiogenesis: models and modulators. *Int Rev Cytol* 1995; 159: 113-160.

Colpaert C, Vermeulen P, Van Beest P, et al. Intratumoural hypoxia resulting in the presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early distant relapse in lymph-node negative breast cancer patients. *Histopathology* 2001; 39: 416-426.

---

Colpaert C, Vermeulen P, Jeuris W, et al. Early distant relapse in “node negative” breast cancer patients is not predicted by occult axillary lymph node metastases, but by the features of the primary tumour. *J Pathol* 2001; 193: 442-449.

Codman DR, Sheldon WF. The significance of hypermia around tumor implants. *Am J Pathol* 1946; 22: 821.

Cornelius LA. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J.Immunol* 1998; 161: 6845-6852.

Correa P, Haenszel W. The epidemiology of large-bowel cancer. *Adv Cancer Res* 1978; 26: 1-141.

Cox G, O’Byrne KJ. Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res* 2001, Nov-Dec; 21(6B): 4207-19.

Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metástasis* 1994-n95; 14: 234.

Cumming JH, Bingham SA. Diet and the prevention of cancer. *Br Med J* 1998; 317: 1636-1640.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.

Daneker GW, Mercurio AM, Guerra L, Wolf B, Salem RR, Bagli DJ, Steele GD. Laminin Expression in Colorectal Carcinomas Varyng in Degree of Differentiation. *Arch Surg* 1987.122: 1470-1474.

David G and Bernfield M.. Type-I collagen reduces the degradation of basal lamina proteoglycan by mammary epithelial cells. *J Cells Biol.* 1981; 91: 281-286.

Davies MM, Jonas SK, Kaur S et al. Plasma vascular endothelial but not fibroblast growth factor levels correlate with colorectal liver metastasis vascularity and volume. *Br J Cáncer* 2000; 82: 1004-1008.

De Quay N, Cerottini JP, Albe X, Saraga E, Givel JC, Caplin S. Prognosis in Dukes’ B Colorectal Carcinoma: The Jass Classification Revisited. *Eur J Surg* 1999; 165: 589-592.

De Clerk YA, Yean TD, Chan D, Shimada H, Langley KE. Inhibition of tumor cell invasion of smooth muscle cell layer by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 1991; 51: 2151.

De Mello J, Struthers L, Turner R, Cooper EH, Giles GR. Multivariate analysis as aides to diagnosis and assessment of prognosis in gastrointestinal cancer : Br J Cancer 1983; 48: 341.

Deans GT, Williamson K, Heatley M, et al. The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum. Surg Gynecol Obstet 1994; 177: 377.

Deans GT, Patterson CC, Parks TG, et al. Colorectal carcinoma: importance of clinical and pathological factors in survival. Ann R Coll Surg Engl 1994; 76: 59-64.

Dermir R, Kaufmann P, Castlucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasulogenesis and angiogenesis in human placental villi. Acta Anat 1989;136:190-203.

Diaz Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. Histol Histopath 1991; 6: 269-286.

Diaz Flores L, Gutierrez R, Varela H. Angiogenesis: an update. Histol Histopath 1994; 9(4): 807-843.

Diaz Flores L, Gutierrez R, Varela H. Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. J Morphol 1992; 213(1): 33-45.

Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GNA, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. Br J Urol 1994; 74: 762-766.

Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, et al: Serum Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. Ann Oncol 1996; 7: 843-848.

Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A et al: Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. Br J Cancer 1997; 76: 238-243.

Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael L, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. Br J Cancer 1997; 76: 1410-1415.

Dukes CE. The classification of cancer of the rectum .J Pathol 1932; 35: 323.

Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. Br J Cancer 1958;12: 309.

Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. J Clin Pathol 1949; 2: 95.

---

Dukes CE. Cancer of the rectum:an analysis of 1000 cases. *J Pathol Bacteriol* 1940; 50: 527.

Dvorak HF. Tumours: wounds that do not heal. Similarities between tumour stroma generation and healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-1659.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1034.

Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, et al. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of the tumor stroma formation. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 667: 110-111.

Dvorak HF, Dickersin GR, Dvorak AM, Manseau EJ, Pyne K. Human breast carcinoma: fibrin deposits and desmoplasia. I nflammatory cell type and distribution. *Microvasculature and infarction. J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 335-345.

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: 1388-1398.

El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562.

Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alpha v integrins during angiogenesis. *Mod Mode* 1998; 4: 741-750.

Ellis MJC, Singer C, Hornby A, Rasmussen A, Cullen KJ. Insulin-like growth factor mediated stromal-epithelial interactions in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31: 249-261.

Elton CW, Ellis IO. Pathology and breast screenig. *Histopathology* 1990;16: 109-18.

Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, Malley PO. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes Staging. *Am J Surg Pathol* 1996; 20(10): 1260-1265.

Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppi JM, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independent define high and low-risk subsets of node negative cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3129-3136.

Erler BS, Chein K, Marchevsky AM. Methods in pathology: An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Modern Pathology* 1993; 6: 612-618.

Fahy B, Bold RJ. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1998; 7(3-4): 115-23.

Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 241.

Fajardo LF, Kwan HH, Kosalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 1992;140: 539-544.

Fearon EA, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *CELL* 1990; 61: 759-767.

Fenjvesi. A. Prognostic significance of tumor induced angiogenesis in colorectal carcinoma. *Med Pregl* 2003; 56(5-6): 263-8.

Ferrara N, Winer J, Burton T et al. Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cell. *J Clin Invest* 1993; 91: 160-70.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, et al: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18-32.

Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106(4): 148-56.

Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197: 893-895.

Fielding LP, Phillips RKS, Fry JS, Hittinger R. Prediction of outcome after curative resection for large bowel cancer. *Lancet* 1986; 2: 904

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417.

Fisher ER, Siderits RH, Sass R, Fisher B. Value of assessment of ploidy in rectal cancers. *Archives Pathol Lab Med* 1991; 113: 525.

Fisher H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* 2001; 22(6): 875-878.

---

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 Cáncer Inst* 1990; 82: 4-6.

Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis?. *Lab Invest* 1984; 51: 601-602.

Folkman J, Watson K, Ingber D and Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition of hyperplasia to neoplasia. *Nature (Lond.)*1989; 339: 58-61.

Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9064-9066.

Folkman J. Antiangiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 345-362.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.

Folkman J. Tumor angiogenesis:therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.

Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?. *Cáncer Res* 1986; 46: 467-475.

Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med* 1996; 2: 167-168.

Folkman J. Angiogenesis.In: Verstraete M, Vermylen J, Lijnan R, Arnout L, eds. *Thrombosis and haemostasis*. Leuven University Press,1987: 583-96.

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.

Folkman J, Tyler K. Tumor angiogenesis: its possible role in metástasis and invasion. IN: Day SB, Myers WPL, Stansly P, Geratti S, Lewis MG, eds. *Cancer invasión and metastasis: biologic mechanisms and therapy*. New York: Raven Press, 1977: 95

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv.Cancer Res* 1985; 43: 175-203.

Folkman J. Angiogenesis in cáncer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1: 27-31.

Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cáncer Inst* 2000; 92: 94-95.

Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974; 34: 2109.



Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288: 551-556.

Fornasarig M, Viel A, Valentini M, Capozzi E, Sigon R, De-PaOli A, et al. Microsatellite instability and MLH1 and MSH2 germline defects are related to clinico-pathological features in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2000; 7(1): 39-43.

Forster SJ, Talbot IC, Critchley DR. Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumour grade, stage and metastasis. *Br J Cancer* 1984; 50: 51-60.

Foster SJ, Talbot IC, Claytin DG, et al. Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of the rectum: An immunohistochemical study of biologic and clinical significance. *Int J Cancer* 1986; 37: 813-817

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.

Fox SB, Turner GDH, Leek RD, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 219-226.

Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4161-4163.

Fox SB, Moghaddam A, Westwood M et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: Immunohistochemical study. *J Pathol* 1995; 176: 183-190.

Fox SH, Whalen GF, Sanders MM, et al. Angiogenesis in normal tissue adjacent to colon cancer. *J Surg Oncol* 1998; 69: 230-234.

Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 6: 695-699.

Friesel RE, Macigag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: Fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 1995; 9: 919-925.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 124: 619-626.

---

Fuhrmann-Benzaken E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, et al. Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 85: 40-45.

Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T, et al: Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 386-392.

Gabbert H, Wagner R, Moll R and Gerharz CD. Tumour dedifferentiation: an important step in tumour invasion. *Clin exp Metast* 1985; 3: 257-279.

Gabriel WB, Dukes C, Bussey HJR. Lymphatic spread in cancer of the rectum. *Br J Surg* 1935; 23: 395.

Gagliardi AR, Henning B, Collins DC. Antiestrogen inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors. *Anticancer Res* 1996; 16: 1101-1106.

Gallin WJ, Chuong CM, Finkel LH, Edelman GM. Antibodies to liver cell adhesion molecule perturb inductive interactions and alter feather pattern and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8235-8339.

Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Garbisa S et al. Tissue and serum metalloproteinase (MMP-2) expression and advanced ovarian serous cystadenocarcinomas: clinical and prognostic implications. *Anticancer Res* 1995;15: 2799-2804.

Gasparini G, Toi M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 139-147.

Gasparini G, Fox SB, Verderio P, et 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.

Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999; 58: 17-38.

Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, Testolin A, and Bevilacqua P. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 739-744.

Gatenby RA, and Taylor DD. Suppression of wound healing in tumor-bearing animals as a model for tumour-host interaction: mechanism of suppression. *Cancer Res* 1990; 50: 7997-8001.

Gerard A, Buyse M, Nordlinger B. Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomised study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg* 1988; 208: 606-614.

Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 179: 80-88.

Giatromanolaki A, Stathopoulos G, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter K, Harris A, Koukourakis M. Combined Role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 15(86): 1421-1429.

Gilbert SG. Symptomatic local tumor failure following abdominal-perineal resection. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1978; 4: 801.

Gimbrone M, Cotran R, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 413

Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y et al. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999;11: 29-37.

Goldacre RJ and Sylven B. On the access of bloodborne dyes to various tumour regions. *Br J Cancer* 1962; 16: 306-322.

Goldmann E. The growth of malignant disease in man and the lower animals, with special reference to the vascular system. *Proc.R.Soc.Med.Surgical Sec* 1908;1,1-13.

Gonzalez Baron M. Importancia de los factores pronóstico en Oncología. Vision general. En :Gonzalez Baron M, Ed. Factores pronóstico en Oncología.1-21. Interamerica ,Mc Graw Hill, 1994; Madrid.

González Palacios F, Sancho M, Martínez JC, Bellas C. Microvessel density, p53 overexpression and apoptosis in invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1997; 50: 304-309.

Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigere L. Fibroblast growth factor: Structure and biological properties. *J Cell Physiol Suppl* 1987; 5: 15-26.

Gottesman M. Role of proteases in cancer. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 97-160.

Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfiltered diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 111

Greene HSN. Heterologous transplantation of mammalian tumors. *J Exp Med* 1961; 73: 461.

Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R et al. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 570-572.

---

Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21(5): 233-300.

Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B et al . Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J.Natl Cáncer Inst* 1995; 87: 1235-45.

Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cáncer Inst* 1994; 86: 614-619.

Gunderson LL, Sosin H. Areas of failure found at reoperation(second or symptomatic look) following "curative surgery" for adenocarcinoma of the rectum: clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer* 1974; 34: 1278.

Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol.Chem.*1998; 273: 3604-3610.

Halvorsen OJ, Haukaas S, Hoisaeter PA, Akslen LA. Independent prognostic importance of microvessel density in clinically localised prostate cancer. *Anti Cáncer Res* 2000; 20 : 3791-3799.

Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.

Hanahan D, Christofori G, Naik P and Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cáncer* 1996; 32A : 2386-2393.

Hanauske AR. The development of new chemotherapeutic agents. *Anticancer Drugs* 1996; 7:29-32.

Harmer MH ed. TNM classification of malignant tumours. Geneva: International Union Against Cancer, 1978: 69.

Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002; 86 (10): 1566-77.

Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cáncer Res* 2000; 6: 139-146.

Hasebe T, Tsuda H, Hirohashi S, et al. Fibrotic focus in invasive ductal carcinoma: an indicator of high tumor aggressiveness. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 385-394.

Hauptmann S, Siegert A, Berger S, Denkert C, Kobel M, Ott S, Siri A, Borsi L. Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblast-tumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. *Eur J Cell Biol* 2003 Jan; 82(1): 1-8.

Hauptmann S, Budianto D, Denkert C, Kobel M, Borsi L, Siri A. Adhesion and migration of HRT-18 colorectal carcinoma cells on extracellular matrix components typical for the desmoplastic stroma of colorectal adenocarcinomas. *Oncology*.2003; 65(2): 174-81.

Havenith MG, Arends JW, Simon R, Volovics A, Wiggers T, Bosman FT. Type IV collagen immunoreactivity in colorectal cancer: prognostic value of basement membrane deposition. *Cancer* 1988; 62: 2207.

Heiss MM, Mempel W, Delanoff C, Jauch KW, Gabka C, Mempel M, Detrich HJ, Eissner HJ, Schildberg FW. Blood transfusion modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous versus allogenic blood transfusion in colorectal cancer surgery. *J.Clin Oncol* 1994; 12: 1859-1867.

Hermanek P. Evolution and pathology of rectal cancer. *World J Surg* 1982; 6: 502.

Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P, Langzeitergebnisse der chirurgischen therapie des coloncarcinoms. *Chirurg* 1994; 65: 287-97.

Hermanek P, Sobin LH(1992). TNM Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer. Fourth Edition, 2<sup>nd</sup> Revision, 45-46, Springer Verlag, Berlin.

Hernanz FR, Redondo C. Colorectal adenocarcinoma quality of the assessment of lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 373.

Herrera L, Villareal JR. Incidence of metastases from rectal adenocarcinoma in small lymph nodes detected by a clearing technique. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 783.

Hewitt RE, Powe DG, Carter GI, Turner DR. Desmoplasia and its relevance to colorectal tumour invasion. *Int J Cancer* 1993; 53, 62-69.

Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clark IM, Cawston TE and Turner DR. Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 1991 a. 49; 666-672.

---

Hewitt RE, Powe DG, Griffin NR, Turner DR. Relationships between epithelial basement membrane staining patterns in primary colorectal carcinomas and the extent of tumour spread. *Int J. Cáncer* 1991; 48: 855-860.

Hewitt RE, Keeble W, Powe DG, Williamson RJ, Turner DR. The influence of local tissue environment on epithelial basement membrane continuity in colorectal carcinomas. *Int J Cáncer* 1994; 56 (5): 675-80.

Himmelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasión Metástasis* 1995;14:246.

Hirai Y, Nose A, Kobayashi S, Takeichi M. Expression and role of E-and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. *Development* 1989; 105: 271-277.

Hirai Y, Takebe K, Takashina M, Kobayashi S, Takeichi M. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 1992; 69: 471-481.

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-377.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1996; 2: 689-692.

Horak ER, Russell Leek, Klent N, Lejeune S, Kenneth Smith, Stuart N, Greenall M, Stpeniewska K, Harris Al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.

Horgan K, Jones DL, Mansel RE. Mitogenicity of human fibroblasts in vivo for human breast cancer cells. *Br J Surg* 1987; 74: 227-229.

Hori A, Sasada R, Matsutani E et al. Suppression of solid tumor growth by immuno-neutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer* 1991; 51: 6180-6184.

Hsu DW, Efird JT, Hedley-White ET. Prognostic role of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* 1995; 147: 114-123.

Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial (in process citation ). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 647-652.

Imoto H, Osaki T, Taga S et al: Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 1007-1114.

Inoue T, Mori M, Shimono R et al: Vascular invasión of colorectal carcinoma readily visible with certain stains. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 34.

Ishigami SI, Arii S, Furutani M et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor(VEGF) in metástasis and prognosis of human colorectal cáncer. *Br J Cáncer* 1998; 78: 1379-1384.

Jackson JR, Orr JW. The ducts of carcinomatous breast with particular reference to connective tissue changes. *J Pathol Bacteriol* 1957; 74: 265-273.

Jass JR, Aktin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437-459.

Jass JR, Do KA, Simms LA, Lino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford SG, Young J, Leggett B. Morphology of sporadic colorectal cáncer with DNA replication errors. *Gut* 1986; 42: 673-679.

Jen JK, Piantadosi S. Allelic loss of chromosome 18Q and prognosis in colorectal cáncer. *N Engl J Med* 1994; 331-213.

Jensen HM. Angiogenesis induced by normal human breast tissue. In: Rifkin DB, Klagsbrun M, eds. *Angiogenesis-mechanisms and pathology. Current communications in molecular biology.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1987: 155-7.

Jitsuiki Y, Hasebe T, Tsuda H et al. Optimizing microvessel counts according to tumor zone in invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1999; 12: 492-498.

Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cáncer. *Br J Cancer* 1995; 71 : 155-159.

Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cáncer cells. *Cáncer Res* 1993; 53: 873.

Jones PH, Harris AL. The current status of clinical trials in antiangiogenesis. *PPO update on Principles and Practice of Oncology* 2000; 14: 1-7.

Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, et al. Serum C-peptide, insulin-like growth factor(IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1592-1600.

Takeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New drugs* 1997; 15: 198-48.

---

Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakima Y, Nishitani M, Kagawa S. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 1997; 82: 1359-1366.

Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991; 66: 1095-1104.

Karakiulakis G, Papanikolaou C, Jankovic SM, Aletras A, Papakonstantinou E, Vretou E et al. Increased type IV collagen-degrading activity in metastases originating from primary tumors of the human colon. *Invasion Metástasis* 1997; 17: 158-168.

Kawashima A, Okada Y, Nakanishi I, Ueda Y, Iwata K, Roessner A. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human chondrosarcomas. *Gen Diagn Pathol* 1997; 142: 129-137.

Kaye GI, Lane N, Pascal RR. Colonic pericytal fibroblast sheath: replication, migration and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue.II. Fine structural aspect of normal rabbit and human colon. *Gastroenterology* 1968; 54: 852-65.

Kelly PM, Davison RS, Bliss E, McGee JO. Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cáncer* 1988; 57: 174.

Key ME, Hoyer L, Bucana C, Hanna MG. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 1982; 146: 265.

Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969.

Kim TS, Kim YB. Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinomas. *J Korean Med Sci* 1999; 14: 263-270.

Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-844.

Kim WH, Lee HW, Park SH, Kim YL, Chi JG. Microsatellite instability in young patients with colorectal cancer. *Pathol Int* 1998; 48(8): 586-94.

Kirklin JW, Dockerty MB, Waugh JM. The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. *Surg Gynecol Obstet* 1949; 88: 326.

Kitadai Y, Ellis LM, Tucker SL, et al. Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 149: 1541-1551.



Koehlberg PD, Obermair A, Sliutx G, Heinzl H, Koelbl H, Breitenacker G, Gitsch G, Kainz C. Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 705-710.

Kos J, Mikolas V, Lane V. Das bild des terminalen blutgefäßnetzes auf der karzinomatosen cervix uteri. *Zentralbl Gynaekol.* 1960; 39: 1487-93.

Kotagi HF, Shibata Y. The size of regional lymph nodes does not correlate with the presence or absence of metastasis in lymph nodes in rectal cancer. *J Surg Oncol* 1993; 54: 252.

Krasna MJ, Flanobaum L, Cody RP, Schneibaum S, Ari GB. Vascular and neural invasion in colorectal cancer. *Cancer* 1988; 61: 1018.

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 709.

Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, et al. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol* 1998; 12: 749-757.

Kumar H, Heer K, Lee PW, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1279-1285.

Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4606-4610.

Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter CK, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol* 1992; 45: 143.

Lagacé R, Grimaud JA, Shurch, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch* 1985; 408: 49-59.

Lamelas ML. Expresion y significacion clinica de la colagenasa-3 en los carcinomas mamarios. (Tesis doctoral). Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo, 1998.

Landriscina M, Cassano A, Ratto C, et al. Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 765-770.

Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 417-422.

---

Levi F, Pasche C, Lucchini F, Tavani A, La Vecchia C. Occupational and leisure-time physical activity and the risk of colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8: 487-493.

Linder J. Automation in cytopathology. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 47-51.

Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K et al. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3121-3128.

Linderholm B, Tavelin K, Grankvist R, 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.

Lindmark G, Gerdin B. Prognostic predictors in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1219.

Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C et al. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 461-466.

Liotta LA, Stracke ML. Tumor invasion and metastases: Biochemical mechanisms. *Cancer Treat Res* 1998; 40: 223-238.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51(Suppl): 5054s

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an Imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976; 36: 889.

Liotta LA, Terranova VP, Lanzer WL, Russo R, Seigel GP, Garbisa S. Basement membrane attachment and degradation by metastatic tumor cells. In: Kuehn K, Schoene H, Timpl R eds. *New Trends in Basement membrane Research*. New York: Raven, 1982; 277-286.

Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 1982; 1: 277.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessel, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; 34: 997-1004.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 107.

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49 : 636-649.

Liu Z, Tomotake H, Wan G, Watanabe H, Kato N. Combined effect of dietary calcium and iron on colonic aberrant crypt foci, cell proliferation and apoptosis, and fecal bile in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Oncol Rep* 2001 Jul-Aug; 8(4): 893-7.

Loeb L. Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 25-56

Loognecker MP, Tseng M. Alcohol and cáncer. In Heber D, Blackburn GL, Go VLW, eds. *Nutritional Oncology*. San Diego, Academic Press, 1999, 277-298.

Lu C and Tanigawa. Spontaneous apoptosis is inversely related to intramural microvessel density in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 221-224.

Mac Cawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000; 6: 149-156.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, and Angeletti C CA. Relation of neovascularization to metástasis of non-small cell lung cáncer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.

Maddalozzo J. High angiogenic activity in cells isolated from cystic hygroma: role of bFGF. *Arch Otolaryngol Head Neck surg* 1999; 125 (1): 45-8.

Madri JA, Stenn KS. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 1982; 106: 180-186.

Magnusson I, Falkmer UG, Nilsson R. Multiple primary colorectal adenocarcinomas : cytometric DNA ploidy patterns and histopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 810.

Marchievsky AM, Gil J, Jeanty H, et al. Computerized interactive morphometry in pathology: Current instrumentation and methods. *Hum Pathol* 1987; 18: 320-31.

Marinho A, Soares R, Ferro J, Lacerda M, Schmitt FC. Angiogenesis in breast cáncer is related to age but not to other prognostic parameters. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 267-273.

Martin L, Holcombe C, Renshaw C, et al. Standardising the methodology of vessel density in breast cáncer using immunohistochemistry and tumor microangiography. *The Breast* 1995; 4: 227-257.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-125.

---

Matsumura M, Chiba Y, Lu C, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression correlates with tumor angiogenesis and macrophage infiltration in colorectal cancer. *Cancer Lett* 1998; 128: 55-63.

Mazzanti R, Messerini L, Monsacchi L et al. Chronic viral hepatitis induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology* 1997; 25: 229-234.

Mc Leod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 191-203.

McCulloch P, Choy A, Martin L. Association between tumour angiogenesis and tumor cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. *Lancet* 1995, 346: 1334-1335.

McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metástasis* 1999; 17: 341-349.

McGuire TM, Shering SG, Duggan CM, McDermott EW, Higgins NJO, Duffy MJ. High level of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Biol Markers* 1998; 13: 139-144.

Merino JJ, Cordero MI. Apoptosis: Implicaciones funcionales de la proteína p53 en el proceso de muerte celular programada. *Bio* 1998; 3-4(14): 12-4.

Midgley R, Kerr D. Colorectal Cancer. *Lancet* 1999, 355:391-399.

Milas L, Hirata H, Hunter N, et al. Effect of radiation-induced injury of tumor bed stroma on metastatic spread of murine sarcomas and carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48: 2116-20.

Millauer R, Wizigmann-Voss S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-846.

Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. I. Patterns of failure and survival. *Cancer* 1988; 61: 1408.

Minsky BD, Rich T, Recth A, Harvey W, Mies C. Selection criteria for local excision with or without adjuvant radiation therapy for rectal cancer. *Cancer* 1989; 63: 1421.

Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Potentially curative surgery of colon cancer I. Patterns of failure and survival. *J: Clin Oncol* 1988; 6: 106.

Minsky BD. Clinicopathologic impact of colloid in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 714.

Miura S, Kodaira S, Hosoda Y. Immunohistologic analysis of the extracellular matrix components of the fibrous stroma of human colon carcinoma. *J Surg Oncol* 1993; 53: 36-42.

Miyazono K, Okabe T, Urabe A et al. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem* 1987; 262: 4098-4103.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med.* 1990; 322: 352-358.

Moertel CG, Fleming TR, McDonald JS. Intergroup Study of fluoracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes B2 colon cancer. *J. Clin. Oncol* 1995; 13: 2936-2843.

Momen MA, Monden Y, Houchi H, Umemoto A. Effect of ursodeoxycholic acid on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon: in vitro potential of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *J Med Invest* 2002 Feb; 49(1-2): 67-73.

Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A et al. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4341-4344.

Morikawa K, Walker SM, Nakajima M et al. Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1988; 48: 6863.

Moscatelli D, Gross JL, Rifkin DB. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1981; 91: 201.

Moscatelli D, Rifkin DB. Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948: 67.

Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1372.

Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP et al. Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer. *Lancet* 1994; 344: 583-584.

---

Murray GI, Dunkan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 1998; 185: 256-261.

Murray GI, Dunkan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nature Med* 1996; 2: 461-462.

Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Van de Water L, Dvorak AM, Dvorak HF. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989, Feb; 948 (3): 305-26.

Naito Y, Kino I. Promoting effects of gastric cancer cells on collagen synthesis of fibroblasts in vitro. *Tissue Cult. Res. Commun* 1982; 1: 16-17.

Nakada I, Tasaki T, Ubukata H, Goto Y, Sato S, Tabuchi T, Tsuchiya A, Soma T. Desmoplastic response in biopsy specimens of early colorectal carcinoma is predictive of deep submucosal invasion. *Dis Colon Rectum* 1998; 41 (7): 896-900.

Nakamura J, Savinov A, Lu Q, Brodie A. Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. *Endocrinology* 1996; 137: 5589-5596.

Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Naruse K, Kiyoku H, Hiroi M. The role of Myofibroblast at the tumor border of invasive colorectal adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology JJCO*. 1998; 28(10): 615-620.

Nathanson SD, Schultz L, Tilley B, Kambouris A. Carcinoma of the colon and rectum: a comparison of staging classifications. *Am Surg* 1986; 52: 428.

Nehls V, Denzer K, Drenckhahn. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* 1992; 270: 469-474.

Newland RC, Chapuis PH, Smyth Ej. The prognostic value of substaging colorectal carcinoma: prognostic study of 1117 cases with standardized pathology. *Cancer* 1987; 60: 852.

Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, et al. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 356-361.

Nicolson GL. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane, and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1: 1009.

Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brunner N, Moesgaard F. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol* 1999; 487-495.

Nishimura R, Hasebe T, Tsubono Y, Ono M, Sugitoh M, Arai T, Mukai K. The fibrotic focus in advanced colorectal carcinoma: a hitherto unrecognized histological predictor for liver metastasis. *Virchows Arch* 1998; 433: 517-522.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.

O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *European Journal of Cancer* 2000; 36: 151-169.

Oberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1998 ; 41: 1244-1249.

Offerhaus GJ, Giardiello FM, Bruijn JA, Stijnen T, Molyvas EN, Fleuren GJ. The value of immunohistochemistry for collagen IV expression in colorectal carcinomas. *Cancer* 1991; 67: 99.

Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*.2001; 44: 1129-1136.

Ohtani H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int* 1998; 48(1): 1-9.

Ohtani H, and Sasano N. Stromal cell changes in human colorectal adenomas and carcinomas. An ultrastructural study of fibroblasts and smooth muscle cells. *Virchows Arch. A Pathol. Anat . Histopathol* 1983; 401: 209-222.

Olivarez D, Ulbright T, DeRiese W, Foster R, Reister T, Einhorn L, and Sledge G. Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994; 54: 2800-2802.

---

O'Reilly MS. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.

Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL and Bugge TH. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000 Nov; 96(10): 3302-09.

Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Research* 2002; 62: 6966-6972.

Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJC. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997; 84: 160-166.

Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter CK, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752.

Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvascular Res* 1996; 51: 260-72.

Patt DJ, Brynes RK, Vardiman JW. Mesocolic lymph node histology an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: an immunomorphologic study. *Cancer* 1975; 35: 1388.

Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MM-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997; 272: 28823-28825.

Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH et al. Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor and type I plasminogen activator inhibitors in aqueous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res* 1994; 54: 4671-4675.

Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mekklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Peterson GM, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 810-812.

Pezzella F, Di Bacco A, Andreola S, Nicholson AG, Pastorino U, Harris AL. Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2494-2500.

Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1417-1423.



Pham CD, Roberts TP, Van Bruggen N, et al. Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cáncer Invest* 1998; 16: 225-230.

Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP. Large bowel cáncer: surgical pathology and its relationship to survival. *Br J Surg* 1984; 71: 604.

Piccinni M-P, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukaemia inhibitory factor and type-2 T-Helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998; 4: 1020-1024.

Pietrojusti A, Guliano M, Vita S. Faecal pH and cancer of the large bowel. *Gastroenterology* 1983; 84: 1273.

Poon R T-G, Fan S-T, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cáncer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-1225.

Porschen R, Classen S, Piontek M and Borchard F. Vascularization of carcinomas of the esophagus and its correlation with tumour proliferation. *Cancer Res* 1994; 54: 587-591.

Porter GA, Soskoline CL, Yakimets WW, Newman SC. Surgeon-related factors and outcomes in rectal cáncer. *Ann Surg* 1998; 227: 157-67.

Porter GA, Soskoline CL, Yakimets WW, Newman SC. Surgeon-related factors and outcomes in rectal cáncer. *Ann Surg* 1998; 227: 157-67.

Potter JD. Colorectal cáncer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 916-932.

Prall F, Gringmuth U, Nizze H, Barten M. Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival. *Histopathology* 2003; 42: 482-491.

Pritchard AJ, Chatterjee T, Wilkinson M, Powe DG, Gray T and Hewitt RE. Evidence for a Weak angiogenic response to human colorectal cancers. *Br. J. Cáncer* 1995; 71: 1081-1086.

Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 121-126.

Qizilbash AH. Pathologic studies in colorectal cancer: a guide to the surgical pathology examination of colorectal specimens and review of features of prognostic significance. *Pathol Annu* 1982; 17: 1.

---

Quirke P, Dixon MT, Durdey P, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. *Lancet* 1986; 1: 996-8.

Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4575-4580.

Raleigh JA. Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res* 1998; 1;58(17): 3765-8.

Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, Hamilton SR. Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut* 1999; 44 826-833.

Ratto C, Luigi Sofo MD, Ippoliti MD, Merico MD, Doglietto MD, Crucitti MD. Prognostic Factors in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1033-1049.

Ratto C, Soto L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vecchio FM, Doglietto GB, Crucitti F. Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 143-154.

Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, et al. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 1998(Nov); 34(6): 543-8.

Read TE, Myerson RJ, Fleshman JW, Fry RD, Birnbaum EH, Walz BJ, et al. Surgeon specialty is associated with outcome in rectal cancer treatment. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 904-14.

Recio P, Bussey HJR. The pathology and prognosis of carcinoma of the rectum in the young. *Proc R Soc Lond* 1965;5 8: 789.

Reñe AM, et al. IBAS 2000, equipo computerizado para proceso y analisis de imagen. *Clinica e Investigacion en Ginecologia y Obstetricia* 1997; 14:102-103.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review 1973-1997. Bethesda,MD, USA, National Cancer Institute, 2000.

Risau W, Drexler H, Mironov V et al. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 1992; 7: 261-266.

Robinson MH, Kronborg O, Williams CB, et al. Faecal occult blood testing and colonoscopy in the surveillance of subjects at high risk of colorectal neoplasia. *Br J Surg* 1995; 82: 318-20.

Rofstad EK. Growth and vascular structure of human melanoma xenografts. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17: 91-101.

Ronnie Tung-Ping Poon, Sheung-Tat Fan, John Wong. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2001; Vol 19, No 4(February 15): pp 1207-1225.

Ronnov-Jessin L, Petersen OW. Induction of Alfa -smooth muscle actin by transforming growth factor -B1, in quiescent human breast gland fibroblast. *Lab Invest* 1993; 68: 696-707.

Ruiter DJ, Schlingemann RO, Rietveld FJR, de Waal RMW. Monoclonal antibody-defined human endothelial antigens as vascular markers. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 25s-32s.

Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-926.

Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am.*1997; 77: 253-260.

Saito H, Tsujitani S, Kondo A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery* 1999; 125: 195-201.

Saito S, Tsuno N, Nagawa H et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 42-44.

Sakakura T. New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int Rev Cytol* 1991; 125: 165-202.

Salven P, Maenpaa H, Orpana A, et al. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 647-651.

Sasaki S, Masaki T, Umetani N, Futakawa N, Ando H, Muto T. Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 202-206.

Sasayama S, Fujita M. Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation* 1992; 85: 1197-1204.

Scalmati A, Lipkin M, Newmark H. Calcium, vitamina D and colon cancer. *Clin Appl Nutr* 1992; 2: 67-74.

Schaffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998; 85: 444-460.

---

Scherer SJ, Welter C, Zang KD, Dooley S. Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(3): 722-8.

Schlingeman RO, Rietveld FJR, deWaal RMW, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJS, Greaves MF, Denekamp J, Ruiter DJ. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* 1990; 62: 690.

Schor AM, Pendleton N, Pazouki S et al. Assessment of ascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem* 1998; 30(12): 849-56.

Schurch W, Seemayer TA, Lagace R. Stromal myofibroblast in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopic study. *Virchows Arch A pathol Anat Histol* 1981; 391(2) : 125-39.

Schweiki D, Itin Asoffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.

Scott N, Jackson P, Al-Jaberi T, Dixon MF, Quirke P, Finan PJ. Total mesorectal excision and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br . J. Surg* 1995; 82: 1031-1033.

Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G. Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma. A possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 525-33.

Seghezzi G, Patel S, Ren CS, Gualandnis A, Pintucci G, Robbins ES et al. Fibroblast growth factor-2(FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141: 1659-1673.

Senger DR, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion metástasis*.1995; 14(1-6): 385-94

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis* 2001 Oct; 22(10): 1653-9.

Shan YS, Lee JC, Chow NH, Yang HB, Wang ST. Immunohistochemical microvessel count is not a realible prognostic predictor in colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(53): 1316-20.

Shao Z-M, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 2000; 19: 4337-4345.

Shibara M, Mrizane T, Uchida T, et al. Irregular regeneration of hepatocytes and the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 1998; 251: 1773-1777.

Shibaya M. Role of VEGF-FLT receptor sytem in normal and tumoral angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1995; 67: 281-316.

Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J.* 1991; 5: 2292.

Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, Nakashima M, Kohno S, Sekine I. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2000;1(9): 925-33.

Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Prognostic evaluation of perineural invasión in rectal cancer. *Am J Surg* 1993;165: 233.

Shirouzu KL, Mordomi T. Carcinomatous lymphatic permeation. Prognostic significance in patients with rectal carcinoma:a longterm prospective study. *Cancer* 1995; 75: 4.

Sibbering DM, Locker AP. Blood transfusion and survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 358.

Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IM, Helin HJ, Isola JJ. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 1995; 8: 745-752.

Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 154-9.

Sinha R, Rothman N. Role of well-done,grilled red meat, heterocyclic aminas (HCAs)in the etiology of human cancer. *Cancer Lett* 1999; 143: 189-194.

Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S and Fusenig NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nature Med* 1997; 11: 1222-1227.

Slattery ML, Potter JD. Physical activity and colon cancer:confunding or interaction. *Med Sci Sport Exerc* 2002 Jun; 34(6): 913-919.

Sloane BF, Moin K, Rozhin J. Cathesin B and its endogenous inhibitors: role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 1: 153-160.

---

Smith BD, Smith GL, Carter D, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2046-2052.

Smith-Warner SA, Giovannucci E. Fruit and vegetable intake and cancer. In Heber D, Blackburn GL, Go VLW, eds. *Nutritional Oncology*. San Diego, Academic Press, 1999: 153-193.

Spjut HJ. Pathology of neoplasms. In: Spratt JS, ed. *Neoplasms of the colon, rectum, and anus: mucosal and epithelial*. Philadelphia: WB Saunders, 1984.

Srivastava A, Hughes LE, Woodcock JP, Laidler P. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0mm thick) skin melanoma: a quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-23.

Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-9.

Stafil A, Mattingly RF. Angiogenesis for cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 845-52

Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors: The Gastrointestinal Tumor Group experience. *Cancer* 1986; 57: 1866.

Stenback F, Risteli J, Risteli L et al. Basement membrane laminin and type IV collagen in endometrial adenocarcinoma: Relation to differentiation and treatment. *Oncology* 1985; 42: 370-376.

Stephen Byers, Morag Park, Connie Sommers and Stephen Seslar. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast Cancer Research and Treatment* 1994; 31: 203-215.

Sternfeld T, Foss HD, Kruschewski M, Runkel N. The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 1999; 14: 272-276.

Stetler-Stevenson WG. Type IV collagenase in tumor invasion and metastases. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 289.

Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG. Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 3-11.

Swedish rectal cancer trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N. Engl. J. Med* 1997; 336: 980-987.

Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y et al. Vessel counts and VEGF expression as prognostic factors in node negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; 132: 541-546.

Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: Role of infiltrating cell. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1146-1151.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. 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.

Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, et al. The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas:an investigation of their expression as prognostic markers. *Eur J Cancer* 1996; 32 A: 1504-1509.

Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 78, 2: 226-231.

Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor , thymidine phosphorylase,in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1110-1117.

Takeda A, Shimada H, Imaseki H et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in colorectal cancer patients: Correlation with clinicopathologic tumor markers. *Oncol Rep* 2000; 7: 333-338.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein. A marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1153-1162.

Tang R, Wang J. Survival impact of lymph node metástasis in TNM stage III carcinoma of the colon and rectum. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 705.

Tang WY, Elnatan J, Lee YS, Goh HS, Smith DR. c-K-ras mutations in colorectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cáncer incidence. *Br J Cáncer* 1999; 81 : 237-241.

Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS, Holick MF. *Lancet* 2001 May 26; 357 (9269 ): 1673-4.

Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horichi T, Muraoka R and Iki M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metástasis in gastric carcinomas. *Cancer Res.*1996; 56: 2671-2676.

---

Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metástasis in patients with colorrectal cáncer. *Cancer Res* 1997; 57: 1043-1046.

Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Bioll* 1990; 111: 765-772.

Tarta C, Texeira CR, Tanakas , Haruma K, Chiele-Neto C, Da Silva VD. Angiogenesis in advanced colorectal adenocarcinoma with special reference to tumoral invasion. *Arq Gastroenterol.*2002; 39(1): 32-8.

Testa JE, Quigley JP. Reversal of misfortune: TIM-P2 inhibits tumor cell invasion. *J Natl Cáncer Inst* 1991; 83: 740.

Testa JE, Quigley JP. The role of urokinase-Type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metástasis Rev* 1990; 9: 353.

Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cáncer. *Cancer* 1995; 75: 154-170.

Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, et al. Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2261-2266.

Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC and Simpson JG. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* 1987; 151: 323-332.

Tien Y-W, Chang K-J, Jeng Y-M, Lee P-H, Wu M-S, Lin J-T, Hsu S-M. Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells. *Clin Cáncer Res.*2001; 7: 1627-1632.

Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cáncer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cáncer Res Treat* 1995; 36: 193-204.

Tomisaki S, Ohmo S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantitation and its possible relation with liver metástasis in colorectal cáncer. *Cancer* 1996; 77: 1722-1728.

Tomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cáncer* 1955; 9: 539.

Tomoda H, Kakeji T. Prognostic significance of flow cytometric analysis of DNA content in colorectal cáncer: a prospective study. *J Surg Oncol* 1993; 53: 144.



Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Aribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA, Capella G. P53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17: 1375-1381.

Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* .2003; 107(4): 541-50.

Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal cancer in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999 Apr 15; 85(8): 1670-6

Tsuboi R, Sato Y, Rifflin DB. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 1990; 110: 511-517.

Tsuji T, Sasaki Y, Tanaka M, Hanabata N, Hada R, Munakata A. Microvessel morphology and vascular endothelial growth factor expression in human colonic carcinoma with or without metastasis. *Lab Invest* 2002; 82(5): 555-62.

Turnbull RB, Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technique on survival rates. *Ann Surg* 1967; 166: 420.

Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, et al. Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9009.

Umpleby HC, Williamson RCN. Carcinoma of the large bowel in the first four decades. *Br J Surg* 1984; 71: 272.

Ueno H, Jones A M, Wilkinson K H, Jass J R, Talbot I C. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut* 2004; 53(4): 581-586.

Van de Berg JS, Rudolph R, Woodward M. Growth dynamics of cultured myofibroblasts from human breast cancer and non malignant contracting tissues. *Plasr Reconstr Surg* .1984; 73: 605-1984.

Van Netten JP, Cann SA, Van der Westhuizen NG. Angiogenesis and tumor growth (correspondence-reply by Folkman J). *N Engl J Med* 1995; 334: 920-921.

Vermeulen PB, Roland L, Mertens V, Van Marck E, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY. Correlation of intratumoral density and p53 protein overexpression in human colorectal adenocarcinoma. *Microvasc Res* 1996 ; 51(2): 164-74.

---

Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumor cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol* 1995; 6: 59-64.

Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R et al. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 2001; 195: 336-342.

Vermeulen PB, Verhoeven D, Fierens H, et al. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Br J Cáncer* 1995; 71: 340-343.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, Mc Culloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cáncer* 1996; 14: 2474-2484.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JAM, Waal RMW, Van Marck, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cáncer* 2002; 38: 1564-1579.

Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cáncer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cáncer* 2002 May 10; 99(2): 157-66.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR. Genetic alterations during colorectal-tumour development. *N.Engl J Med* 1988; 319: 525-532.

Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast Cáncer Res Treat* 1995; 36: 119-126.

Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cáncer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cáncer* 2002. May 10; 99(2): 157-66.

Vu TH. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-422.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S and Ushigome S. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-262.

Walker ARP, Walker AJ. Faecal ph, dietary fibre intake, and proneness to colon cancer in four South African populations. *Br J Cancer* 1986; 53: 489-495.

Walker RM A. The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 143-145

Wall RT, Harker LA, Striker GE. Human endothelial cell migration and stimulation by a released platelet factor. *Lab Invest* 1978; 39: 523-529.

Wapnir EL, Barnard N, Wartenberg D, Greco RS. The inverse relation between microvessel counts and tumor volume in breast cancer. *Breast J.* 2001 May-Jun; 7(3): 184-8.

Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma. *Lab Invest* 1966; 15: 464

Warren BA. The ultrastructure of the microcirculation at the advancing edge of Walker 256 carcinoma. *Microvasc.Res.* 1970; 2: 443-453.

Watanabe M, Hirano T, Asano G. Roles of myofibroblast in the stroma of human gastric carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1995; 96: 10-8.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875.

Weidner N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 1998; 184: 119-122.

Weidner N, Semple JP, Welch, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1.

Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diagn Pathol* 1993; 10: 302-313.

Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.

Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-95.

Wittig BM, Kaulen H, Thees R, Schmitt C, Knolle P, Stock J et al. Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32: 1215-1218.

Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and colorectal adenocarcinomas. *Cancer* 1991; 68: 879.

---

Wolmark N, Fisher ER, Wieand HS, Fisher B. The relationship of depth of penetration and tumor size to the number of positive nodes in Dukes C colorectal cancer. *Cancer* 1984; 53: 2707.

Wolmark N, Fisher B and Wieand. The prognostic value of the modifications of the Dukes' C class of colorectal cancer. *Ann Surg* 1986; 203: 115-121.

Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, et al. The prognostic significance of tumor and localitation and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer: findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg* 1983; 198: 743.

World Cancer Research Fund. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A global Perspective. Washington,DC, American Institute for Cancer Research, 1997.

Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts R et al. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 1999; 10: 965-971.

Yamamura T, Tsukikara S, Yamada K, Yamaguchi S. Morphologic analysis of microvessels in colorectal tumors with respect to the formation of liver metastasis. *Journal of Surgical Oncology* 2001; 78: 259-264.

Younes M, Katikaneni PR. The value of the preoperative mucosal biopsy in the diagnosis of colorectal mucinous adenocarcinoma. *Cancer* 1993 ; 72: 3588.

Young H, Baum R, Cremerius U, et al. Measurement of clinical and subclinical tumour response using(18 F)-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1773-1782.

Zeng ZS, Guillen JG. Distinct pattern of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastasis. *Br J Cancer* 1995; 72: 575-582.

Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 899-906.

Zeng ZS, Guillen JG. Unique activation of matrix metalloproteinase-9 within human liver metastasis from colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 1998; 78: 349-353.

Zeng ZS, Cohen AM, Guillen JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9(MMP-2 and MMP-9)during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20: 749-755.

Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996; 14: 3133-3140.

Zinser H, Rosenbauer K. Untersuchungen über die Angioarchitektur der normalen und pathologisch Veränderten Zervix uteri. *Arch Gynaekol* 1960; 194: 73.



D. JAVIER ESQUIVIAS LOPEZ-CUERVO, doctor en medicina, médico adjunto del Servicio de Anatomía Patología del H.U. San Cecilio.

CERTIFICA: que D<sup>a</sup>. María Jesús Alvarez Martín, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral:

“ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL EN EL CÁNCER DE COLON. APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE IMAGEN”

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser calificado.

Granada, de Octubre de 2004.

---

D. FRANCISCO JAVIER O'VALLE RAVASSA, doctor en medicina, médico adjunto del Servicio de Anatomía Patología del H.U. San Cecilio.

CERTIFICA: que D<sup>a</sup>. María Jesús Alvarez Martín, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral:

“ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL EN EL CÁNCER DE COLON. APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE IMAGEN”

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser calificado.

Granada, de Octubre de 2004.



D. JOSE DARIO SANCHEZ LOPEZ, doctor en medicina, médico adjunto del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del H.U. Virgen de las Nieves.

CERTIFICA: que D<sup>a</sup>. María Jesús Alvarez Martín, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral:

“ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL EN EL CÁNCER DE COLON. APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE IMAGEN”

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser calificado.

Granada, de Octubre de 2004.

## **INDICE**

<b><u>Índice.</u></b>	I
<b><u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	1
<u>1.1.- Epidemiología del cáncer colorrectal.</u>	3
<u>1.2.- Factores etiológicos.</u>	3
1.2.1.- Factores dietéticos.	4
1.2.2.- Factores medio-ambientales y de actividad física.	5
1.2.3.- Factores genéticos y moleculares.	5
<u>1.3.- Histología del intestino grueso.</u>	9
<u>1.4.- Anatomía patológica del cáncer de colon.</u>	12
1.4.1.- Apariencia macroscópica.	12
1.4.2.- Tipos histológicos.	13
1.4.3.- Grado histológico.	15
<u>1.5.- Clasificación y factores pronóstico del carcinoma colorrectal.</u>	16
1.5.1.- Estadío tumoral: clasificación patológica- quirúrgica.	16
1.5.1.1.- Clasificación de Dukes y sus modificaciones.	17
1.5.1.2.- Clasificación TNM.	18
1.5.2.- Variables pronóstico adicionales: Características clínicas.	21
1.5.3.- Variables pronóstico adicionales: Características anatomo-patológicas.	23
1.5.4.- Características biológicas adicionales del tumor.	26
<u>1.6.-Reacción desmoplásica.</u>	27
<u>1.7.-Angiogénesis: generalidades y definición.</u>	34
1.7.1.- Proceso angiogénico.	35
1.7.2.- Angiogénesis y cáncer.	39
1.7.2.1.- Relación entre el fenotipo de las células tumorales y células endoteliales.	43
1.7.2.1.1.- Proliferación de células tumorales y angiogénesis.	43
1.7.2.1.2.- Invasividad de células tumorales y angiogénesis.	44
1.7.2.1.3.- Diseminación tumoral hematogena y angiogénesis.	48
1.7.3.- Control de la angiogénesis.	50
1.7.3.1.- Factores angiogénicos.	50
1.7.3.1.1.- Factores proangiogénicos.	51
1.7.3.1.2.- Factores inhibidores de la angiogénesis.	57
1.7.3.2.- Factores de matriz extracelular y de adhesión celular.	58
1.7.4.- Determinación de la angiogénesis.	62
1.7.4.1.- Cuantificación de la angiogénesis.	63
1.7.4.2.- Proliferación de células endoteliales.	71

1.7.4.3.-	Porcentaje de recubrimiento pericítico.....	71
1.7.4.4.-	Métodos complementarios para determinar el potencial angiogénico de los tumores.....	72
1.7.4.4.1.-	Marcadores histopatológicos sustitutivos de la actividad angiogénica de los tumores .....	72
1.7.4.4.2.-	Otros marcadores sustitutivos de la actividad angiogénica de los tumores.....	73

## **Índice**

**II**

1.7.5.-	Terapia antiangiogénica.....	74
1.7.5.1.-	Estrategias utilizadas para el diseño de agentes antiangiogénicos.....	75
1.7.5.2.-	Determinación de la eficacia de la terapia antiangiogénica.....	76
1.7.5.3.-	Objetivos de la terapia antiangiogénica.....	77
1.7.5.4.-	Terapias antiangiogénicas en desarrollo.....	78

## **II.-OBJETIVOS**.....83

### 2.1.-Objetivo general.....86

### 2.2.-Objetivos específicos.....86

2.2.1.-	Objetivos clínicos.....	86
2.2.2.-	Objetivos morfológicos.....	86
2.2.3.-	Objetivos morfométricos.....	87
2.2.4.-	Objetivos finales.....	87

## **III.-MATERIAL Y MÉTODOS**.....89

### 3.1.-Diseño del estudio.....91

### 3.2.-Proceso de recogida de datos.....92

### 3.3.-Variables estudiadas.....94

3.3.1.-	Filiación del paciente.....	94
3.3.2.-	Parámetros clínicos.....	94
3.3.3.-	Parámetros histopatológicos.....	96
3.3.4.-	Valoración del estado actual y supervivencia.....	99
3.3.5.-	Angiogénesis.....	99
3.3.5.-	Desmoplasia.....	100

### 3.4.-Procedimientos de laboratorio.....101

#### 3.4.1.- Preparaciones histológicas.....101

3.4.1.1.-	Tinción con Hematoxilina-eosina.....	101
3.4.1.2.-	Estudio inmunohistoquímico con anticuerpo monoclonal anti-CD-34.....	101
3.4.1.3.-	Tinción Rojo Sirio para la identificación del tejido conectivo.....	103
<u>3.5.-Técnica de análisis de imagen.Material y procedimientos.....</u>		104
3.5.1.-	Microscopio, cámara de video y soporte informático.....	104
3.5.2.-	Captación y análisis de imagen.....	105
<u>3.6.-Análisis estadístico.....</u>		112
3.6.1.-	Análisis descriptivo univariante y estratificado.....	112
3.6.2.-	Análisis bivariante.....	112
3.6.3.-	Análisis multivariante.....	113
3.6.3.1.-	Factores asociados a la angiogénesis y la fibrosis.....	113
<b>Índice</b>		<b>III</b>
3.6.4.-	Medias de angiogénesis según parámetro de estudio.....	115
3.6.5.-	Análisis de supervivencia.....	115
3.6.6.-	Análisis gráfico.....	115

**IV.-RESULTADOS.....117**

<u>4.1.-Estudio descriptivo.....</u>		119
4.1.1.-	Descripción de datos demográficos.....	119
4.1.2.-	Descripción de variables categóricas u ordinales.....	119
4.1.3.-	Descripción de variables continuas.....	122
<u>4.2.-Correlación de CT,PT,MM y Fibrosis con las variables continuas del estudio (edad, tamaño tumoral).....</u>		124
4.2.1.-	Correlación entre angiogénesis de la zona CT con las variables continuas de estudio (edad, tamaño tumoral).....	124
4.2.2.-	Correlación entre angiogénesis de la zona PT con las variables continuas de estudio (edad, tamaño tumoral).....	125
4.2.3.-	Correlación entre angiogénesis de la zona MM con las variables continuas de estudio (edad,tamaño tumoral).....	125
4.2.4.-	Correlación entre las determinaciones de fibrosis (F) con las variables continuas de estudio (edad, tamaño tumoral ).....	126
<u>4.3.-Resultados del estudio de correlación entre las diferentes mediciones.....</u>		127
4.3.1.-	Correlación entre las diferentes mediciones tomadas de CT, PT, MM y F..	127
4.3.2.-	Correlación entre las diferentes mediciones tomadas de fibrosis con la densidad vascular de las zonas tumorales CT, PT, MM.....	129
4.3.3.-	Correlación entre las diferentes mediciones de angiogénesis	

dentro de cada una de las zonas de estudio.....	130
4.3.4.- Correlación entre sí de las distintas mediciones tomadas de fibrosis.....	130
<u>4.4.-Resultados de angiogénesis.....</u>	<u>132</u>
4.4.1.- Comparación CT, PT y MM.....	133
4.4.1.1.- Medias de angiogénesis según parámetros de estudio.....	133
4.4.2.- Resultados del análisis bivalente CT, PT, MM con el resto de parámetros de estudio.....	140
4.4.2.1.- CT.....	140
4.4.2.2.- PT.....	141
4.4.2.3.- MM.....	142
4.4.3.- Resultados de las comparaciones al dividir la muestra en hipo e hipervascular en relación a la media de la densidad vascular.....	144
<u>4.5.-Resultados de fibrosis.....</u>	<u>146</u>
4.5.1.- Análisis bivalente de fibrosis.....	146
<u>4.6.-Análisis multivariante.....</u>	<u>150</u>
4.6.1.- Análisis multivariante de angiogénesis.....	154
<b><u>Índice</u></b>	<b>IV</b>
4.6.1.1.- Densidad CT.....	154
4.6.1.2.- Densidad MM.....	155
4.6.1.3.- Densidad PT.....	156
4.6.1.4.- Perímetro CT.....	156
4.6.1.5.- Perímetro PT.....	157
4.6.1.6.- Perímetro MM.....	157
4.6.1.7.- “Compactness CT.....	158
4.6.1.8.- “Compactness” PT.....	158
4.6.1.9.- Área CT.....	159
4.6.1.10.- Área PT.....	159
4.6.1.11.-Área MM.....	160
4.6.2.- Análisis multivariante de fibrosis.....	160
4.6.2.1.- Perímetro de fibrosis.....	160
4.6.2.2.- “Compactness” de fibrosis.....	161
<u>4.7.-Resultados del análisis de supervivencia.....</u>	<u>163</u>
4.7.1.- Supervivencia global.....	163
4.7.2.- Supervivencia libre de enfermedad.....	168
<b><u>V.-DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>173</u></b>

---

<u>5.1.-Discusión de la metodología.....</u>	178
<u>5.2.-Discusión de resultados.....</u>	185
5.2.1.- Determinaciones de angiogénesis.....	185
5.2.1.1.- Estudio topográfico descriptivo de la arquitectura vascular tumoral PT-CT frente al borde sano.....	185
5.2.1.2.- Estudio de correlación.....	190
5.2.1.3.- Análisis Bivariante-Multivariante.....	191
5.2.2.- Determinación de fibrosis (Reacción desmoplásica).....	203
5.2.2.1.- Reacción desmoplásica y angiogénesis.....	203
5.2.2.2.- Determinación de fibrosis y su asociación con otras variables clínico-patológicas.....	204
5.2.3.- Análisis de supervivencia.....	212
5.2.3.1.- Factores clínico-patológicos tradicionales.....	212
5.2.3.2.- Angiogénesis.....	213
5.2.3.3.- Desmoplasia.....	213
<b><u>VI.-CONCLUSIONES.....</u></b>	223
<b><u>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	229

---

**ABREVIATURAS.****I**

**AJCC:** American Joint comité on Cáncer.

**Aa:** Aminoácido.

**AVM:** Área vascular media.

**BVI:** Invasión de vasos sanguíneos.

**CCR:** Cáncer colorrectal.

**CCH:** Cáncer de colon en humanos.

**CIAS:** Análisis computarizado de imagen.

**CMI:** Respuesta inmune mediada por células.

**CEA:** Antígeno carcinoembrionario.

**CIN:** Neoplasia intracervical.

**CD34:** Antígeno de células progenitoras del sistema hematopoyético humano.

**CD31:** Molécula de adhesión celular endotelial plaquetario o PECAM.

**CT:** Centro tumoral.

**DMI:** Densidad microvascular intratumoral.

**3D:** Tres dimensiones.

**ECM:** Extracelular matriz.

**ECP:** Proliferación de células endoteliales.

**ECS:** Células endoteliales.

**FAP:** Poliposis adenomatosa familiar.

**FDPs:** Productos de degradación del fibrinógeno.

**FGF:** Factor de crecimiento derivado de fibroblastos.

**FvW:** Factor de Von Willebrand.

**GITSG:** Gastrointestinal Tumor Study Group.

**HI:** Respuesta inmune humoral.

**IGF:** Factor de crecimiento "insulin like".

**MM:** Borde sano.

**MB:** Membrana basal.



**MMPs:** Metaloproteinasas.

**MMPIs:** Inhibidor de las metaloproteinasas.

**MSI-H:** Alta inestabilidad de los microsátélites.

**N-:** Sin afectación ganglionar.

**N+:** Con afectación ganglionar.

**PT:** Periferia tumoral.

**PDFG:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PECAM:** Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria.

**QT:** Quimioterapia.

**RT:** Radioterapia.

**SG:** Supervivencia global.

**SLE:** Supervivencia libre de enfermedad.

**TCP:** Proliferación de células endoteliales.

**TGF:** Factor de crecimiento transformante.

**UICC:** Internacional Unión Against Cáncer.

**VPF:** Factor de permeabilidad vascular.

**VEGF:** Factor de permeabilidad endotelial vascular.

**WHO:** Organización Mundial de la Salud.

