

20 **A. Moreno-Elola^a**
J.A. Vidart^a
L. González^b
M. Calvo^a
J.A. Asenjo^b
V. Furio^b
P. Coronado^a
R. Navazo^a
M. Escudero^a

^aDepartamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. ^bDepartamento de Anatomía Patológica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Este trabajo ha sido financiado por una beca de la Comunidad Autónoma de Madrid (Dirección General de Investigación, Consejería de Sanidad) Cod. UNESCO 08.1/0011.1/1998.

Correspondencia:
Dra. A. Moreno Elola.
Departamento de Obstetricia y Ginecología.
Hospital Clínico San Carlos.
Martín Lago, s/n. 28040 Madrid. España.

Fecha de recepción: 29/08/03
Aceptado para su publicación: 7/01/04

RESUMEN

Introducción: La cuantificación de la angiogénesis, en teoría, podría ser un factor determinante del pronóstico de ciertos carcinomas, ya que determina la posibilidad de metastatizar por parte del tumor primario.

Material y métodos: Se plantea un estudio retrospectivo sobre 74 pacientes con carcinoma de ovario en estadios I-IV (FIGO) y tratados en el Hospital Clínico San Carlos (Madrid) en el período 1985-1995. Se midió el índice angiogénico (determinación con anticuerpo monoclonal CD34, y cuantificación mediante un sistema digital de análisis de imagen Leika Q500IW con software propio), y se comparó el comportamiento de tumores con angiogénesis positiva y negativa en relación con los eventos de muerte y recidiva (estudio de regresión logística). El seguimiento mediano fue de 40,5 meses (rango, 3-105).

Resultados: La angiogénesis es un parámetro cuantificable, y es un factor pronóstico independiente para el riesgo relativo de muerte y

Significado pronóstico de la densidad microvascular en el cáncer de ovario: estudio de una serie de 74 casos

Prognostic value of microvascular density in ovarian cancer in a series of 74 patients

recidiva para todos los estadios de carcinoma de ovario.

PALABRAS CLAVE

Angiogénesis. Carcinoma de ovario. Pronóstico.

ABSTRACT

Introduction: Angiogenesis is a determining factor in primary tumor metastasis and its quantification could have prognostic value in several carcinomas.

Material and methods: A retrospective study of 74 patients with ovarian carcinoma FIGO stage I-IV treated at the San Carlos Hospital from 1985-1995 was performed. Angiogenic index was determined by CD34 monoclonal antibody immunostaining, and quantification was achieved using a digital system (Leika Q500W). Univariate and multivariate analyses were performed to determine the relative risks of death and relapse. The median follow-up was 40.5 months (range, 3-105).

Results: Angiogenesis is a quantifiable parameter and an independent prognostic factor for relative risk of death and recurrence in all stages of ovarian carcinoma.

KEY WORDS

Angiogenesis. Ovarian carcinoma. Prognosis.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el proceso mediante el que nuevos capilares se desarrollan a partir de vasos pre-existentes. Se trata de un paso necesario para que se produzcan los procesos de desarrollo y de reparación del organismo, pero también para el crecimiento y la progresión tumorales¹⁻⁴. Este proceso incluye la degradación de la membrana basal capilar, y a través de ella las células endoteliales que han migrado proliferan para crear una nueva luz y subsiguiente maduración vascular⁵⁻⁷. El crecimiento desordenado de los vasos conduce a la invasión tumoral y al proceso de metastatización^{5,8,9}. La inducción de este complemento o angiogénesis es mediada por ciertas moléculas liberadas tanto por las células tumorales como por las del huésped¹⁰⁻¹⁴. Se plantea, por tanto, un estudio con los siguientes objetivos:

1. Validar la medición de la angiogénesis en un grupo heterogéneo de población con cáncer de ovario en estadio precoz y avanzado por métodos inmunohistoquímicos.

2. Demostrar la capacidad predictiva de la angiogénesis en términos de supervivencia e intervalo libre de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de la muestra poblacional

La población seleccionada consta de 74 casos de carcinoma epitelial de ovario diagnosticados en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital San Carlos de Madrid entre los años 1985 y 1995. Los carcinomas pertenecían a estadios I-IV (FIGO). Los criterios de inclusión se exponen en la tabla 1.

Tabla 1 Criterios de inclusión en el estudio

Diagnóstico anatopatológico de carcinoma epitelial de ovario
Período de inclusión: 1985-1995

Centro: Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Referencia: Departamento de Anatomía Patológica

Material válido para sección y tinción inmunohistoquímica de la pieza

Seguimiento mínimo: 24 meses en el mismo centro

Tratamiento quirúrgico: hysterectomía total y doble anexectomía, omentectomía, linfadenectomía pélviana*

*Indicación variable de linfadenectomía retroperitoneal, que no constituyó un criterio de inclusión.

En este grupo se estudió la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad globales, y cada factor pronóstico por separado, edad, estadio, grado de malignidad, tipo histológico, otros marcadores, tipo de tratamiento y enfermedad residual.

Manejo del material seleccionado: cuantificación de la angiogénesis

Las muestras de tejido estudiadas pertenecían al tumor primario. No se estudiaron especímenes correspondientes a la laparotomía de segunda mirada ni a metástasis. Desde el punto de vista anatopatológico se valoró el tipo histológico, la diferenciación y el grado nuclear. De las muestras almacenadas e incluidas en parafina, se eligió uno de los bloques para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica en función de la calidad de su conservación.

Inmunohistoquímica

En los bloques tumorales seleccionados se realizó determinación con anticuerpo monoclonal CD34 (Dako) a dilución 1/1.000 con un tiempo de incubación a temperatura ambiente de 45 min. Los cortes fueron tratados con calor en olla a presión durante 3 min en Buffer citrato. Con sistema de visualización se utilizó un kit de estreptavidina-biotina conjugado con peroxidasa y revelado con DAB (Master Diagnóstica). La valoración cualitativa de los

22 resultados la llevaron a cabo de forma independiente 2 patólogos.

Cuantificación

Se utilizó un sistema digital de análisis de imagen Leika Q500IW con *software* propio. El estudio lo realizó un patólogo, por lo que se llevó a cabo un reanálisis del 10% de los casos para evaluar las variaciones intraobservador, sin hallarse diferencias significativas.

En cada uno de los casos se analizaron 5,2548 mm² de superficie tumoral, que equivale a 11 campos de gran aumento ($\times 156$) de 478.116,8 μ^2 de superficie cada uno, seleccionando previamente a pequeño aumento (lupa) las áreas de mayor densidad vascular.

Se midió el área ocupada por vasos, considerando como tal las células endoteliales aisladas y en grupos con o sin luz central. No se excluyó ningún vaso del análisis (fig. 1).

Aplicación a la población estudiada

Descripción de la población

Se estudiaron las siguientes variables: edad, estadio tumoral (FIGO), tipo histológico, grado de ma-

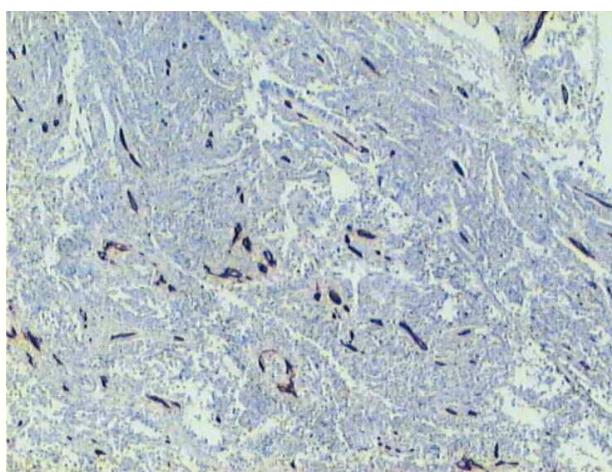


Figura 1. Tinción immunohistoquímica de microvasos con anti-CD34 en tejido de carcinoma de ovario a pequeño aumento (lupa).

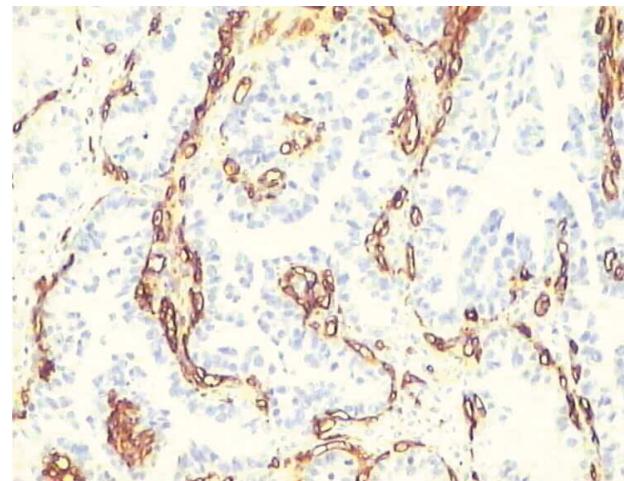


Figura 2. Tinción immunohistoquímica de microvasos con anti-CD34 en tejido de carcinoma de ovario. Selección de hot spots ($\times 156$).

lignidad, enfermedad residual, tipo de tratamiento quimioterápico, valores preoperatorios de Ca 125 en suero, estudio de la sobreexpresión de Her-2-neu en citosol y en membrana, estudio de la expresión de la proteína supresora p53, seguimiento de la enfermedad en meses desde el momento del diagnóstico (fecha de la cirugía o del comienzo de la neoadyuvancia), estado en el momento de la última revisión (libre de enfermedad, recidiva, muerte) e índice angiogénico.

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias y su intervalo de confianza (IC) exacto del 95% según la distribución binomial. Las variables cuantitativas se resumen en su media y su desviación estándar (DE) junto a su IC del 95%.

Estudio univariado

Las variables cuantitativas se agruparon como sigue:

1. Las pacientes con índice angiogénico superior o igual al índice angiogénico medio en cada caso se clasificaron como positivas, y las pacientes con índice angiogénico menor al índice angiogénico medio se clasificaron como negativas.

2. La edad se agrupó en menor o mayor de la edad poblacional media.

En el estudio univariado se introdujeron la totalidad de las variables para observar su capacidad predictiva del comportamiento tumoral utilizando un nivel de significación con una $p < 0,05$, con el objeto de seleccionar las variables para el estudio multivariado.

Estudio multivariado

Las variables en que se demostró influencia en el pronóstico en el estudio univariado ($p < 0,05$) se incluyeron en el análisis multivariado, para determinar los factores pronóstico independientes para los eventos: muerte y recidiva tumoral. Se utilizó un nivel de significación de $p < 0,05$.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística, y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentan los riesgos relativos (RR) ajustados junto a sus IC del 95%.

RESULTADOS

Estudio descriptivo

La edad media (DE) fue de 62,3 (16,04) años. La edad mediana fue de 65 años (rango, 28-89). La medida del índice angiogénico medio fue 6.656,48 (6.066,66) microvasos/5,2548 mm² rango, 870,86-23.135,94). Las características de la población se presentan en la tabla 2.

El seguimiento medio fue de 47,4 (31,6) meses. El seguimiento mediano fue de 40,5 meses (rango, 3-105). La supervivencia media fue de 65 (5) meses. El tiempo libre de enfermedad medio fue de 55 (4) meses .

Estudio univariado para la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad

Las variables que se comportaron como factores de riesgo dependientes para los eventos de muerte y recidiva se exponen en la tabla 3. El índice angiogénico resultó un factor pronóstico para el riesgo relativo de muerte y de recidiva.

Tabla 2 Características del estudio descriptivo

Variables	Categorías	Porcentaje
Estadio	I	10
	II	8
	IIIa	5
	IIIb	16
	IIIc	53
	IV	8
Estadio agrupado	Precoz	18
	Avanzado	56
Grado	I	15
	II	34
	III	51
Tratamiento quimioterápico	Sí	80
	No	20
Enfermedad residual	No	33
	< 2 cm	33
	> 2 cm	33
Tipo histológico	Endometriode	36
	Seroso	34
	Mucinoso	11
	Células claras	12
Ca 125	Positivo	43
	Negativo	57
Her-2-neu en citosol	Positivo	31
	Negativo	43
Her-2-neu en membrana	Positivo	35
	Negativo	42
P53	Positivo	39
	Negativo	39
Índice angiogénico	Positivo	61
	Negativo	39

Tabla 3 Estudio univariado

Variables	RR muerte (p)	RR recidiva (p)
Edad	0	0
Estadio	0,01	0
Grado	0,16	0,02
Enfermedad residual	0,02	0,005
DMV	0	0
Histopatología	0	0,06
Ca 125	0,20	0,12
Her-2-neu en citosol	0	0
Her-2-neu en membrana	0,06	0
P53	0	0

Nivel de significación: $p = 0,05$. RR: riesgo relativo.

DMV: densidad microvascular.

24 Estudio multivariado para los eventos de muerte y recidiva

Las variables que se introdujeron en el estudio multivariado fueron:

— Para el estudio de RR de muerte: edad, estadio tumoral, índice angiogénico, tipo anatomo-patológico, grado de malignidad Her-2-neu en citosol y en membrana y P53.

— Para el estudio de RR de recidiva: edad, estadio tumoral, grado de malignidad, enfermedad residual, índice angiogénico, tipo anatomo-patológico, Ca 125, Her-2-neu en citosol y en membrana y P53.

Para el riesgo relativo de muerte la edad, el índice angiogénico y el estadio fueron factores pronóstico independientes (tabla 4a). Para el riesgo relativo de recidiva de la enfermedad, la edad, el estadio, el índice angiogénico y la enfermedad residual tras la primera cirugía fueron factores pronóstico independientes (tabla 4b).

DISCUSIÓN

La angiogénesis tumoral es un factor mensurable gracias a la determinación de la densidad microvascular: la cuantificación de neovasos es un método directo y de realización simple que permite el estudio de muestras de la pieza tumoral con carácter retrospectivo y, por lo tanto, con la posibilidad de estudiar un seguimiento a largo plazo, lo que lo diferencia de los estudios basados en valores sanguíneos¹⁴ o contenidos quísticos¹⁵. La densidad microvascular se estudió tñiendo los neovasos, lo que se consigue con técnicas de inmunohistoquímica y recuento posterior de los vasos teñidos, que puede ser manual o, como en este caso, por análisis morfométrico.

Este estudio es el primero en demostrar que la misma técnica de cuantificación angiogénica es válida para pacientes en estadio temprano y avanzado de carcinoma de ovario. Asimismo, demuestra la influencia que ejerce sobre la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad en un seguimiento a largo plazo. El sistema empleado, la medición computarizada, ha dado excelentes resultados, y aunque no todos los autores la consideran esencial para demostrar el valor pronóstico del test, hace el estudio más rápido y objetivo.

Tabla 4a Estudio multivariado para el riesgo relativo de muerte

Variables	Categorías	RR	p
Edad (años)	< 62	1	0,01
	≥ 62	2,7	
Estadio	I, II	1	0,02
	III, IV	1,5	
DMV	< 6.500	1	0,01
	> 6.500	1,3	

Nivel de significación: p = 0,05. RR: riesgo relativo.

DMV: densidad microvascular.

Tabla 4b Estudio multivariado para el riesgo relativo (RR) de recidiva

Variables	Categorías	RR	p
Edad (años)	< 62	1	0,03
	≥ 62	1,3	
Estadio	I, II	1	0,02
	III, IV	1,8	
DMV	< 6.500	1	0,00
	> 6.500	2,4	
Enfermedad residual	No	1	0,00
	Sí	2,1	

Nivel de significación: p = 0,05. DMV: densidad microvascular.

La angiogénesis fue estudiada por primera vez en pacientes con cáncer de ovario en estadios III y IV por Hollingsworth et al en 1995, utilizando la inmunotinción con CD34. El estadio fue el mejor predictor para la supervivencia, mientras que el estudio angiogénico lo fue para el tiempo libre de enfermedad¹⁶.

Posteriormente, Gasparini et al estudiaron en 1996 la asociación entre la densidad microvascular y las características clinicopatológicas de pacientes con cáncer de ovario para determinar si la primera podría representar un factor pronóstico de la supervivencia y de la respuesta al tratamiento quimioterápico. Mediante determinación inmunohistoquímica del anticuerpo CD31 en 112 muestras de cáncer de ovario demostraron en el estudio multivariado el papel de la angiogénesis como indicador pronóstico de la respuesta de este tumor a la quimioterapia¹⁷.

Abulafia et al demostraron una relación estadísticamente significativa de la medición de la densidad

microvascular en las metástasis epiploicas con la supervivencia y con los valores preoperatorios de Ca 125 (para estadios IIIb y IIIc)¹⁸. Al no existir correlación con otros factores pronósticos, concluyeron que la medición de la densidad microvascular en las metástasis es un factor pronóstico independiente. Sin embargo, el método adecuado para establecer el comportamiento de una variable como factor pronóstico independiente es el estudio multivariado, como se presenta en este trabajo.

Schoell et al confirmaron la importancia de la neovascularización como marcador biológico del carcinoma epitelial de ovario en estadio avanzado en un grupo de 14 pacientes estrictamente seleccionadas y clasificadas por sus características pronósticas¹⁹. Estos autores fueron los primeros en incorporar un sistema de análisis morfométrico computarizado, cuantificando la densidad microvascular en muestras de tumor primario de ovario mediante tinción inmunohistoquímica con CD34. El interés del estudio es que demuestra la independencia de la medición de la angiogénesis como factor pronóstico; sin embargo, la muestra es pequeña. Estos estudios y otros demuestran que la angiogénesis puede ser cuantificada y que constituye un factor pronóstico para el cáncer de ovario avanzado^{20,21}, tanto si lo medimos de forma indirecta^{22,23} como si lo hacemos de forma directa²⁴ o si estudiamos otros factores asociados²⁵.

La inmunotinción de muestras del tumor primario con CD34 es el método más directo del que dispon-

nemos, y el más fiable¹⁹, aunque se puede utilizar igualmente CD31. Además, permite la recuperación de muestras de tumor almacenadas y, por tanto, la realización de estudios retrospectivos a largo plazo, lo que representa el mejor tipo de estudio para evaluar la utilidad de un factor pronóstico. En este estudio se ha utilizado un sistema de cuantificación similar al propugnado por Schoell, por análisis morfométrico computarizado, con la particularidad de haber incorporado la traducción del resultado para la simplificación de su lectura, lo que representa la innovación respecto a otros estudios similares, ya que en nuestra opinión es fundamental que un método utilizado en la clínica de forma rutinaria sea fácil de interpretar.

En cuanto al estadio precoz, en este estudio observamos que la medición de la angiogénesis predice la recidiva tumoral y, por tanto, el pronóstico. Otros autores han demostrado resultados similares^{26,27}.

Tanto las conclusiones derivadas de la revisión bibliográfica como las de nuestro propio estudio demuestran que la medición de la angiogénesis es posible; constituye un factor pronóstico independiente de progresión y de recidiva para los estadios precoces de cáncer de ovario; constituye un factor pronóstico independiente de muerte para todos los estadios de cáncer de ovario, y se puede aplicar al estudio rutinario de la paciente con esta enfermedad, de manera que se implique en las decisiones terapéuticas²⁸⁻³¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2000;186:240-6.
2. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and Fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovary cysts formation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:353-9.
3. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
4. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
5. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation. What is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-5.
6. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
7. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecologic Oncology* 1999;72:220-31.
8. Weidner N, Semple JP, Welch JR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
9. Feng D, Nagy A, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM. Vesiculovacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine and serotonin. *J Exp Med* 1996;183:1981-6.

10. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998;49:407-24.
11. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79:185-8.
12. Weidner N, Folkman J. Tumor vascularity as a prognostic factor in cancer. In: De Vita VT, Hallman S, Rosenberg SA, editors. *Important advances in oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; p. 167-90.
13. Fidler JI, Kumar R, Bielemburg DR, Ellis LM. Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer J Sci Am* 1998;4:S58-66.
14. Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999;85:178-87.
15. Hazelton D, Nicosia RF, Nicosia S. Vascular endothelial growth factor levels in ovarian cyst fluid correlate with malignancy. *Clin Cancer Res* 1999;5:823-9.
16. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:3-41.
17. Gasparini G, Bonoldi E, Vitale G, Verdeiro P, Borachi P, Pannizoni GA, et al. Prognostic and predictive value of tumor angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69:205-11.
18. Albulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:541-7.
19. Schoell WM, Pieber D, Reich O, Laoussen M, Janicek M, Guecer F, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian cancer. *Cancer* 1997;80:2257-62.
20. Obermair A, Wasicky R, Kaider A, Preyer O, Losch A, Leodolter S, et al. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 1999;138:175-82.
21. Schifffenbauer YS, Abramovitch R, Meir G, Nevo N, Holzinger M, Itin A, et al. Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13203-8.
22. Paley PJ, Goff BA, Gown AM, Greer BE, Sage EH. Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;78:336-41.
23. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. Biologic implications of the expression of vascular endothelial growth factor subtypes in ovarian carcinoma. *Cancer* 1998;83:2528-33.
24. Heimburg S, Oehler MK, Kristen P, Papadopoulos T, Caffier H. The endothelial marker CD 34 in the assessment of tumour vascularisation in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997;17:3149-51.
25. Gordinier ME, Zhang HZ, Patenia R, Levy LB, Atkinson EN, Nash MA, et al. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 and 2 in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2498-505.
26. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson L. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80:98-106.
27. Kodama S, Tanaka K, Tokunaga A, Sudo N, Takahashi T, Matsui K. Multivariate analysis of prognostic factors in patients with ovarian cancer stage I and II. *Int J Gynaecol Obstet* 1997;56:147-53.
28. Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol* 1994;5:305-11.
29. Dhinigra K, Hortobagyi GN. Critical evaluation of prognostic factors. *Sem Oncol* 1996;23:436-45.
30. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
31. Kohn E. Angiogenesis in ovarian carcinoma: a formidable biomarker. *Cancer* 1997;80:2197-221.