



PROGRAMA DE DOCTORADO 285B "PATOLOGÍA DE LOS TUMORES HUMANOS"

**TÍTULO: "EXPRESIÓN DE CITOQUINAS
EN EL MECANISMO DE CRECIMIENTO
TUMORAL UTILIZANDO UN MODELO DE
XENOTRASPLANTE DE SARCOMAS
HUMANOS EN RATONES ATÍMICOS"**

DOCTORANDO: FRANCISCO GINER SEGURA

DIRECTORES: Dr. ANTONIO LLOMBART BOSCH
Dr. JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GUERRERO

D. Antonio Llombart Bosch, Profesor Honorario de Histología y Anatomía Patológica de la Universitat de València.

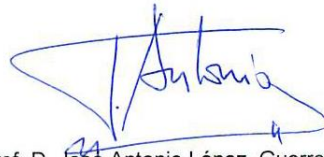
D. José Antonio López Guerrero, Doctor en Biología. Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO).

CERTIFICAN QUE:

La presente tesis doctoral " Expresión de citoquinas en el mecanismo de crecimiento tumoral utilizando un modelo de xenotransplante de sarcomas humanos en ratones atómicos" ha sido realizado por D. Francisco Giner Segura, licenciado en Medicina (Universitat de València) en el Departamento de Patología bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura. Y para que así conste, firman la presente en Valencia, marzo de 2014.



Fdo: Prof. D. Antonio Llombart Bosch



Fdo: Prof. D. José Antonio López Guerrero

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dedicarle unas palabras de agradecimiento a mi mentor, tutor y profesor Antonio Llombart que me dio la oportunidad hace ya algunos años de introducirme en el estudio de los tumores de partes blandas y hueso en xenotrasplantes en ratones atímicos. Durante estos años he tenido la enorme suerte de aprender con él las claves diagnósticas de estos complejos tumores de los que me ha transmitido su ilusión y entusiasmo en su estudio. Hace ya unos años me dio la oportunidad de empezar la tesis doctoral en Leiden, gracias al proyecto Eurobonet, donde pude aprender la técnica de inmunofluorescencia indirecta, así como el manejo del microscopio confocal. Por todo ello, nunca estaré lo suficientemente agradecido por toda la ayuda inestimable recibida de su parte.

Tampoco puedo agradecer menos la ayuda y el apoyo recibido del también tutor y doctor José Antonio López que me ha dirigido la tesis con tesón, transmitiéndome el rigor científico y la pasión por los estudios experimentales. Es mucho el tiempo que le ha dedicado a esta tesis y no tengo suficientes palabras de agradecimiento.

A su vez, no me puedo olvidar de los técnicos que me han ayudado en las técnicas y procesos experimentales y me han dado ánimos en momentos difíciles y me han sacado de muchos aprietos. Ellos son: Laura Martínez, Antonio Fernández, Antonio Ibáñez y Enrique Raga, con todos ellos he compartido muchas horas, tardes y semanas.

Tampoco puedo olvidarme de Dagmar Berghuis, Susy Santos y Arjan Lankester que me instruyeron en Leiden y guiaron mis primeros pasos en la tesis doctoral. Con ellos aprendí la técnica de inmunofluorescencia indirecta y su ayuda fue clave también en el trabajo que hoy presento.

Quiero agradecer también el trabajo de los compañeros y amigos del grupo de trabajo. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Agradecimientos también de manera especial al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia donde me formé como residente durante 4 años y por haber permitido realizar la inmunohistoquímica en su laboratorio. Quiero agradecerse a todas y cada una de las personas, es decir a

todos los adjuntos y residentes con los que he convivido durante ese período de tiempo y que no nombro por no extenderme y porque seguro me dejaría alguno. Por último, que no por ello menos importante, quiero agradecer de una forma especial este trabajo a mis padres por su apoyo e incansable ánimo.

Este trabajo ha recibido soporte financiero para la experimentación del proyecto europeo EuroBonet, número de contrato: 018814, del RETICS, ISCIII RD: 12-36-020 y de la Fundación del Instituto Valenciano de Oncología (FIVO).

ÍNDICE

<u>1.INTRODUCCIÓN</u>	15
1.1. PREÁMBULO	17
1.2. MODELOS EXPERIEMETALES EN SARCOMAS DE HUESO Y PARTES BLANDAS	18
1.2.1. Sarcoma de Ewing	19
1.2.1.1. Evolución histórica	19
1.2.1.2. Epidemiología	19
1.2.1.3. Macroscopía	19
1.2.1.4. Microscopía óptica	20
1.2.1.5. Inmunohistoquímica	21
1.2.1.6. Biología molecular	23
1.2.2. Osteosarcoma convencional	24
1.2.2.1. Epidemiología	24
1.2.2.2. Macroscopía	24
1.2.2.3. Microscopía óptica	25
1.2.2.4. Inmunohistoquímica	26
1.2.2.5. Biología molecular	27
1.2.3. Condrosarcoma	28
1.2.3.1. Epidemiología y clasificación	28
1.2.3.2. Macroscopía	30
1.2.3.3. Microscopía óptica	30
1.2.3.4. Inmunohistoquímica	31
1.2.3.5. Biología molecular	31
1.2.4. Sarcoma sinovial	32
1.2.4.1. Evolución histórica	32
1.2.4.2. Epidemiología	33
1.2.4.3. Macroscopía	33
1.2.4.4. Microscopía óptica	34
1.2.4.5. Inmunohistoquímica	35
1.2.4.6. Biología molecular	37
1.2.5. Tumor del estroma gastrointestinal (GIST)	38
1.2.5.1. Evolución histórica	38
1.2.5.2. Epidemiología	39
1.2.5.3. Macroscopía	39

1.2.5.4. Microscopía óptica	40
1.2.5.5. Inmunohistoquímica	42
1.2.5.6. Biología molecular	44
1.3. LOS MECANISMOS DE ANGIOGÉNESIS EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER	45
1.4. ROL DE LAS QUIMIOCINAS EN LAS NEOPLASIAS	46
1.5. QUIMIOCINAS ANGIOGÉNICAS Y ANGIOSTÁTICAS	49
1.5.1. CXCL1/2/3 y CXCR2	49
1.5.2. CXCL9/10 y CXCR3	51
1.6. XENOTRASPLANTES DE TUMORES HUMANOS EN RATONES NUDE	53
1.7. ANGIOGÉNESIS TUMORAL	54
1.7.1. Brote de angiogénesis o vascular sprouting	55
1.7.2. Angiogénesis intususceptiva	59
1.7.3. Células endoteliales progenitoras	60
1.7.4. Vessel co-option	61
1.7.5. Vascular mimicry	62
1.7.6. Linfangiogénesis	65
1.7.7. La angiogénesis como diana terapéutica	66
<u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	69
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	73
3.1. MUESTRAS ESTUDIADAS Y PLANTEAMIENTO DE LA EXPERIENCIA	75
3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	79
3.3. INMUNOHISTOQUIMIA	80
3.3.1. IHQ convencional	80
3.3.2. Evaluación de la IHQ convencional	83
3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta	84
3.3.4. Evaluación de la inmunofluorescencia indirecta	86
3.4. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	86
3.4.1. Aislamiento de ARN a partir de tejido en fresco	86
3.4.2. Cuantificación de la concentración de ARN mediante espectrofotometría	88

3.4.3. Testado de la integridad de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa	89
3.4.4. Transcripción inversa (RT-PCR) y cuantificación de expresión génica	90
3.4.5. PCR cuantitativa	92
3.4.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	99
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	104
<u>4. RESULTADOS</u>	105
4.1. SARCOMA DE EWING	107
4.1.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	108
4.1.2. Estudio inmunohistoquímico	112
4.1.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	112
4.1.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	119
4.1.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	128
4.1.3. Estudio de biología molecular	132
4.1.3.1. ELISA	132
4.1.3.2. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	133
4.2. OSTEOSARCOMA OSTEABLÁSTICO	139
4.2.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	139
4.2.2. Estudio inmunohistoquímico	141
4.2.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	142
4.2.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	148
4.2.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	156
4.2.3. Estudio de biología molecular	160
4.2.3.1. ELISA	160
4.2.3.2. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	161

4.3. CONDROSARCOMA GRADO 3	165
4.3.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	165
4.3.2. Estudio inmunohistoquímico	167
4.3.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	167
4.3.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	174
4.3.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	181
4.3.3. Estudio de biología molecular	186
4.3.3.1. ELISA	186
4.3.3.2. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	187
4.4. CONDROSARCOMA GRADO 2	193
4.4.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	194
4.4.2. Estudio inmunohistoquímico	196
4.4.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	196
4.4.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	201
4.4.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	210
4.4.3. Estudio de biología molecular	214
4.4.3.1. ELISA	214
4.4.3.2. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	215
4.5. SARCOMA SINOVIAL MONOFÁSICO FUSOCELULAR	221
4.5.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	221
4.5.2. Estudio inmunohistoquímico	223
4.5.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	223
4.5.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	229
4.5.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	237
4.5.3. Estudio de biología molecular	240

4.5.3.1. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	240
4.6. GIST	246
4.6.1. Cambios histológicos. Estudio morfológico	246
4.6.2. Estudio inmunohistoquímico	249
4.6.2.1. Expresión de quimiocinas (ligandos y receptores) con peroxidasa	249
4.6.2.2. Estudio inmunohistoquímico. Inmunofluorescencia indirecta	256
4.6.2.3. Factores relacionados con el crecimiento vascular y angiogénesis	264
4.6.3. Estudio de biología molecular	267
4.6.3.1. Matrices de baja densidad RT-qPCR de los genes relacionados con la angiogénesis	267
<u>5. DISCUSIÓN</u>	273
<u>6. CONCLUSIONES</u>	295
<u>7. ABREVIATURAS</u>	299
<u>8. BIBLIOGRAFÍA</u>	305

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PREÁMBULO

Los tumores óseos y de partes blandas son neoplasias que aunque no tienen una elevada incidencia, son neoplasias agresivas de crecimiento rápido, muchos de ellos aparecen en niños y adultos jóvenes y su pronóstico continúa siendo pobre o infausto en la mayoría de casos ^{1,2}. Por otro lado, estos tumores siguen siendo a día de hoy, un reto diagnóstico para los patólogos en nuestros laboratorios, ya que suelen ser tumores heterogéneos y/o muy indiferenciados, donde las técnicas inmunohistoquímicas pueden ser ambiguas y no concluyentes. Además, el hecho de que muchos de estos tumores aparezcan en el hueso, confunde al patólogo que se pregunta si realmente el material osteoide que observa en el tumor es producido por él, o sea tal vez hueso normal o reactivo infiltrado por la neoplasia ³.

Así mismo, han sido objeto de estudio por muchos grupos de trabajo tratando de explicar su etiopatogenia a través de estudios de biología molecular donde en muchos de ellos se ha descubierto alguna mutación o translocación específica que en muchos de nuestros casos en la práctica diaria, acaba siendo la prueba diagnóstica definitiva y concluyente ^{1,4,5}. En ocasiones incluso, estas mutaciones han sido de gran utilidad para utilizar dianas terapéuticas como es el caso concreto del GIST (tumor del estroma gastrointestinal) donde el imatinib mesilato (Glivec®) inhibe un receptor tirosin quinasa mutado actuando sobre la masa tumoral de forma específica ⁶. Por ello, se hace indispensable un estudio intensivo de su biología en busca de nuevas dianas terapéuticas, para mejorar la supervivencia, que es actualmente desfavorable en estadios II y III de la enfermedad y además la presencia de metástasis (estadio IV) se asocia a un pronóstico infausto en la mayoría de los casos ².

La angiogénesis tumoral ha sido estudiada por muchos grupos de trabajo tratando de hallar los factores moleculares que regulan este proceso y las posibles dianas terapéuticas que se pueden derivar para evitar el crecimiento y la expansión tumoral. Este fenómeno se ha visto relacionado con la aparición, desarrollo, invasión y metástasis tumorales ⁷.

En los últimos años, el papel del sistema inmune y los procesos inflamatorios también han sido objeto de numerosos estudios en algunos tumores ⁸⁻¹¹, pero no tanto en los tumores de partes blandas y hueso ¹². Se ha visto concretamente el

papel que juega los fenómenos inflamatorios a través de las quimiocinas que se expresan en el “microambiente tumoral” por las células inflamatorias y tumorales así como su implicación en el proceso de angiogénesis tumoral ¹³.

Dentro de toda la variedad de tumores de partes blandas y hueso, nos hemos centrado en el estudio del sarcoma de Ewing, condrosarcoma de alto grado, osteosarcoma osteoblástico, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y sarcoma sinovial monofásico fibroso. Todos ellos, tumores agresivos, de biología y comportamiento clínico variado, y que alguno de ellos ha sido objeto de estudio molecular en relación a los procesos de inflamación y angiogénesis ¹².

Lo que se propone en el presente estudio es analizar los cambios morfológicos, la expresión de CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10, y sus respectivos receptores relacionados directamente en los procesos de proliferación tumoral, angiogénesis y metástasis ¹³, y por último la expresión de genes relacionados en estos procesos en los primeros estadios de crecimiento neoplásico ⁷. Para ello, analizaremos el papel que desempeñan durante las primeras fases de crecimiento tumoral escogiendo un modelo mixto: sarcoma humano en crecimiento *in vivo* mediante xenoinjertos en ratones atímicos.

1.2. MODELOS EXPERIMENTALES EN SARCOMAS DE HUESO Y PARTES BLANDAS

La intención de este capítulo no es una revisión exhaustiva de cada tipo tumoral sino un pequeño resumen de los distintos tumores utilizados en los experimentos de angiogénesis en xenotrasplantes realizados por nuestro grupo, de las características morfológicas, inmunohistoquímicas y moleculares con una pequeña introducción histórica en algunos de ellos.

1.2.1. SARCOMA DE EWING

1.2.1.1. Evolución histórica

Ha habido una evolución importante en los conceptos y la histogénesis en relación al sarcoma de Ewing (ES) y el tumor neuroectodérmico primitivo (PNET)¹⁴⁻¹⁶.

En 1979, Askin y colaboradores describieron el “tumor de células pequeñas maligno de la región toraco-pulmonar” (tumor de Askin) que tenía características histológicas similares pero con un perfil clínico-patológico único¹⁴. Con la llegada de la inmunohistoquímica, citogenética, y las técnicas de genética molecular, es casi universalmente reconocido que estos tumores representan el espectro morfológico conocido como la familia del tumor ES/PNET^{15, 17, 18}.

1.2.1.2. Epidemiología

El ES/PNET es un tumor relativamente poco frecuente, es el 6-8% de los tumores óseos malignos primarios y es menos común que el mieloma, osteosarcoma y condrosarcoma. Es el segundo sarcoma más frecuente de hueso y partes blandas en niños².

La mayoría de los pacientes con ES/PNET son adolescentes o adultos jóvenes, teniendo la mayoría menos de 30 años de edad. Hay una cierta predilección por varones en una proporción de 1.4 a 1, y la enfermedad es muy poco común en negros^{2, 5, 19}. No hay pruebas de una predisposición familiar o una asociación con factores medioambientales.

1.2.1.3. Macroscopía

El tumor en hueso y partes blandas es grisáceo y frecuentemente presenta áreas hemorrágicas y necróticas. El tejido semifluido amarillento y necrótico obtenido intramedularmente o de una lesión subperiostal en una biopsia abierta podría ser

interpretado erróneamente como pus por los cirujanos. Algunos tumores de partes blandas se encuentran asociados a grandes nervios periféricos.



Figura 1.1. Imagen macroscópica de ES óseo, destruyendo la capa cortical ósea.

1.2.1.4. Microscopía óptica

La imagen histológica característica del ES típico consiste en células redondas llamativamente uniformes que se disponen agrupadas en un patrón lobular. Cada célula individual tiene un núcleo redondo u ovalado de 10-15 μm de diámetro, con una membrana nuclear nítida, cromatina finamente pulverulenta y uno o dos nucléolos pequeños o inaparentes. No existen células gigantes multinucleadas. El citoplasma es escaso, pálido y mal definido y, en muchos casos, muestra una vacuolización irregular debido a depósitos intranucleares de glucógeno. Este glucógeno intracelular se encuentra en la mayoría de los casos, pero su cantidad es muy variable de un tumor a otro y a veces entre distintas partes de un mismo tumor. Además las gotitas de glucógeno pueden comprimir y provocar marcas en el núcleo. El número de mitosis es variable, y en muchos casos su escasez contrasta con el aspecto inmaduro de las células neoplásicas ^{5, 15, 19-22}.

En algunos tumores, las células muestran núcleos de tamaño algo mayor con frecuentes nucléolos prominentes, características que definen al ES atípico o de "células grandes" ^{19, 20, 22, 23}.

El PNET típico, que representa alrededor del 15% de los casos, está formado por sábanas o lóbulos de células redondas, pequeñas, con núcleos redondos u ovalados muy teñidos. El citoplasma está muy poco definido salvo en las áreas de células más maduras y las extensiones citoplasmáticas alargadas de tipo vellosa

confluyen para formar rosetas. Algunos raros ES/PNET pueden mostrar signos de diferenciación cartilaginosa u ósea ^{5, 19, 24}.

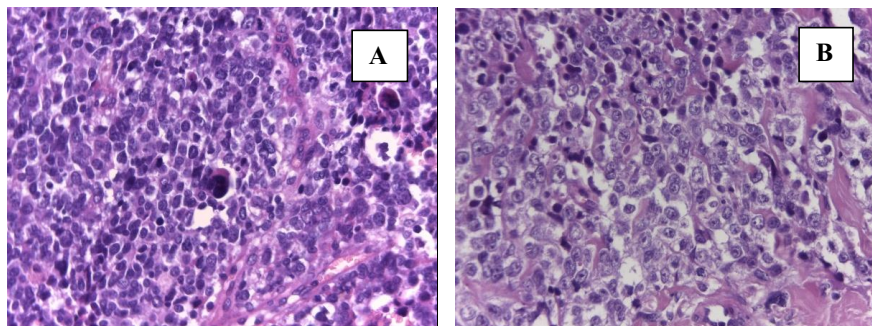


Figura 1.2. Histopatología clásica del ES, 200X(A) y 400X(B). H&E.

1.2.1.5. Inmunohistoquímica

Durante muchos años, el diagnóstico de ES/PNET era esencialmente un diagnóstico de exclusión desde el punto de vista inmunohistoquímico. Sin embargo, desde principios de los años noventa, numerosos estudios han confirmado la utilidad del producto del gen *MIC2* (antígeno HBA71, glucoproteína p30/32 o CD99) en el reconocimiento de este grupo de tumores, confirmando la gran sensibilidad de este marcador en la familia ES/PNET ^{5, 19, 25}. El *MIC2* es un gen pseudoautosómico localizado en los brazos cortos de los cromosomas sexuales; su producto es una glucoproteína de membrana (CD99) que puede detectarse con técnicas inmunohistoquímicas utilizando distintos anticuerpos como son 12E7 y O13. Aunque en un principio se creyó que era muy específica de la familia ES/PNET, se ha demostrado que la práctica totalidad de los demás tumores de células redondas que entran en el diagnóstico diferencial, entre ellos los linfomas y sobre todo el linfoma linfoblástico T ²⁶ y el linfoma linfoblástico de precursores B ²⁷, el carcinoma de células de Merkel ²⁸, el carcinoma de células pequeñas ²⁹, el rhabdomyosarcoma 197, el osteosarcoma de células pequeñas ³, el tumor desmoplásico de células redondas ³⁰, y el condrosarcoma mesenquimal ³¹ pueden mostrar a veces inmunorreactividad de membrana para CD99. Por tanto, aunque las técnicas inmunohistoquímicas para CD99 son muy sensibles en el reconocimiento de la familia tumoral ES/PNET, este marcador debe usarse siempre dentro de una batería de técnicas ya que su especificidad no es

completa. Teniendo en cuenta la rareza de la negatividad del CD99 en los ES/PNET, los casos sospechosos deben confirmarse con técnicas de biología molecular antes de establecer un diagnóstico definitivo³².

Muchos ES/PNET se tiñen también con marcadores neurales, entre ellos la enolasa neuronal específica, Leu-7, la proteína S-100, la sinaptofisina y PGP9.5³³. Aunque los PNET tienden a expresar uno o varios de estos marcadores neurales con mayor frecuencia que el ES típico, la superposición es importante. No tenemos que olvidar que en muchos de los casos publicados la expresión inmunohistoquímica de los marcadores neurales es sólo uno de los criterios para diferenciar los casos de ES típico de los de PNET, lo que vuelve a la conclusión anterior. Además, no se ha demostrado que la magnitud de la inmunoexpresión de estos antígenos neurales esté relacionada con un tipo específico de fusión del gen *EWS*³⁴. Es típico que las células tipo “adamantinoma” expresen con intensidad AE1/AE3 e incluso pueden teñirse con anticuerpos frente a las citoqueratinas de alto peso molecular¹⁹, lo que probablemente se debe a la diferenciación epitelial compleja de esta variante^{32, 35}.

Como se describe con detalle más adelante, *FLI1*, un miembro de la familia ETS de factores de transcripción de unión al ADN, interviene en la traslocación t(11;22) frecuente en el ES/PNET. Se han desarrollado anticuerpos policlonales frente a la proteína FLI1, y se ha encontrado positividad nuclear frente a ella en el 71% al 84% de los casos de ES/PNET^{36, 37}. Aunque no es tampoco específico de este tumor^{4, 36-38}.

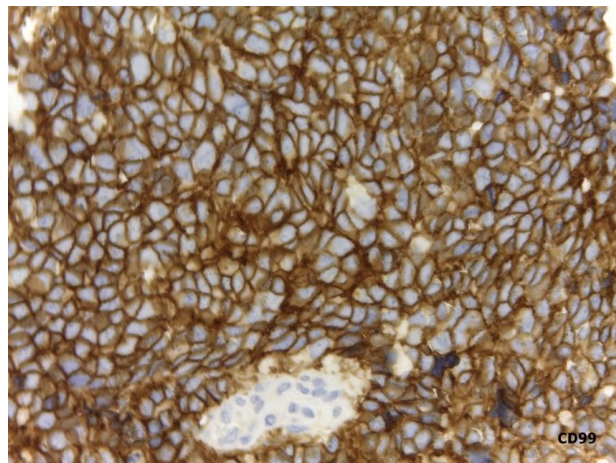


Figura 1.3. Tinción inmunohistoquímica membranosa de CD99 típica en ES, 200X.

1.2.1.6. Biología molecular

Estos tumores se caracterizan por presentar una anomalía citogenética común a todos ellos, $t(11;22(q24;q12))$ ^{39, 40} en el que está implicado el gen *EWSR1* en el locus 22q12 en casi todos los ES/PNET^{16, 23, 32, 41}. Aunque en la actualidad se han descrito otras translocaciones que implican el gen *EWSR1* con otras regiones cromosómicas, incluso se ha visto que algunos pocos ES atípicos tampoco incluyen la translocación de *EWSR1*^{16, 42}.

Con relación a los genes de fusión, inicialmente se pensó que la fusión tipo I (*EWSR1/FLI1*) parecía estar asociada con buen pronóstico⁴³, aunque actualmente se ha confirmado que el tipo de fusión no tiene significado pronóstico^{16, 44}. Recientemente los estudios de hibridación genómica comparativa (CGH) y MLPA realizados por los grupos de De Alava así como Alonso y cols, han demostrado la presencia de anomalías cromosómicas con impacto pronóstico en los ES/PNET entre las que se encuentran las ganancias del 1q, 8q y 20, así como la pérdida de 16q^{45, 46}. Particularmente la ganancia del 1q y la sobreexpresión del gen *CDT2* se detectó en el 31% de los casos estudiados por Mackintosh y cols.⁴⁶, demostrándose que esta alteración genética estaba asociada con recaídas, peor supervivencia global y alta expresión de Ki67.

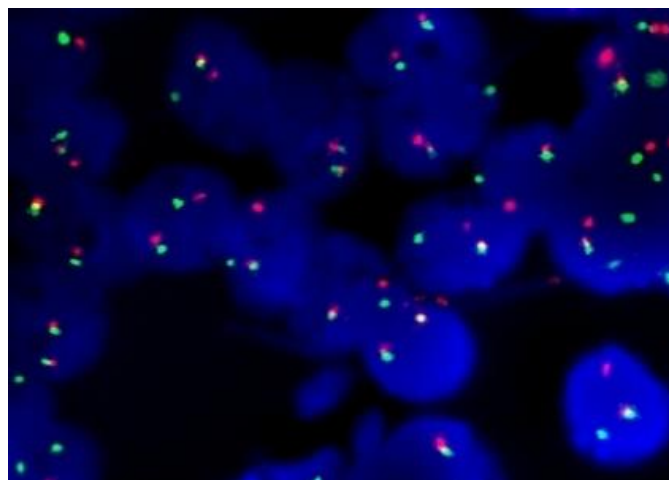


Figura 1.4. Presencia del reordenamiento del gen *EWSR1* en el estudio por FISH de un ES.

1.2.2. OSTEOSARCOMA CONVENCIONAL

1.2.2.1. Epidemiología

Es el tumor maligno primario de hueso, no hematopoyético más común. La incidencia estimada es de 4-5 por millón de habitantes. No parece tener ninguna predilección por ninguna raza. El OS es una neoplasia de gente joven⁴⁷. Más frecuentemente aparece en la segunda década de la vida, ya que un 60% de los pacientes son menores de 25 años. Aunque un 30% de los pacientes aparecen en mayores de 40 años de edad^{48, 49}. El OS convencional afecta más a hombres que mujeres en una proporción de 3:2. Esta selección en el género es todavía más acusada en pacientes menores de 20 años y tiende a ser menos dramática al aumentar la edad^{2, 3, 50}.

Suele afectar a huesos largos del esqueleto apendicular, en particular el fémur distal, tibia proximal, y húmero proximal. Tiende a ser una enfermedad de las metafisis (91%) o diáfisis (<9%). La afectación primaria de la epífisis es extraordinariamente rara⁵¹. Aunque los huesos largos son la localización más frecuente, la incidencia relativa de los huesos no largos, como mandíbula, pelvis, vértebras y cráneo suele aumentar con la edad. Los OS en partes acras es extremadamente inusual^{52, 53}.

1.2.2.2. Macroscopía

El OS es frecuentemente un tumor grande (> 5 cm), metafisario, carnoso o duro que puede contener cartilago. Frecuentemente traspasa la corteza y se asocia con una masa de tejido blando. Algunos OS osteoblásticos suelen ser grisáceos y aleatoriamente granulares (como piedra pómez), mientras que otros son más densos, esclerosados y blanquecino-amarillentos. Los OS condroblásticos suelen ser de blancos a pardos, poseen una calcificación variable con una superficie de corte en carne de pescado o como cuerda⁵².



Figura 1.5. Aspecto macroscópico de un osteosarcoma en la diáfisis femoral.

1.2.2.3. Microscopía óptica

Es un tumor que suele ser altamente anaplásico y pleomórfico donde las células tumorales pueden ser: epitelioides, plasmocitoides, fusiformes, ovoides, células pequeñas redondas, células claras, células gigantes mono o multinucleadas o células fusiformes. La mayoría de casos están constituidos por mezclas de dos o más de estos tipos celulares. Para el diagnóstico de OS es preciso la precisa identificación de osteoide. Histológicamente, el osteoide es un material denso, rosado, amorfo y extracelular. Debe ser distinguido de otros materiales eosinofílicos extracelulares como la fibrina y amiloide. La diferenciación entre osteoide y colágeno no óseo es difícil y a veces arbitraria. El colágeno no óseo tiende a ser lineal, fibrilar y comprimido entre células neoplásicas. Por el contrario, el osteoide es curvilíneo con pequeñas protuberancias, arborización y lo que parece ser formaciones de lagunas abortivas. El grosor del osteoide es muy variable donde el más fino se denomina osteoide en filigrana.

La matriz ósea tiene también una predisposición por depositarse sobre trabéculas óseas normales preexistentes. Cuando las células neoplásicas se confinan con grandes cantidades de matriz ósea, aparecen como pequeñas, picnóticas, con mínima atipia. Una característica arquitectural apreciada es la tendencia de los OS convencionales de crecer en un patrón angiocéntrico.

Pueden también producir gran cantidad de cartílago y/o tejido fibroso. Muchos investigadores subdividen el OS convencional según la matriz predominante⁵⁴⁻⁵⁷.

El algoritmo es: identificar la presencia o no de matriz, si es significativa la matriz presente, y determinar la forma. Este sistema divide al OS convencional en tres subtipos: OS osteoblástico (50%), condroblástico (25%) y fibroblástico (25%). La clasificación está en función del tumor primario y no tiene ningún valor pronóstico ^{2, 3, 55, 57, 58}.

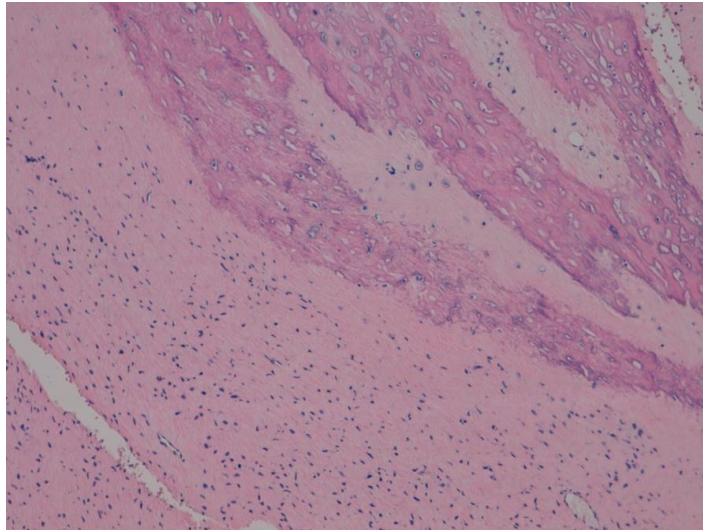


Figura 1.6. Histopatología de un osteosarcoma osteoblástico (HE)(100X).

1.2.2.4. Inmunohistoquímica

La ausencia de pruebas reproducibles de hallazgos específicos minimiza el uso de la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica en el OS ⁵⁹⁻⁶⁴. En ambos casos su utilidad yace en su habilidad para excluir otras posibilidades diagnósticas tales como el carcinoma sarcomatoide metastásico y el SS. El OS puede ser inmunorreactivo para citoqueratina y es frecuente que sea positivo para actina de músculo liso. Habitualmente tiene una tinción difusa de moderada a fuerte intracitoplasmática para CD99. La osteocalcina y osteonectina se han usado a veces para detectar osteoide ^{3, 57, 65, 66}.

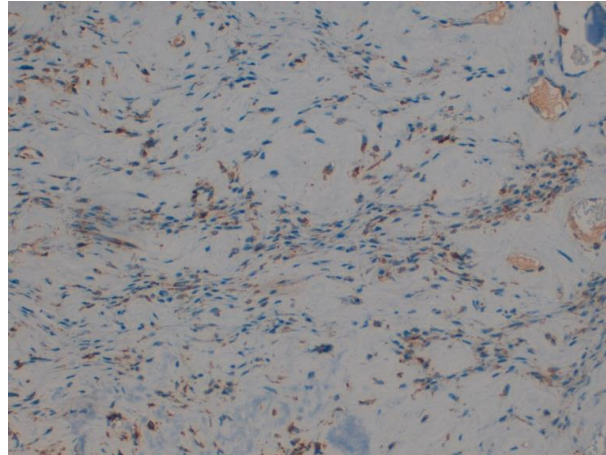


Figura 1.7. Tinción inmunohistoquímica con peroxidasa de osteonectina (200X).

1.2.2.5. *Biología molecular*

La mayoría de OS poseen aberraciones cromosómicas clonales. Las alteraciones son complejas, conteniendo gran cantidad de alteraciones numéricas y estructurales⁶⁷⁻⁷⁰. Aunque no se observa una traslocación específica en los OS convencionales, se ha visto que ciertas regiones cromosómicas están involucradas de manera repetida^{68, 71}, pero en general presentan cariotipos complejos y una gran inestabilidad genética¹⁶.

Algunos de los últimos trabajos con miRNA se ha mostrado que las rutas de señalización PI3K/PTEN/Akt y TGF β están involucradas en el proceso de tumorigénesis del osteosarcoma⁷².

Hay dos genes supresores bien conocidos que se han visto alterados en el OS, *TP53* en el brazo cromosómico 17p y *RB1* situado en 13q⁷³.

El gen *TP 53* está mutado en el 22% de los OS centrales de alto grado⁷⁴, pero la presencia de dicha mutación no se asocia con el pronóstico clínico, como en otro tipo de tumores. Se ha publicado que las mutaciones *TP53* se correlacionan con un aumento de la inestabilidad genómica del OS⁷⁵. La amplificación de *MDM2* participa en la misma ruta que p53. *MDM2* codifica una proteína ligasa específica E3 para p53, dirigiendo la p53 hacia la degradación proteosómica. La frecuencia

en la amplificación de *MDM2* en los OS centrales de alto grado es aproximadamente del 6% y es mutuamente excluyente de la mutación en *TP53*⁷⁵. Checkpoint kinase 2 (*CHK2*) es necesaria para bloquear el ciclo celular en respuesta al ADN dañado, y se activa por fosforilación mediada por ATM. *CHK2* se mostró mutado en 4 de 57 osteosarcomas⁷⁶.

La delección del gen *CDKN2A* tiene cierto valor pronóstico desde que se ha visto que los pacientes con esta alteración tienen un pronóstico muy pobre^{77,78}.

Algunos estudios han tratado del papel que juegan las enzimas telomerasas en los OS, más concretamente las enzimas TERT y ALT. Esta última está más frecuentemente expresada en OS que en otros tipos tumorales^{79,80}.

Recientemente también se ha publicado un trabajo donde la ruta de señalización de IR/IGF1R se presenta como una posible diana terapéutica *in vitro* en los OS de alto grado⁸¹.

1.2.3. CONDROSARCOMA

1.2.3.1. Epidemiología y clasificación

El condrosarcoma (Ch) es el tercer tumor maligno primario de hueso más frecuente, por detrás del mieloma y el osteosarcoma. Se trata de un tumor maligno de tejido que produce cartílago y se divide en dos grandes grupos según criterios microscópicos: Ch convencional (el más común) y variantes de Ch. Cada uno de estos grupos comprende distintos tipos, unos definidos según características microscópicas y otros según localización dentro del hueso afecto^{2,82}.

La mayoría de los pacientes con Ch convencional tienen entre 30 y 60 años de edad. El Ch en la infancia es raro ^{83, 84} y tiende a estar localizado más frecuentemente en las extremidades que en la edad adulta ⁸⁵. Aunque cualquier parte del esqueleto puede estar implicada, el hombro y la pelvis son los sitios afectados más frecuentes. Los Chs se dividen según la localización en central, periférico, y yuxtacortical (periostal) ⁸⁶.

1. Ch central: está localizado en la cavidad medular, normalmente de un hueso largo o plano ⁸⁷. Los huesos pélvicos, costillas (normalmente en la unión costochondral) y la articulación del hombro son las localizaciones más comunes. Los Chs de los huesos de manos y pies son excepcionales ⁸⁸⁻⁹². Los Chs pueden afectar también los huesos craneales, especialmente el hueso temporal y la base del cráneo, donde el diagnóstico diferencial incluye el cordoma, meningioma y tumor glómico de la yugular ^{93, 94}.
2. Ch periférico: puede crecer de novo o desde la capa cartilaginosa de un osteocondroma preexistente. Pacientes con osteocondromatosis son particularmente propensos a esta complicación ⁹⁵. El riesgo de una transformación maligna a partir de un osteocondroma solitario se cree que es de entre 1-2%. Los signos de malignidad de un osteocondroma incluye aumento del crecimiento durante la adolescencia en un diámetro mayor de 8 cm, y un grosor del casquete cartilaginoso irregular y mayor de 3 cm.
3. Ch yuxtacortical (periostal): afecta a los extremos de los huesos largos (el fémur más frecuente) y se caracteriza por un patrón lobular cartilaginoso con áreas de calcificación salpicada y osificación endocondral ⁹⁶. Este tumor está estrechamente relacionado con la entidad denominada como OS periostal. No obstante, varias diferencias menores en la localización, grado microscópico y comportamiento entre los dos han sido descritos ⁹⁷.

1.2.3.2. *Macroscopía*

Los Chs poseen una coloración azul claro o blanco nacarado. Pueden observarse áreas de calcificación a modo de piqueteado blanquecino. Cuando el Ch es muy mixoide, la matriz puede licuarse y rezumar cuando el tumor es seccionado. En ocasiones también puede visualizarse pequeños formaciones quísticas⁹⁸.

1.2.3.3. *Microscopía óptica*

Microscópicamente, los Chs convencionales de tipo central, periférico o yuxtacortical muestran un amplio espectro de diferenciación, el denominador común siendo la producción de matriz cartilaginosa y la ausencia de formación directa de hueso por las células tumorales. Este rango de diferenciación es la base para la gradación de estos tumores en bien, moderadamente y pobremente diferenciado². El diagnóstico diferencial entre un Ch bien diferenciado y un condroma yace en una combinación de hallazgos radiológicos, citológicos y arquitecturales⁹⁹. En un Ch bien diferenciado, los núcleos son grandes e hiperromáticos; puede haber dos o más núcleos por célula y dos o más células por laguna. Mirra et al.⁵⁰ han dado énfasis a la permeación de la médula ósea con atrapamiento de hueso laminar sano por todos los lados de un Ch bien diferenciado como un signo importante en el diagnóstico diferencial con el condroma. Tanto las anomalías arquitecturales como nucleares del Ch se ven con frecuencia mejor en el margen de expansión del tumor. La correlación de los hallazgos microscópicos con la clínica y especialmente los radiológicos es esencial. Los tumores grandes de huesos largos o costillas o aquellos que empiezan a crecer rápidamente en la adolescencia y alcanzan un tamaño de 8 cm o más son casi con seguridad malignos¹⁰⁰. Grados mínimos de atipia en las células cartilaginosas bajo estas circunstancias justifican el diagnóstico de Ch, mientras que cambios atípicos mayores o parecidos en tumores cartilaginosos de manos y pies, osteocondromas, osteocondromatosis sinovial y neoplasias de partes blandas son mucho menos significativas^{50,88}.

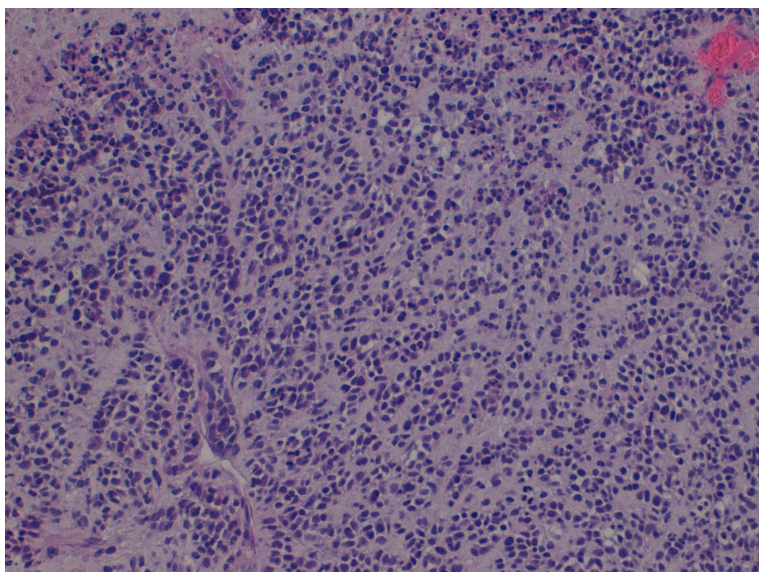


Figura 1.8. Histopatología de un condrosarcoma de alto grado (200x).H&E

1.2.3.4. Inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímicamente, los Ch bien diferenciados tienen una expresión similar a la del cartílago maduro, mientras que los pobremente diferenciados se asemejan al cartílago fetal ¹⁰¹.

Inmunohistoquímicamente, de manera significativa se encuentra reactividad para la proteína S-100 ^{102, 103}.

1.2.3.5. Biología molecular

Citogenéticamente, se ha detectado amplificación del oncogen *c-myc* y expresión de Her2/neu, c-Fos y los genes *c-jun* y el oncogen *c-erbB-2* ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. La sobreexpresión de p53 se limita a los de alto grado (tipos pobremente diferenciados) ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. De hecho en este tipo de tumores con mutación de *TP53* se ha visto que la familia de quinasas *Src* y más concretamente el gen *Fyn*

constituye una potencial diana terapéutica para los condrosarcomas metastásicos irresecables ^{110, 111}.

Por otro lado, se ha visto que las mutaciones en los genes de la familia *IDH* están más presentes en los Chs centrales que en los periféricos ^{16, 112}. También se han visto implicados genes de la ruta de señalización pRb ¹¹³; IHH/PTHLH/Bcl-2 ¹⁶; Src, Akt, y PDGFR sin efectividad de imatinib ^{111, 114}; IGF ¹¹⁵; y señales de estimulación estrogénica ¹¹⁶, hipóxicas ¹¹⁷ y glicolíticas ¹¹⁸, todas ellas implicadas con la aparición de los condrosarcomas. Algunos trabajos también han hablado de los genes *MDM2*, *SETD2*, *KDM6A*, *NF2*, *SF3B1*, *TETS2*, *DNMT3A* y *TSC1*, y la mutación del gen *COL2A1* en la aparición de Chs ^{16, 119}.

Recientemente se ha demostrado quimiorresistencia en los Chs con sobreexpresión de los miembros de la familia Bcl-2 ¹²⁰.

1.2.4. SARCOMA SINOVIAL

1.2.4.1. Evolución histórica

En las primeras descripciones se apuntó su similitud histológica con la sinovial en desarrollo, pero no existen pruebas de que este tumor se origine a partir de la sinovial ni de que se diferencie en este sentido. En 1927, Smith utilizó el término de *sinovioma* ¹²¹, aunque el término SS continúe siendo el preferido, algunos autores han propuesto que se cambie el nombre por el de carcinosarcoma o

incluso por el de carcinoma de células fusiformes de los tejidos blandos, un término que se ajusta con mayor precisión a la esencia de la lesión ¹²².

1.2.4.2. *Epidemiología*

El SS representa entre el 5%-10% de todos los sarcomas de los tejidos blandos ^{123 124}.

El SS es más frecuente en los adolescentes y adultos jóvenes de 15 a 40 años de edad, aunque con un rango que oscila desde los 6 y 82 años, con una edad media de 34 años ^{125 126-128 129}. El SS es más frecuente en varones que en mujeres, con una relación media varón/mujer de 1,2:1. No parece tener predilección por una raza concreta ^{2, 125, 127}.

Son más frecuentes en las extremidades, donde tienden a encontrarse en la vecindad de las grandes articulaciones, sobre todo en la región de la rodilla. Guardan una íntima relación con tendones, vainas tendinosas y estructuras de bolsas articulares, en general inmediatamente en los límites de la cápsula articular. Los SSs intrarticulares representan menos del 5% de todos los casos ¹³⁰. Tras las extremidades, la segunda localización en frecuencia de los SSs es la región de la cabeza y el cuello, donde se encuentran entre el 5%-10% de todos los casos. Alrededor del 5% se originan en el tronco, incluidas las paredes torácica y abdominal ¹³¹.

Estos tumores, cuando aparecen en localizaciones raras, suele ser necesario confirmar el diagnóstico con técnicas de biología molecular ¹³²⁻¹³⁵.

1.2.4.3. *Macroscopía*

Las lesiones de crecimiento lento tienden a ser redondeadas o multilobuladas y a estar muy bien delimitadas; la compresión de los tejidos adyacentes que produce el crecimiento del tumor hace que este se encuentre recubierto de manera total o parcial por una pseudocápsula brillante. La formación de quistes puede ser una

característica llamativa, y algunos casos muestran masas multiquísticas ¹³⁶. A la palpación son blandos o duros dependiendo de la cantidad de colágeno que contengan. Al corte son de color amarillento o blanco-grisáceo. Pueden alcanzar un tamaño de 15 cm o incluso más, pero la mayoría miden entre 3 y 6 cm en el momento de la intervención. Las calcificaciones son frecuentes pero pocas veces se ven a simple vista. Los SSs menos diferenciados y de crecimiento más rápido tienden a estar mal delimitados y suelen mostrar un aspecto muy abigarrado a menudo friable y deshilachado, con múltiples áreas de hemorragia, necrosis y formación de quistes ^{136, 137}.

1.2.4.4. Microscopía óptica

Estos tumores están formados por dos tipos de células de distinta morfología: células epiteliales, similares a las del carcinoma, y células fusiformes a las que a veces se les llama de manera incorrecta células estromales, parecidas a las del fibrosarcoma. Las formas transicionales entre las células epiteliales y fusiformes apuntan a una clara relación entre ellas, hecho que apoyan los cultivos de tejido y los estudios ultraestructurales, inmunohistoquímicos y de genética molecular ^{132, 138}. Dependiendo de la proporción de estos dos componentes celulares del grado de diferenciación, los SSs forman un espectro morfológico continuo y pueden clasificarse de manera general en a) tipo bifásico, con componentes epitelial y fusiforme claros, en proporciones diversas; b) tipo monofásico fibroso; c) tipo monofásico epitelial, raro; y d) tipo poco diferenciado (de células redondas) ². Describiremos tan sólo el tipo monofásico fibroso que utilizamos en nuestra experiencia.

SS monofásico fibroso: es una neplasia relativamente frecuente, cuya existencia se confirma por la positividad de algunas o de la mayoría de las células fusiformes con las técnicas inmunohistoquímicas para antígenos epiteliales, por las características ultraestructurales que revelan diferenciación epitelial y porque las anomalías de genética molecular y citogenéticas son idénticas a las que se encuentran en el tipo bifásico, del que sólo representa una forma extrema en su espectro morfológico, las características morfológicas antes mencionadas de la porción fusocelular del tipo bifásico, tales como el aspecto de las células, la

hialinización, la transformación mixoide, el infiltrado por mastocitos, la vascularización de tipo hemangiopericitoma y las calcificaciones focales son idénticas en el tipo monofásico fibroso ².

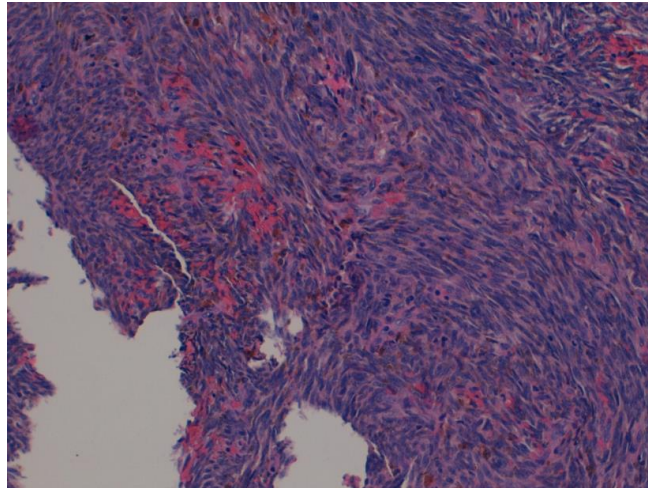


Figura 1.9. Histopatología característica de un SS bifásico (200x).H&E

1.2.4.5. Inmunohistoquímica

La mayoría de SSs son positivos para queratinas (citoqueratina 8/18, citoqueratina-7/14/19 y antígeno epitelial de membrana (EMA) ¹³⁸. Este último anticuerpo es el único marcador epitelial positivo incluso en los sarcomas sinoviales monofásicos fibrosos ^{139, 140}. En general, la intensidad de la tinción es mayor en el componente epitelial que en el fusiforme. En algunos tumores de tipo monofásico fibroso, la expresión de estos antígenos se limita a algunas células aisladas, lo que obliga a teñir y estudiar múltiples cortes de distintas partes del tumor ^{132, 141-145}. CD99, el producto del gen *MIC2*, puede detectarse con inmunohistoquímica en el citoplasma o en la membrana celular del 60%-70% de los SSs ^{132, 145, 146}. La proteína BCL2 se expresa de manera difusa en la práctica totalidad de los SSs, sobre todo en las células fusiformes ¹⁴⁷, pero su valor para el diagnóstico es limitado ya que otros tumores también lo expresan. A diferencia de otros tumores de células fusiformes, el SS es negativo para CD34, con muy raras excepciones.

Otros marcadores expresados por este tumor son vimentina, CEA, calponina, HBME-1, MAGE-CT, ocasionalmente S-100 y de manera focal para calretinina (pero no para WT-1) ^{139, 148-150}.

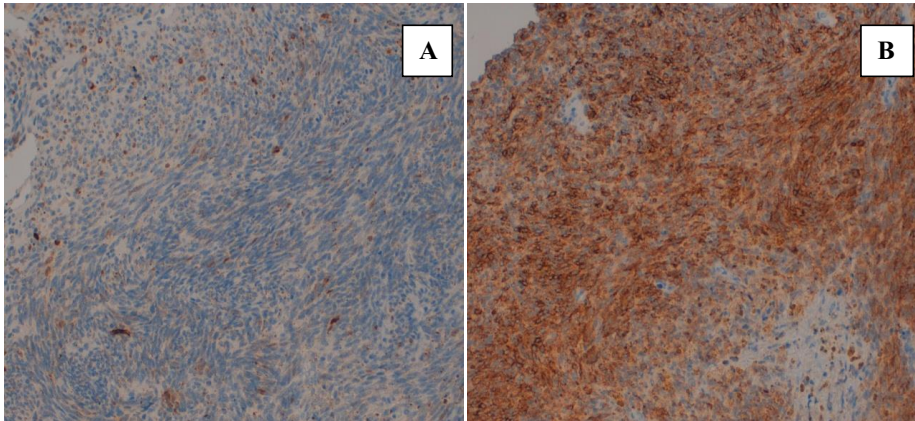


Figura 1.10. Tinción inmunohistoquímica de citoqueratina (AE1/AE3) (200x) en un SS(A). Tinción inmunohistoquímica de EMA (200x) en un SS (B).

Se ha descrito que el TLE1 también puede ser un marcador útil para el diagnóstico del SS que permite distinguir el SS de los demás sarcomas ¹⁵¹.

Recientemente se han descrito expresión de proteínas relacionadas con los fenómenos de transición epitelial-mesenquimal como E-cadherina, N-cadherina, β -catenina, TGF- β 1, snail y slug. Estas proteínas muestran un perfil de expresión diferente entre SS bifásicos y monofásicos. Además los niveles de expresión de snail se correlacionan parece ser con el estadio pTNM ¹⁵².

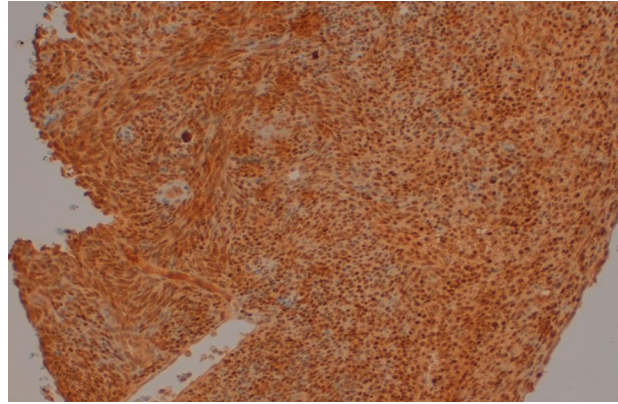


Figura 1.11. Tinción inmunohistoquímica con peroxidasa de TLE-1(200X) en un SS.

1.2.4.6. *Biología molecular*

La prueba diagnóstica gold estándar en el SS es la traslocación específica (X;18)(p11.2;q11.2)^{125, 153, 154}. Esta translocación se encuentra en más del 90% de los SSs¹⁵⁵. Las fusiones SYT-SSX no se encuentran presentes en otros sarcomas¹³⁸. Para determinar si el gen de fusión SYT-SSX asociado con la traslocación t(X;18) está presente, podremos utilizar el FISH (fluorescence in situ hybridization) en tejidos incluidos en parafina¹⁵⁶ o RT-PCR¹⁵⁷. Aunque el factor de transcripción SYT-SSX se detecta casi siempre en este tipo de tumores, el recíproco SSX-SYT no se detecta¹⁵⁸. A pesar de todo, los análisis retrospectivos han encontrado que el factor pronóstico más importante en los pacientes es el grado histológico y no el tipo de fusión SYT-SSX^{159, 160}.

Vacunas del péptido de unión SYT-SSX se han testado en estudios piloto¹⁶¹ y se ha presentado como diana terapéutica recientemente¹⁶². Por otro lado, algunos estudios han demostrado que el ácido retinoico y derivados pueden inducir la diferenciación de las líneas celulares e inhibir el crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁶³.

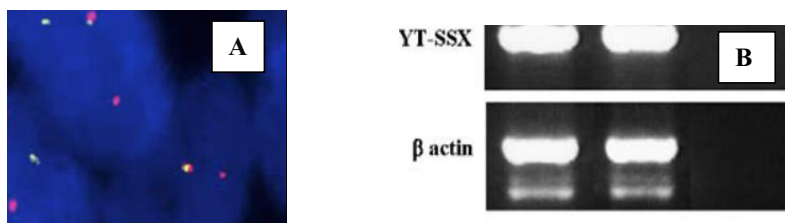


Figura 1.12. Prueba de break-apart SYT FISH mostrando un par de señales colocalizadas roja y verde, indicando que un gen intacto *SYT* y el otro par de señales roja y verde separadas indicando disrupción de *SYT* en células de SS (A). RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction) from SS muestra una banda en 396bp indicando la presencia de la fusión representando el gen quimérico fusionado *SYT-SSX* (B).

1.2.5. TUMOR DEL ESTROMA GASTROINTESTINAL (GIST)

1.2.5.1. Evolución histórica

Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) se originan en la pared del tubo digestivo y recapitulan el fenotipo de la célula intersticial de Cajal, es decir la célula marcapasos gastrointestinal del plexo de Auerbach responsable de la producción de la onda peristáltica lenta ¹⁶⁴. Un pequeño número de GIST proceden de los tejidos blandos del mesenterio y del retroperitoneo, por definición estos tumores no tienen conexión, ni siquiera tenue, con la pared ni con la superficie serosa de las vísceras.

Los GIST fueron descritos por primera vez por Stout ¹⁶⁵ como “leiomioblastomas” en la creencia de que eran tumores primitivos del músculo liso. Posteriormente, Appleman y Helwig ¹⁶⁶ consideraron que estos tumores eran variantes de tumores de músculo liso y utilizaron los términos “leiomioma epiteliode” y “leiomiosarcoma epiteliode”. En 1983 tuvo lugar un cambio importante en la nomenclatura cuando Mazur y Clark ¹⁶⁷ demostraron la ausencia de marcadores musculares en la mayoría de estas lesiones y el hallazgo inesperado de marcadores neurales detectados con técnicas inmunohistoquímicas. Estos autores defendieron que estas lesiones presentaban líneas de diferenciación que reflejaban los diferentes elementos de la pared gastrointestinal (músculo y nervios autónomos), y propusieron el término unificador de “tumor estromal”, que luego se

modificó pasando a “tumor del estroma gastrointestinal”, para garantizar su distinción de los tumores del estroma de otros órganos.

En 1998, el trabajo de Hirota y cols.¹⁶⁴ cambió de forma radical la concepción del GIST. A partir de la observación de que para el desarrollo normal de las células intersticiales de Cajal era necesaria no solo la expresión del protooncogén *c-KIT*, un receptor de tirosina quinasa de tipo III, sino la presencia de mutaciones génicas en *KIT* que conducían a la activación constitutiva de estos receptores¹⁶⁴, lo que permitió establecer una definición estricta de estos tumores en la que se exigía la expresión de *KIT* (CD117)^{6, 168}.

1.2.5.2. Epidemiología

En EEUU se diagnostican hasta 6000 nuevos casos cada año¹⁶⁹, lo que en gran parte se debe a un reconocimiento y un diagnóstico más exactos. Se observa una incidencia creciente en el GIST desde la incorporación de la inmunohistoquímica¹⁷⁰.

Los GIST se han descrito en la tríada de Carney (tumores múltiples del estroma gástrico, condroma pulmonar y paraganglioma)^{171, 172}, la neurofibromatosis 1^{173, 174} y en las familias con mutaciones de *KIT* en la línea germinal¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

1.2.5.3. Macroscopía

La mayoría protuyen a la luz desde la superficie externa como las lesiones exofíticas subserosas. Normalmente son tumores bien delimitados, nodulares con

pseudocápsula. Gran parte de ellos son masas duras, carnosas, de color rojo-grisáceo, consistencia blanda, y sin el aspecto arremolinado. Los tumores de gran tamaño sufren degeneración quística, hemorragias, infartos o necrosis amplias. A parte de la invasión franca de órganos adyacentes, la única característica macroscópica que sugiere malignidad es el tamaño tumoral; las metástasis son raras en GIST menores de 5 cm pero ocurren en tumores mayores de 10 cm ².
166, 178, 179{Appleman, 1976 #316



Figura 1.13. Aspecto macroscópico de un SS.

1.2.5.4. Microscopía óptica

Se observan dos tipos de patrones fundamentalmente: epiteliode y fusiforme. En cada tumor suele predominar uno de estos patrones, pero en alrededor del 10% de los casos ambos casos coexisten en proporciones aproximadamente iguales¹⁷⁴:

- GIST con patrón fusiforme: están formados por grupos de células elongadas, uniformes, dispuestas en fascículos cortos o paralelos u ondulados. Las células poseen citoplasma pálido, eosinófilo, semejando células musculares lisas. Tiene tendencia fibrilar y márgenes imprecisos que le confieren aspecto sincitial. El núcleo oval, elongado, tiene cromatina laxa y nucléolo poco prominente. Existen frecuentes vacuolas paranucleares. Hay tendencia a la formación de empalizadas nucleares que los confunden con cuerpos de Verocay vistos en los schwannomas ¹⁸⁰.

El componente estromal varía, siendo generalmente escaso, si bien pueden haber áreas hialinas y focos mixoides ¹⁸¹. La vascularización capilar es fina. Hay frecuentes hemorragias intersticiales así como focos de infiltración linfocitaria-polinuclear. Existen signos de reabsorción con transformación quística, visible en los tumores de gran tamaño.

Las mitosis varían y sirven para establecer un criterio pronóstico importante habiéndose dividido en dos grandes grupos: <5 mitosis por 50 campos a 400X y >5 mitosis por 50 campos a 400X ^{179, 182}.

- GIST con patrón epiteliode: las células adquieren un aspecto poligonal y citoplasma acidófilo bien definido. Mantienen una disposición homogénea, uniforme con núcleos redondos u ovals de cromatina laxa. Pueden incluso adoptar una disposición lobulada o en nidos que recuerda los tumores epiteliales. Carecen de secreción citoplasmática pero con frecuencia poseen vacuolas envueltas en densificación protoplásmica acidófila a modo de ribete ¹⁶⁶.

El comportamiento divisional así como el estroma es semejante al descrito en el grupo anterior.

La apariencia epiteliode, que fue base de las primeras descripciones del término leiomioblastoma, ofrece una falsa apariencia de mayor malignidad por cuanto su polimorfismo es superior a la variante fusocelular ¹⁶⁶.

- GIST variante mixta: no es extraño encontrar fenómenos de transición brusca entre áreas epiteliodes y fusocelulares dentro de un mismo tumor con una continuidad entre ambas. Básicamente carece de significado pronóstico y biológicamente su comportamiento es semejante a los tipos puros ¹⁷⁸.
- Otras variantes: la presencia de fibras tipo esquenoide hialinas en bandas gruesas fragmentadas en sus extremos y homogéneas o pseudofibrilares suele ser más frecuente en los tumores intestinales. No deben confundirse con tumores nerviosos de tipo schwanniano donde también aparecen. Son PAS positivas. Algunos casos presentan estroma mixoide más abundante

y pseudomucinoso. Cuando corresponden a tipos epitelioides pueden ser motivo de confusión con carcinomas.

Se han descrito variantes anaplásicas semejantes a leiomiomas provistas de un fuerte pleomorfismo, necrosis y hemorragias. Suelen corresponder con un número elevado de mitosis y por ello son de peor pronóstico clínico ^{178, 180}.

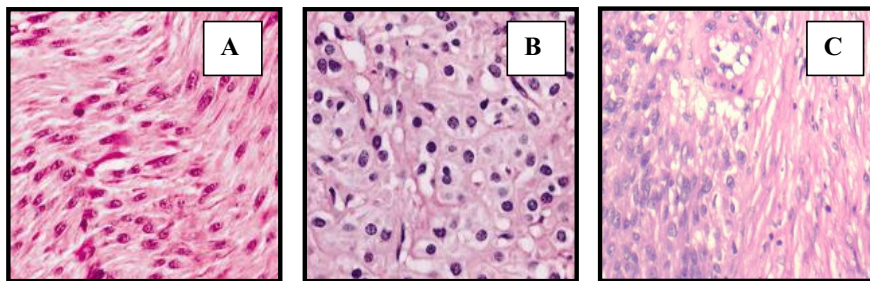


Figura 1.14. Ejemplos de histología fusiforme (A), epitelioides (B) y mixta (C) H&E.

1.2.5.5. Inmunohistoquímica

Un criterio histológico imprescindible para incluir un GIST dentro de esta particular categoría es, como se ha mencionado anteriormente, su positividad intensa frente a KIT (CD117). Esta positividad debe ser intensa, citoplasmática, y membranosa. Sin embargo, algunos tumores expresan la positividad en forma de manchas con acúmulos perigolgiarios coexistiendo con una tinción citoplasmática más débil y difusa. En uno u otro caso, la tinción alcanza al 90%-100% de las células tumorales ^{164, 178, 183}.

Sin embargo, existen casos en que la tinción es más débil o sólo membranosa además de tener una distribución irregular (20%-30%) de células positivas ⁶. Estos casos pueden ser motivo de confusión y deben ser evaluados de modo

riguroso. Por ello, es importante que la técnica sea siempre la misma, utilizando un anticuerpo y una dilución constante y empleando controles externos e internos (fibroblastos y estroma peritumoral). Los mastocitos intratumorales son un buen control interno positivo ^{6, 178}. Como la tinción se efectúa en cortes procedentes de tumores incluidos en parafina se deben tener en cuenta algunas circunstancias que pueden alterar el resultado dando lugar a un falso negativo.

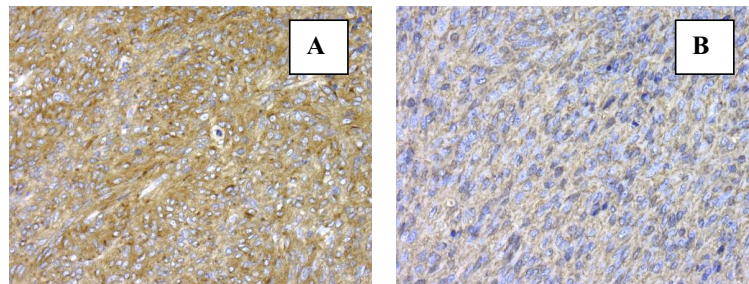


Figura 1.15. Tinción inmunohistoquímica con peroxidasa de CD117(A) y CD34 (B).

Un nuevo marcador inmunohistoquímico descubierto recientemente que suele ser positivo en el GIST es el DOG-1, que muestra una tinción nuclear con peroxidasa y que junto con c-kit son los dos marcadores más sensibles y específicos para GIST que existen actualmente ^{135, 184-186}.

El 80% de los GIST expresan BCL-2, el 60%-70% muestran positividad para el CD34, un 30%-40% son positivos para la actina muscular lisa y un 5%-10% son positivos para el antígeno de la proteína S-100. Se han propuesto varios estudios analizando el valor pronóstico del marcador de proliferación Ki67 ¹⁸⁷. Aunque es un excelente marcador nuclear de las células en ciclo proliferativo, los estudios comparativos frente al recuento mitótico efectuado en hematoxilina-eosina (HE), no ofrecen resultados ventajosos, superponiéndose entre sí por lo que puede ser un medio de confirmación en aquellos casos en que el recuento del índice mitótico presente dificultades ¹⁸⁸.

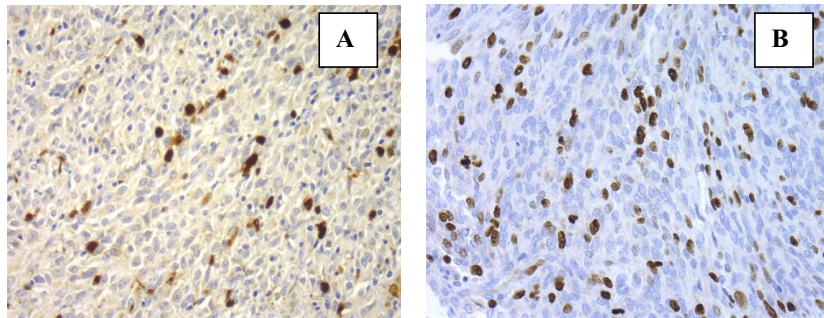


Figura 1.16. Tinción inmunohistoquímica con peroxidasa de S-100(A) y Ki67 (B).

1.2.5.6. *Biología molecular*

Las numerosas investigaciones llevadas a cabo han permitido descubrir la patogénesis molecular de estos tumores con el marcador **c-KIT (CD117)** implicado; el cual se encuentra mutado a nivel del gen e hiperexpresado a nivel proteico en una importante proporción de casos. La hiperexpresión de c-KIT constituye una diana eficaz frente a inhibidores específicos de actividad tirosina quinasa como el **STI 571** (Imatinib mesilato, Glivec®), y que en el caso concreto del GIST ha supuesto un cambio radical en el manejo clínico de estos pacientes debido a la mala evolución y agresividad de estos tumores¹⁸⁹. El **STI-571**¹⁸⁹ (Glivec, Novartis, Basel, Switzerland), es un inhibidor específico de la actividad enzimática de las tirosin quinasa, diseñado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) pero que puede actuar sobre otras proteínas con actividad tirosina quinasa como por ejemplo los receptores *c-KIT* y *PDGFRα*. Atendida la importancia de su implicación terapéutica, el estudio de *KIT* debe hacerse de modo exhaustivo especialmente en casos dudosos o negativos^{168, 187}. Por otra parte, en la publicación de Corless y cols.¹⁹⁰ en la que analizan más de 1000 casos de GISTs estiman que la frecuencia de mutaciones de *PDGFRα* es del 7,2%, siendo el exón 18 el que más frecuentemente se encuentra mutado(6%), seguido por el exón 12 (1%) y en menor frecuencia por el exón 14 (0,2%)¹⁹¹. Por lo general, las mutaciones de *PDGFRα* se asocian a GIST de morfología epiteloide¹⁹² y especialmente aquellas que tienen mutaciones en el exón 14 a un pronóstico más favorable¹⁹³.

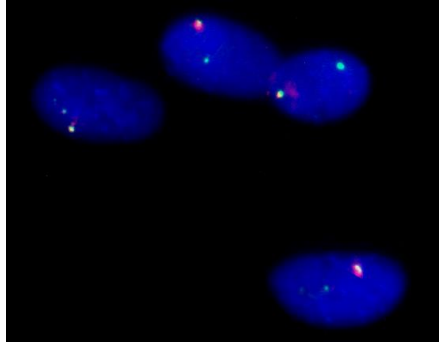


Figura 1.17. Imagen de un GIST por FISH con las monosomías de los cromosomas 14 y el 22.
Imagen cedida por Dra. R.Noguera.

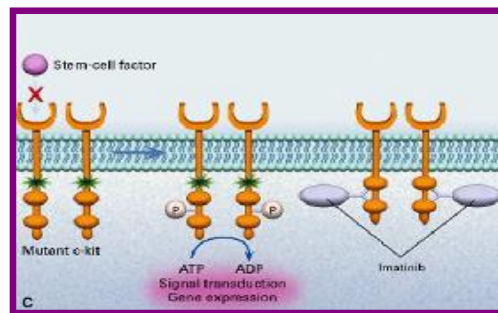


Figura 1.18. Modo de acción del Imatinib cuando el receptor se encuentra mutado y como inhibe la cascada de señales después de unirse a los bolsillos de ATP.

Imagen de Savage NEJM

1.3. LOS MECANISMOS DE ANGIOGÉNESIS EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER.

El sello característico del cáncer comprende seis capacidades biológicas adquiridas durante los múltiples pasos en el desarrollo de los tumores humanos. Estas marcas constituyen un principio de organización para racionalizar la complejidad de las enfermedades neoplásicas. Estas capacidades están constituidas por el mantenimiento de la señal proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, y activación de la invasión y metástasis. Estas capacidades adquiridas son debidas a la inestabilidad en el genoma, que genera la diversidad

genética, y al papel de la inflamación, que alimenta múltiples rutas genéticas características de las células cancerosas. El progreso conceptual de la última década ha sumado dos procesos emergentes de importancia a esta lista, que son la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune. Además de las células tumorales, las neoplasias muestran otra dimensión de complejidad: contienen un amplio repertorio de células normales que contribuyen a la adquisición de las características capacidades por lo que se denomina el “microambiente tumoral”¹⁹⁴.

1.4. ROL DE LAS QUIMIOCINAS EN LAS NEOPLASIAS.

Las quimiocinas (también denominadas quimioquinas) son proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a una familia de las citoquinas. Se llaman de este modo debido a la capacidad que tienen para inducir la quimiotaxis en las inmediaciones de las células sensibles, son citoquinas quimiotácticas. Las quimiocinas presentan una serie de características estructurales comunes, tales como su pequeño tamaño o la presencia de cuatro residuos de cisteína en regiones protegidas, las cuales son clave para la construcción de su estructura tridimensional. Comprenden una familia de aproximadamente 50 citocinas, que están implicadas en muchos procesos biológicos, tales como la migración de leucocitos, embriogénesis, angiogénesis, hematopoyesis, aterosclerosis, crecimiento tumoral y metástasis, e infección por HIV (virus de inmunodeficiencia humano)^{13, 195, 196}.

De forma general, estas quimiocinas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos basándose en su función y en el patrón de expresión: **quimiocinas homeostáticas** e **inflamatorias**. Las quimiocinas homeostáticas se expresan constitutivamente en ciertos tejidos, y juegan un papel importante y vital en el desarrollo y mantenimiento (homeostasis) del sistema inmune y hematopoyético. Por otro lado, las quimiocinas inflamatorias no se expresan constitutivamente, pero son inducibles por estímulos inflamatorios. Su expresión está estrechamente controlada por citocinas proinflamatorias que se expresan a nivel local¹³.

Actualmente, hay 4 subgrupos de la familia de quimiocinas: CXC, CC, CX3C, y C quimiocina ligando (X representa cualquier aminoácido) dependiendo de la

posición de las cisteínas conservadas en el grupo amino terminal de estas pequeñas proteínas inducibles ¹⁹⁷. El *subgrupo CXC o α* se subdivide además en quimiocinas ELR+ (ej.: interleucina-8 o IL-8, pro-angiogénica) y ELR- (ej.: factor-4 plaquetario o PF-4, inhibidor de angiogénesis) ¹⁹⁸. Este ELR motif es importante en las interacciones ligando/receptor en neutrófilos. Una excepción es CXCL12/SDF-1, una quimiocina angiogénica CXC ELR- ¹⁹⁹⁻²⁰¹.

Por su parte, *las quimiocinas CC o β* representan el subgrupo más grande se caracteriza por tener posicionadas dos cisteínas aminoterminales lado a lado. Estas quimiocinas atraen a la mayoría de células leucocíticas, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células natural killer (NK), basófilos, eosinófilos y mastocitos. La familia de *quimiocinas C o γ* tiene un solo residuo cisteína NH₂-terminal y se representa solo por XCL/linfotactina. La *familia CX3C o δ* tiene tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas y se representa por CX3CL1/neurotactina ¹³.

La mayoría de estas proteínas activan leucocitos a través de la unión a los receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) designados CXCR o CCR ^{202, 203}.

Hay aproximadamente 20 receptores de quimiocinas identificados ²⁰⁴. La unión de las quimiocinas a su receptor produce una migración transendotelial de leucocitos por las interacciones con las integrinas y selectinas. A continuación, los leucocitos infiltran el tejido en respuesta a un gradiente de quimiocinas, producidos en el sitio de la inflamación (un esquema que ilustre el texto ayudaría mucho). Además, estas GPCRs pueden contribuir a la acción angiogénica y angiostática de las quimiocinas. ^{205, 206}.

Como se ha dicho anteriormente, las quimiocinas son proteínas pequeñas de 8-15 kDa. Sin embargo, pueden formar dímeros u oligómeros ²⁰⁷ con glicosaminglicanos (GAG) imprescindibles para activar la quimiocina *in vivo*. La asociación de quimiocinas y GAGs facilita la retención de quimiocinas sobre la superficie celular y capacita la formación de gradientes inmovilizados, o haptotáticos. Esto se requiere en el reclutamiento de leucocitos para mantener una alta concentración local de quimiocinas ²⁰⁷. Además, la interacción quimiocina-GAG facilita el proceso de unión al receptor. Por otra parte, GAGs están involucrados en muchos procesos, tales como el control de replicación de células tumorales, invasión y vascularización ²⁰⁸.

Las quimiocinas son mejor conocidas por inducir la migración celular, particularmente de leucocitos durante la inflamación. Se piensa que la inflamación prolongada facilita la carcinogénesis por generar un microambiente ideal para el crecimiento y desarrollo del tumor¹³. Las quimiocinas afectan al desarrollo del tumor indirectamente por la influencia de la angiogénesis, interacciones tumor-leucocito, así como directamente por la influencia en la transformación, sobrevivencia y crecimiento tumoral, invasión y metástasis. El papel que juegan las quimiocinas es más complejo y así, algunas quimiocinas pueden favorecer el crecimiento y la progresión tumoral, mientras que otras pueden aumentar la inmunidad antitumoral¹³.

Los tumores sólidos contienen además de células tumorales, varios tipos de células estromales, como fibroblastos y células endoteliales. Por otra parte, los tumores se encuentran infiltrados por células inflamatorias, que incluyen neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Las células tumorales y estromales, así como los leucocitos asociados al tumor contribuyen a una producción local de quimiocinas dentro del tumor. Además, las quimiocinas derivadas del tumor determinan el flujo de leucocitos dentro del tumor²⁰⁹. De este modo, las quimiocinas pueden estimular o inhibir el desarrollo del tumor de una forma autocrina atrayendo células con actividades pro y antiinflamatorias respectivamente (Fig.1.19). Los neutrófilos y macrófagos asociados al tumor pueden favorecer la progresión tumoral por la secreción de enzimas que degradan la matriz y factores de crecimiento respectivamente^{210, 211}. Los macrófagos tienen un marcado grado de plasticidad con un “switch” en el fenotipo durante la progresión tumoral²¹². Alternativamente, los tumores infiltrados por linfocitos T y células NK sufren un receso en la progresión y crecimiento tumoral²¹³.

Las quimiocinas pueden afectar indirectamente al crecimiento tumoral por su actividad angiogénica y angiostática.

Otra característica que hace de las quimiocinas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer es su capacidad para atraer células tumorales expresando CXCR4 a órganos que producen sus ligandos CXCL12, mediando así el proceso de metástasis²¹⁴. La metástasis tumoral es un proceso complejo que incluye transformación celular, angiogénesis, invasión a través de la matriz extracelular y

membrana basal vascular, entrando en la circulación general y produciendo metástasis en órganos a distancia.

1.5. QUIMIOCINAS ANGIOGÉNICAS Y ANGIOSTÁTICAS

1.5.1. CXCL1/2/3 y CXCR2

CXCL1/2/3 y CXCR2 fueron originalmente identificadas en el sobrenadante de líneas celulares de melanoma ²¹⁵. Estas quimiocinas tienen de receptor a CXCR2, y promueven la quimiotaxis de neutrófilos siendo responsable de la actividad angiogénica y quimiotáctica de las células endoteliales ²⁰⁵. El reclutamiento de neutrófilos juega un importante papel en la actividad angiogénica del homólogo murino CXCL1/ proteína-2 inflamatoria macrofágica (MIP-2). De hecho, los neutrófilos pueden sintetizar y almacenar moléculas angiogénicas, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)-A ²¹⁶.

Sin embargo, estas quimiocinas no sólo atraen a las células tumorales y pueden contribuir directamente a la transformación y crecimiento tumoral. De hecho, las quimiocinas GRO juegan un papel fundamental en la quimiotaxis y metástasis de varias líneas celulares y actúan como factores de crecimiento autocrino en el melanoma y otros tumores ^{217, 218}. La sobreexpresión de CXCL1/GRO- α en melanocitos se asocia a una activación constitutiva del factor κ B nuclear aumentando la progresión nuclear ^{219, 220}. Una mutación puntual en CXCR2 genera una señal constitutiva, promoviendo la transformación celular de preneoplásica a neoplásica ²²¹. Además, se ha demostrado que CXCL1/GRO- α no sólo se une a CXCR2 sino también al GPCR codificado por el tumorigénico virus herpes-8 asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) ²²².

Además de las anteriormente descritas CXCR1 y CXCR2, se identificó otro receptor quimiocina ligando, llamado receptor antígeno Duffy para quimiocinas (DARC).

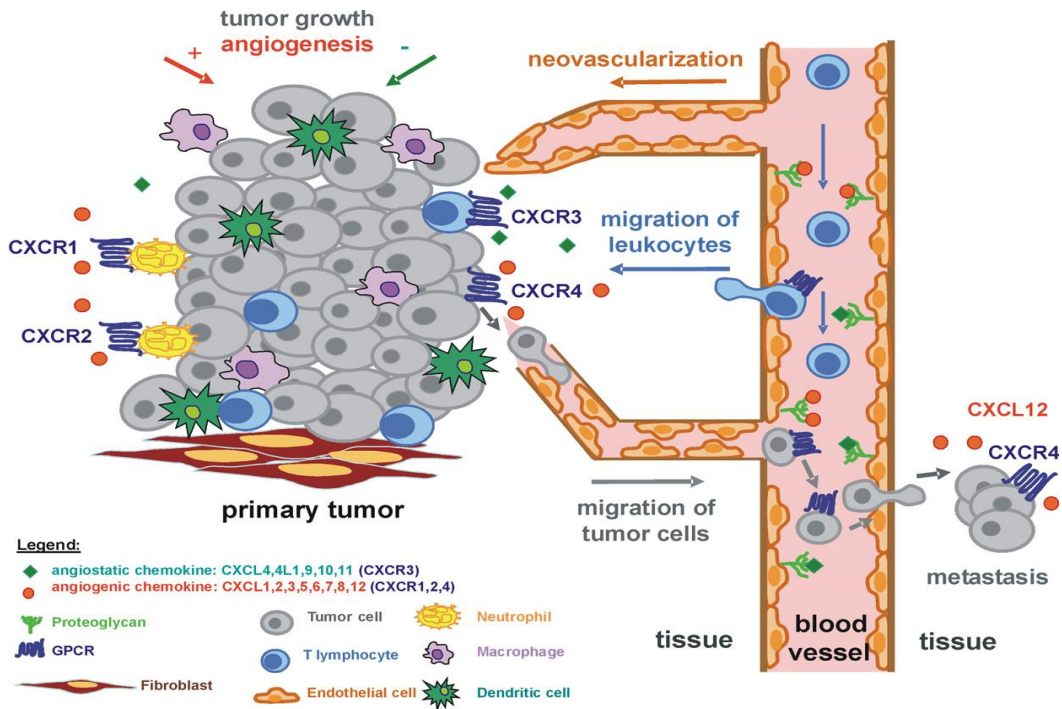


Figura 1.19. Papel de la quimiocinas y sus receptores en el ambiente tumoral. Los tumores sólidos contienen varios tipos de células estromales, como fibroblastos y células endoteliales. Todos estos tipos celulares son buenos productores de quimiocinas, regulando la migración de leucocitos. El tráfico leucocitario está constituido por múltiples pasos coordinados. Brevemente, los leucocitos ruedan sobre el endotelio y las quimiocinas unen leucocitos a través de su receptor proteína G. Como resultado de ello, los leucocitos se unen firmemente a la capa de células endoteliales. Finalmente los leucocitos traspasan la capa de células endoteliales y migran dentro de los tejidos donde se producen las quimiocinas según el gradiente de concentración. Así el tumor es infiltrado por células inflamatorias, incluyendo neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. De hecho, todas las quimiocinas CXC ELR+ atraen a neutrófilos protumorales que expresan CXCR2, cargados con proteasas. En contraste, algunas quimiocinas CXC ELR- como el CXCR3 y sus ligandos CXCL9, CXCL10 y CXCL11, atraen CXCR3 linfocitos T activados y células NK que deberían ejercer una actividad antitumoral citotóxica. La producción de quimiocinas por células tumorales, estroma normal y leucocitos también afecta al proceso de angiogénesis por sus propiedades angiogénicas (CXCR2 y sus ligandos CXCL1,2,3/GRO-,a,b,c CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8 y el CXCR4 agonista CXCL12/SDF) y angiostáticas (CXC L4/PF-4, CXCL4L1/PF-4var, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC). La formación de nuevos vasos sanguíneos es importante en la tumorigénesis para abastecer de oxígeno y nutrientes y estimular el proceso de metástasis. Además, el eje receptor-ligando CXCR4-CXCL12/SDF-1 está involucrado en la migración dirigida de las células tumorales a los sitios metastáticos

13

1.5.2. CXCL9/10 y CXCR3

El otro grupo que queremos revisar es el de las quimiocinas CXC ELR-. En este grupo se encuentran las quimiocinas CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, y su receptor CXCR3 que tienen un poder angiostático en la angiogénesis y son producidas *in vitro* por una gran variedad de células, incluyendo células endoteliales, fibroblastos, células mononucleares y tumorales^{223, 224}, y su presencia ha sido confirmada en varios tipos de tejidos tumorales²²⁵. Estas quimiocinas inhiben la actividad angiogénica de las quimiocinas CXC ELR+ en los ensayos *in vitro* en la quimiotaxis de células endoteliales y en el modelo *in vivo* en la cornea de rata¹⁹⁸. Struyf et al. Demostraron inhibición del crecimiento del adenocarcinoma y de las metástasis en ratones después del tratamiento con CXCL10 murino, así como la reducción del crecimiento y vascularización tumoral en el carcinoma pulmonar de Lewis después de administrar CXCL9²²⁶. El mecanismo responsable del bloqueo de los ligandos CXCR1 y CXCR2 por los ligandos de CXCR3 no está bien entendido todavía. CXCR3-B y la unión GAG sobre células endoteliales están probablemente involucrados en la mediación de la actividad angiostática^{227, 228}.

Hay al menos tres variantes de ensamblaje de CXCR3, llamadas CXCR3-A, CXCR3-B y CXCR3-alt²²⁸. CXCR3-A está involucrado en la actividad quimiotáctica de las quimiocinas CXC IFN- γ sobre los linfocitos T activados y células NK. Clásicamente, el reclutamiento de esas células facilita la inmunidad antitumoral produciendo una regresión tumoral^{229, 230}. CXCR3-B se postula que media la actividad angiostática de CXCL4/PF-4, CXCL9, CXCL10, y CXCL11 sobre células endoteliales^{206, 227-231}. La expresión de CXCR3 en células endoteliales es ciclo-celular dependiente y limitada a la fase S/G2-M²⁰⁶. Aunque la mayoría de receptores quimiotácticos están emparejados con las proteínas toxinas-sensitiva G pertussis, se ha publicado que CXCR3-A y CXCR3-B median su función recíproca a través de diferentes proteínas G emparejadas^{206, 227, 232}. Algunos tejidos como el corazón, riñón, hígado y músculo esquelético expresan ambas variantes de ensamblaje CXCR3. Otros tejidos como la placenta, expresan sólo CXCR3-A, mientras que las células endoteliales vasculares expresan selectivamente CXCR3-B²²⁷. La relativa expresión de estas dos variantes en el

cáncer de mama sugiere ser importante en la regulación de su proliferación en respuesta a CXCL10. De hecho, tras la disminución de CXCR3-B y CXCL10 se produce un aumento en la proliferación del cáncer de mama, lo que confirma el papel de CXCR3-B en la inhibición del crecimiento celular y sugiere la participación de CXCR3-A u otro receptor CXCL10 que promueva la proliferación celular ²³³. El papel de la expresión de CXCR3 en la biología tumoral ha sido investigado por otros grupos de trabajo en las metástasis. La expresión constitutiva de CXCR3 en melanomas y carcinomas de colon y mama aceleran las metástasis a ganglios linfáticos ^{10, 11}. Por otro lado, el antagonismo de CXCR3 produjo una inhibición de las metástasis pulmonares en el cáncer de mama en un modelo murino ²³⁴. Esto sugeriría un papel de CXCR3 en conducir células CXCR3 positivas hacia sitios donde IFN- γ es abundante, como se describió previamente en CXCL12/SDF-1 en el eje CXCR4 ²¹⁴. De hecho, CXCL10/IP-10 se detectó en sitios metastáticos en células de carcinoma colorrectal, y promueve la invasión tumoral ²³⁵. Esto indica que los ligandos CXCR3 tienen efectos opuestos sobre el microambiente de las células tumorales (antimaligno) y sobre las células tumorales (promaligno).

Esta dicotomía de los ligandos CXCR3/CXCR3 sugiere que la aplicación de estos ligandos CXCR3 como potenciales agentes terapéuticos contra el cáncer, podrían ser problemáticos.

Un tercer receptor CXCR3, CXCR3-alt tiene la actividad funcional reducida y media efectos quimiotácticos inducidos por CXCL11/I-TAC ²³⁶. Una razón mayor para reducir la actividad quimiotáctica puede ser una expresión más baja de la proteína en superficie de CXCR3-alt, comparado con la que rellena el receptor. Además, se ha sugerido la existencia de otro receptor funcional para CXCL10/IP-10 presente en células epiteliales y endoteliales que no sea CXCR3-A ²³⁷.

1.6. XENOTRASPLANTES DE TUMORES HUMANOS EN RATONES NUDE

La progresión tumoral se asocia a una mayor agresividad clínica y, en muchos casos, a la muerte del paciente. Las causas de esta progresión tumoral son numerosas y no del todo bien conocidas actualmente. Los modelos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la progresión están disponibles (cultivos celulares, modelos animales y microchips de ADN). Los xenotrasplantes en ratones nude de tumores humanos nos proporcionan una herramienta interesante para el estudio de la progresión y evolución tumoral en los sarcomas humanos, porque ellos imitan en un modelo experimental, lo que podría suceder en humanos²³⁸⁻²⁴².

Los tumores humanos malignos pueden ser implantados en ratones inmunodeficientes, donde pueden crecer como xenoinjertos, con la ayuda del estroma murino^{238, 243}. Una vez establecidos, las líneas tumorales pueden crecer indefinidamente como tejidos heterogéneos, pareciéndose mejor a los tumores originales que las líneas celulares que crecen *in vitro*, siendo muy útiles como modelos de cáncer para experimentos preclínicos^{239, 240, 244}. Los xenotrasplantes se pueden establecer también de forma indirecta por inyección de líneas celulares *in vitro* en los ratones. Sin embargo, estas líneas son menos útiles como modelos preclínicos²⁴⁵ ya que mutaciones específicas pueden ser inducidas,²⁴⁶ su programación puede ser cambiada irreversiblemente durante el cultivo *in vitro*,²⁴⁷ y su respuesta al tratamiento frecuentemente difiere del de los pacientes²⁴⁵.

Durante los últimos 30 años, nuestro grupo cuenta con una reconocida experiencia en el campo de los xenoinjertos habiéndose realizando de una forma sistemática xenoinjertos de sarcomas en ratones nude, principalmente orientadas hacia el análisis de progresión tumoral y desdiferenciación^{57, 98, 138, 160, 242, 248-259}.



Figura 1.20. Ratones nude con tumor de partes blandas implantado subcutáneamente.

1.7.ANGIOGÉNESIS TUMORAL

La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es un evento biológico que aparece en procesos fisiológicos y patológicos, como la embriogénesis, reparación tisular y crecimiento tumoral ²⁶⁰. Es un complejo proceso que consiste en numerosas señales estimulantes e inhibitorias, como integrinas, angiopoyetinas, quimiocinas, sensores de oxígeno, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, y otras moléculas involucradas ²⁶¹⁻²⁶³. Este delicado equilibrio entre factores angiostáticos y angiogénicos está estrictamente regulado. El crecimiento tumoral ocurre cuando el equilibrio entre factores angiogénicos y angiostáticos se rompe en favor de los angiogénicos. La angiogénesis es necesaria para aportar oxígeno y nutrientes, y eliminar los residuos de las células tumorales. Durante casi 30 años, la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes (angiogénesis) se ha considerado como una forma exclusiva de vascularización tumoral. Sin embargo, durante los últimos años, varios mecanismos adicionales han sido identificados, como son la contribución de la angiogénesis intususceptiva, el reclutamiento de células progenitoras endoteliales, cooptación vascular, mimetismo vascular y linfangiogénesis que favorecen el crecimiento tumoral. Por todo ello, las

estrategias de dianas terapéuticas antitumorales son mucho más complejas de lo que inicialmente se pensó ²⁶¹.

Los tumores pueden crecer hasta un tamaño aproximado de entre 1 a 2 mm³ antes que las demandas metabólicas se vean restringidas por la limitación del aporte de oxígeno y nutrientes. Para obtener un tamaño mayor que este, el tumor pone en marcha la activación de señales angiogénicas y atrae vasos sanguíneos del estroma circundante. Este proceso está regulado por una gran variedad de factores pro y antiangiogénicos y es un prerequisite para la diseminación del tumor a otros lugares ⁷.

A continuación pasaremos a exponer los distintos tipos y modalidades de angiogénesis tumoral existentes que hemos enumerado anteriormente.

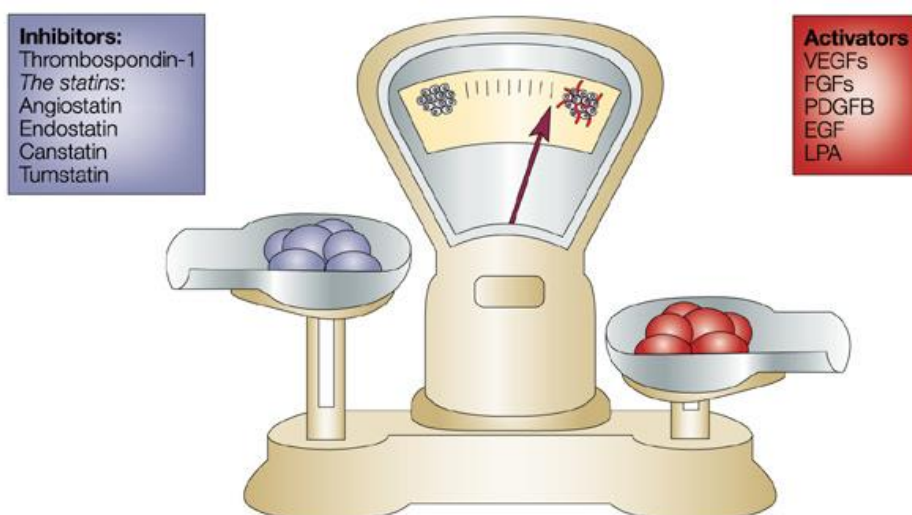


Figura 1.21. La activación angiogénica.

Nature Reviews Cancer 3, 401-410 (2003)

1.7.1. Brote de angiogénesis o vascular sprouting

Esta modalidad angiogénica consiste en la formación y crecimiento de nuevos capilares a partir de los preexistentes, y es la angiogénesis que se produce en situaciones fisiológicas como el desarrollo embrionario, cicatrización y reproducción. Pero juega también un papel fundamental en determinadas

patologías como la diabetes mellitus ²⁶⁴, artritis reumatoide ²⁶⁵, complicaciones isquémicas cardiovasculares ²⁶⁶ y cáncer ^{7, 260}. Además está involucrada en la formación, crecimiento y expansión de metástasis ^{194, 267}. La angiogénesis tumoral empieza con la activación de las células endoteliales por factores de crecimiento específicos que se unen a sus receptores. Así pues, la matriz extracelular y la membrana basal que rodean las células endoteliales, se degradan localmente por la activación de las proteasas. Por polarización de la migración de las células endoteliales se crea una luz y un vaso sanguíneo inmaduro ²⁶⁸. La posterior estabilización del vaso inmaduro se establece por el reclutamiento de células murales y degeneración de la matriz extracelular ²⁶⁹. Este proceso está estrechamente controlado por factores reguladores positivos y negativos, el equilibrio de los cuales determina el proceso.

La primera familia de factores de crecimiento angiogénico es la **familia FGF (fibroblast growth factor)**. Este grupo está constituido por 23 miembros, de los cuales FGF-2 y FGF-1 son los mejor conocidos. El **factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)** o **factor de permeabilidad vascular**, es otro que juega un papel importante en la estimulación de la angiogénesis.

La familia VEGF de factores de crecimiento está constituida por seis miembros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario) que interactúan distintamente con tres receptores de superficie celular con actividad tirosin quinasa (VEGFR1-3). Actualmente, la interacción entre VEGF-A y VEGFR2 juega un papel importante en la expansión angiogénica ²⁶⁸. El factor de crecimiento placentario (PLGF) es un miembro de la familia VEGF que se une sólo al VEGFR1, es también un mediador angiogénico a pesar que su papel está infraestimado. Además, otros tipos celulares como fibras musculares lisas, células inflamatorias y tumorales pueden producir también PLGF cuando se activan ^{270, 271}. PLGF parece desempeñar un papel importante en el desarrollo vascular pero sin afectar la funcionalidad de los vasos normales durante la formación y reproducción ²⁷¹.

La **familia de las angiopoyetinas**, es otro grupo importante de factores de crecimiento en el fenómeno de la angiogénesis, incluye tres miembros en humanos, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2 y angiopoyetina-4 que se unen todos al receptor endotelial con actividad tirosin quinasa Tie-2. Lo más característico de este grupo es el efecto opuesto que los diferentes ligandos uniéndose a un mismo

receptor. La angiopoyetina-1 activa la señalización de Tie-2, mientras que la angiopoyetina-2 inhibe su activación. Angiopoyetina-1 está involucrada en la migración de células endoteliales, adhesión y reclutamiento de pericitos y fibras musculares lisas, mientras que angiopoyetina-2 es una desestabilizadora vascular ^{272, 273}.

Las células neoplásicas pueden, además, producir otros factores como el **factor-β de crecimiento transformador (TGF-β)**, que estabiliza los vasos formados y suprime el sistema inmune ²⁷⁴, **factor de crecimiento plaquetario (PDGF)** que atrae los pericitos ²⁷⁵, **el factor de crecimiento epidérmico (EGF)** que promueve la angiogénesis tumoral por la regulación a la alza de VEGF ²⁷⁶ y la **interleuquina-8 (IL-8)** que específicamente aumenta la migración de células endoteliales ²⁷⁷.

Estudios recientes han mostrado similitudes en la regulación molecular en la orientación de neuronas y células endoteliales. Las células endoteliales especializadas que se asemejan a los conos de crecimiento axonal, están localizados en las puntas de crecimiento capilar. Estas células punta se extienden y retraen continuamente sus filopodios para explorar el medio ambiente y definir así la dirección en la que una nueva yema vascular crece ²⁷⁸. Tanto los conos de crecimiento axonal como las células punta endoteliales parecen utilizar un amplio repertorio de señales moleculares ligando-receptor, en las que se incluyen la familia de las Efrinas, Semaforinas, Slits, Netrins y Notchs ²⁷⁹.

La angiogénesis se encuentra regulada negativamente por la **trombospondina-1** que fue el primer agente angiostático descubierto ²⁸⁰. Otros miembros de este tipo de proteínas anti-angiogénicas producidas de forma endógena son prolactina, factor plaquetario-4, interferón-α, interferón-γ proteína-10 inducible ²⁸¹, angiostatinas ²⁸², endostatinas ²⁸³, proteína de aumento de la permeabilidad bactericida ²⁸⁴ y tumstatina ²⁸⁵.

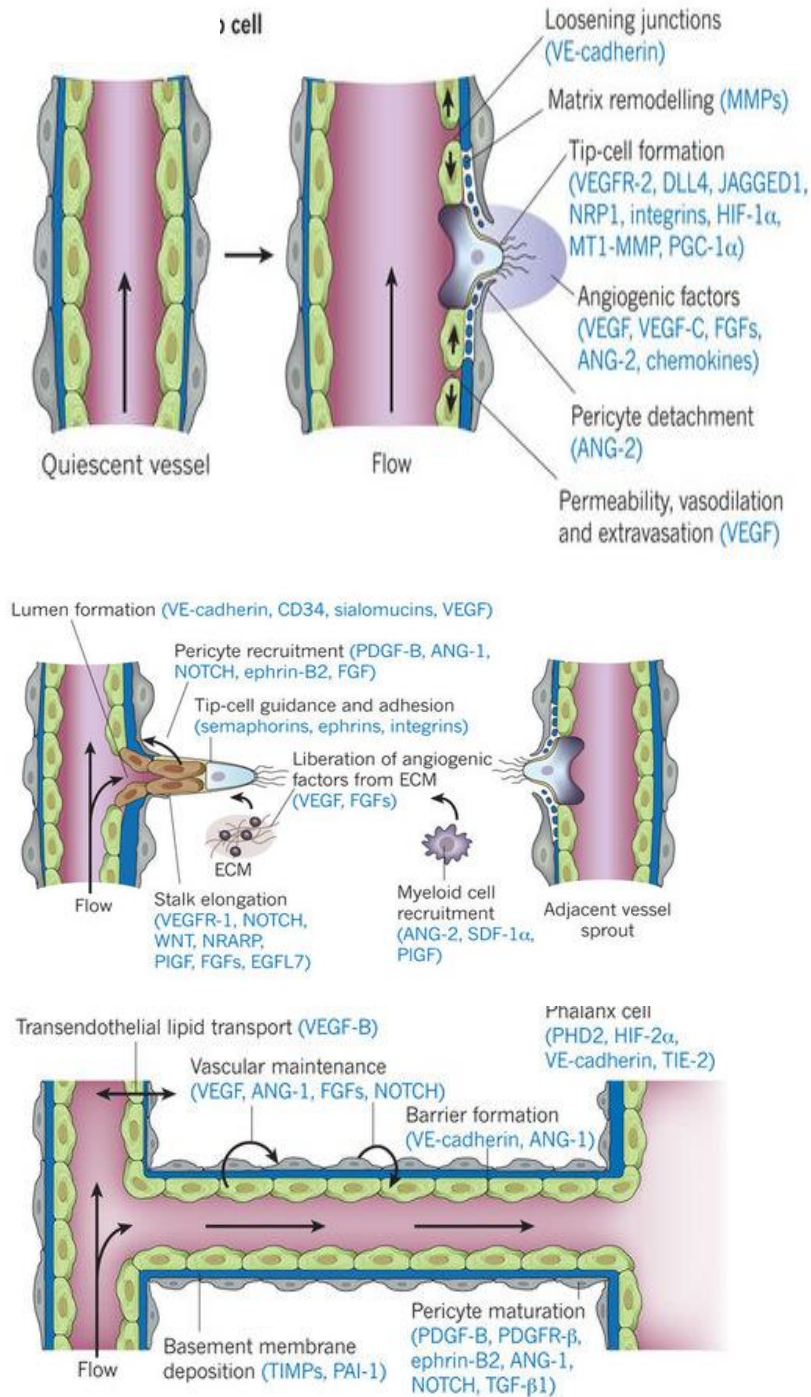


Figura 1.22. Cascada de señalización angiogénica y representación gráfica de la neogénesis vascular. Carmeliet, P et al. *Nature* 2011, 298:298-307

1.7.2. Angiogénesis intususceptiva.

Este nuevo proceso de formación de vasos se produce a partir de vasos preexistentes separados en dos nuevos capilares por la formación de un pilar tisular intraluminal y fue observado en primer lugar en la remodelación de los capilares pulmonares en neonatos ²⁸⁶.

El crecimiento microvascular intususceptivo es un proceso rápido que puede tener lugar en horas o incluso minutos porque no se precisa de la proliferación de células endoteliales. En este proceso las células endoteliales son transformadas aumentando el volumen y llegando a ser más delgadas. La microscopía electrónica de transmisión revela 4 pasos consecutivos ²⁸⁷. Primero, las células endoteliales del lado opuesto de la pared hacen lo que se denomina “kissing contact”, por lo que se forma un puente transluminal. En segundo lugar, se produce una reorganización de las uniones interendoteliales y la perforación de la bicapa endotelial. En la tercera fase, se forma el pilar intersticial y tanto pericitos como miofibroblastos invaden y cubren la nueva pared intersticial formada. Por último, los pilares crecen de diámetro y las células endoteliales se retraen formándose dos luces vasculares diferentes. La remodelación y la formación de pilares no se observa sólo en los plexos capilares, sino también en pequeñas arterias y venas ²⁸⁸.

En modelos de xenotrasplantes de carcinoma de colon se ha detectado formación de pilares tisulares, donde en las regiones más estables se ha observado mayoritariamente la intususcepción ²⁸⁹. Existen algunas indicaciones de que la ausencia de VEGF es importante en la inducción de la angiogénesis intususceptiva en los tumores de rápido crecimiento ²⁹⁰. Aunque los mecanismos de la intususcepción no son del todo conocidos, hay varios factores clave que podrían influenciar la formación de pilares. La alteración dinámica del flujo sanguíneo en ramas arteriales podrían estimular el proceso ²⁸⁸. Además, cambios de estrés sobre las células endoteliales y en la pared sobre los pericitos, pueden activar la cascada bioquímica que puede resultar en reensamblajes citoesqueléticos y adaptaciones de los complejos “gap-junction” ²⁸⁷. A pesar que hay muchas células que desempeñan un papel importante en el proceso de intususcepción, como células endoteliales, pericitos, macrófagos y células sanguíneas, ahora se cree ampliamente que es un proceso mediado principalmente por la interacción de

célula endotelial-célula endotelial y célula endotelial-pericito^{261, 287}. Los factores conocidos que se sabe que están involucrados en estas interacciones de la angiogénesis, tales como las angiopoyetinas y sus receptores Tie, PDGF-B, MCP-1, efrinas y receptores EphB son candidatos como mediadores de la angiogénesis intususceptiva²⁸⁷.

1.7.3. Células endoteliales progenitoras.

Hasta 1997, el crecimiento de nuevos vasos en adultos se consideraba que ocurría exclusivamente a través de la angiogénesis y la intususcepción. Este paradigma de desarrollo vascular cambió tras el descubrimiento de la subpoblación de células sanguíneas mononucleares CD34 positivas²⁹¹. Estas células eran capaces de adaptarse *ex vivo* con un fenotipo endotelial y fueron denominadas células progenitoras endoteliales o angioblastos. Actualmente, se acepta que los nuevos vasos pueden crecer a través del reclutamiento de células endoteliales progenitoras (EPCs) que circulan por el torrente circulatorio. Estas EPCs expresan varios marcadores específicos endoteliales como CD34, CD31, VEGFR2, Tie-2²⁹¹ y CD14²⁹². Las primeras observaciones *in vivo* de la incorporación de EPCs a la sangre, se estudiaron en diferentes modelos de trasplante de médula ósea en ratones y conejos. En estos modelos con trasplantes homólogos, heterólogos y autólogos de células sanguíneas mononucleares CD34+, CD133+, VEGFR2+, estas células EPCs se incorporaron exclusivamente en los vasos de miembros isquémicos neovascularizados²⁹¹. Además, el trasplante de EPCs mejoraba la perfusión de los miembros, aumentando la densidad capilar y reduciendo el riesgo de pérdida del miembro²⁹².

La movilización y reclutamiento de EPCs está promovida por varios factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas, que se producen durante los procesos tales como el estrés fisiológico (isquemia), ejercicio físico y crecimiento tumoral. La movilización de las EPCs comienza con la activación de la metaloproteínasa-9 matricial, que promueve la transformación del ligando de membrana Kit en una forma soluble. De esta forma, las células progenitoras c-kit positivas se despegarán de su nicho en la médula ósea, se desplazarán a la zona vascular de

la médula y se liberarán a la circulación ²⁹³. Un factor clave en la activación de la metaloproteínasa-9 matricial por VEGF y el “stromal cell-derived factor-1”, es el óxido nítrico sintasa endotelial ²⁹⁴. El reclutamiento y la integración de las EPCs implican un proceso complejo, que incluye la quimioatracción, secuestro activo y captación de vascularización angiogénica, transmigración al espacio intersticial, incorporación a la microvascularización y diferenciación en células maduras endoteliales. P-selectina, E-selectina e integrinas se consideran importantes en la adhesión de EPCs a la pared del vaso y en la migración transendotelial ^{295, 296}. Un artículo reciente demostró un rol funcional del grupo de elevada movilidad box 1(HMGB1) en la captación de EPCs. La migración inducida por HMGB1 de EPCs podría ser inhibido por anticuerpos contra las integrinas β_1 y β_2 ²⁹⁷. Durante la diapédesis CD31 y CD99 median el pase de EPCs ^{298, 299}. La diferenciación de EPCs a células endoteliales maduras está principalmente mediada por VEGF ^{291, 300}. Tras la maduración a células endoteliales, EPCs pierden sus propiedades progenitoras y empiezan a expresar marcadores endoteliales como VE-cadherina, factor de von Willebrand y óxido nítrico sintasa endotelial ³⁰¹.

Las EPCs están presentes en el sitio de la neovascularización en neoplasias, tal y como ha demostrado la presencia de β -galactosidasa unida a la célula progenitora, tanto al estroma tumoral como al endotelio de los capilares tumorales ³⁰². Estos hallazgos nos llevan a la hipótesis de que EPCs no sólo se incorporan al endotelio vascular sino también puede secretar factores proangiogénicos en las regiones perivasculares del estroma tumoral.

La contribución real de EPCs al crecimiento vascular, sin embargo, es variable. En tumores hay publicaciones donde las EPCs lideran el proceso de angiogénesis tumoral, mientras que por otra parte, otros describen una mínima contribución a la vascularización tumoral ³⁰³⁻³⁰⁶.

1.7.4. Cooptación vascular

Se ha sugerido que muchos tumores pueden crecer en un estado avascular, especialmente en tejidos muy vascularizados como pulmón y cerebro ³⁰⁷⁻³⁰⁹. Las células tumorales pueden crecer a lo largo de los vasos existentes sin evocar una

respuesta angiogénica. Este proceso fue definido como cooptación vascular y parece estar regulado por la angiopoyetina-2 y VEGF ³¹⁰.

La cooptación vascular se ha observado ahora en diferentes tipos de tumores como el carcinoma pulmonar Lewis de ratón, carcinoma ovárico murino, melanoma humano y sarcoma humano de Kaposi ³¹⁰⁻³¹².

1.7.5. Mimetismo vascular

En 1999, se acuñó el término mimetismo vascular observado en melanomas uveales para describir el papel de células tumorales como células endoteliales. Este proceso de plasticidad celular ocurre principalmente en los tumores agresivos cuyas células tumorales se desdiferencian a un fenotipo endotelial formando estructuras tubulares. Este fenómeno provee a las células tumorales con un sistema de circulación secundario de estructuras vasculogénicas en red revestidas por células tumorales, independientes de la angiogénesis ⁸.

Las células que constituyen el mimetismo vascular se caracterizan por expresar genes asociados al endotelio como VE-cadherina, Ephrin A2 e inhibidores de la ruta del factor tisular, CD34, receptor-1 tirosin quinasa, neuropili 1, E-selectina y endoglina (CD105), así como de varios componentes relacionados de la matriz extracelular laminina 5 γ 2, fibronectina, colágeno IV α 2 y colágeno I ³¹³.

El mecanismo exacto que subyace en la mimetismo vascular necesita ser todavía desvelado. Se han descubierto algunas moléculas que tienen un rol funcional. Por ejemplo, PI3 quinasa (PI3K) se ha propuesto como un factor clave en la activación de MT1MMP (transmembrane metalloproteinase) ³¹³. Esta proteasa activa la metaloproteinasa-2 de la matriz que fragmenta laminina 5 γ 2 en fragmentos promigratorios utilizados para la migración de células tumorales en la mimetismo vascular ³¹⁴. La plasticidad celular de las células tumorales desvelaron varias moléculas que estaban relacionadas con la matriz extracelular como la fibronectina, colágeno IV α 2, colágeno I. La importancia de la matriz extracelular, como componente del microambiente, en la mimetismo vascular fue demostrado por Sefter et al. ³¹⁵. El papel de varios factores de crecimiento conocidos también han sido estudiados, aunque con resultados dispares. Algunos factores de crecimiento como el FGF, VEGF, TGF- β , PDGF y TNF- α (tumour necrosis factor-

α) se ha visto que son capaces de inducir la formación de redes vasculares cuando los añadimos a las líneas de melanoma escasamente invasor ⁸. Esto indica que la angiogénesis y la mimetismo vascular, en contraste con los tipos de vascularización tumoral descritos anteriormente, no comparten las mismas rutas de señalización. Por otro lado, las estrategias de diana antiangiogénica no inhiben el proceso de mimetismo vascular ³¹⁶ y podrían incluso inducir la formación de vasos mimetismo vascular como una vía de escape del tumor para continuar creciendo.

Actualmente, la plasticidad de las células tumorales se ha descrito en melanomas uveal ³¹⁷, cutáneo ³¹⁸, y oral ³¹⁹, carcinoma de mama ³²⁰, carcinoma prostático ³²¹, carcinoma ovárico ³²², carcinoma hepatocelular ³²³, carcinoma de vejiga ³²⁴, rabdomiosarcoma y sarcoma mesotelial ³²⁵, osteosarcoma ³²⁶, astrocitoma, feocromocitoma ³²⁷ y en sarcoma de Ewing ³¹⁶.

Una gran variedad de genes han sido investigados relacionados con el papel de la formación de redes tubulares de las células tumorales. Una opción terapéutica sería el uso de anticuerpos monoclonales utilizados como dianas moleculares. No obstante, la funcionalidad terapéutica y la selección de las mejores dianas aún necesitan ser dilucidadas. Se necesitan nuevas investigaciones sobre las rutas reguladoras esenciales en la plasticidad celular y que no se solapen con los procesos biológicos normales.

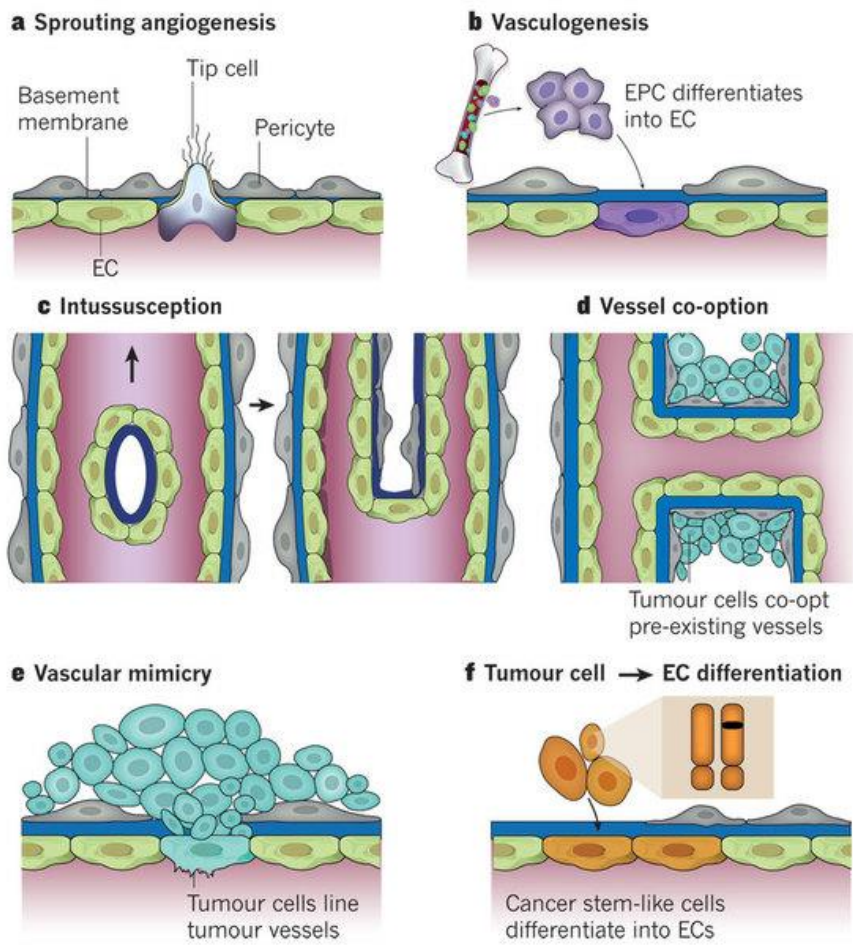


Figura 1.23. Modelos de angiogénesis. EC (endothelial cell); EPC (endothelial progenitor cell)
 Carmeliet, P et al. Nature 2011, 298:298-307

1.7.6.Linfangiogénesis

Los vasos linfáticos forman parte del sistema circulatorio vascular. El sistema linfático es una red de capilares, vasos colectores y ductos que drenan la mayoría de órganos. En contraste con la red vascular sanguínea, la red vascular linfática es un sistema de extremos abiertos unidireccional, sin una fuerza de conducción, que drena fluido extravasado, recoge linfocitos y los devuelve a la circulación. En los últimos años hay evidencias acumuladas sobre el papel del sistema linfático en la progresión tumoral. Las metástasis de tumores malignos a ganglios linfáticos regionales es uno de los signos precoces de la expansión del cáncer en los pacientes. Desde el sistema linfático las células tumorales pueden extenderse a otros órganos y tejidos.

La posibilidad de aislar y cultivar células endoteliales linfáticas ha llevado a la identificación de varios marcadores que son específicos para la vascularidad linfática ³²⁸. El “vascular endothelial growth factor receptor-3” (VEGFR-3) fue el primer marcador linfático identificado ³²⁹. Posteriormente, se identificaron marcadores específicos como el “lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1” (LYVE-1) ³³⁰, podoplanina ³³¹ y el factor de transcripción Prox1 ³³².

De forma parecida a las células endoteliales sanguíneas, las células endoteliales linfáticas son quiescentes bajo condiciones fisiológicas. No obstante, parece probable que la formación de nuevos vasos linfáticos se desencadena de manera similar como la angiogénesis de vasos sanguíneos.

Tras la identificación de VEGFR-3, se identificaron sus ligandos VEGF-C y VEGF-D ³³³, siendo VEGF-C el que juega un papel más determinante ^{334 335}. *In vitro*, VEGF-C estimulaba la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales linfáticas ³³⁶.

La vía de señalización VEGF-A/VEGFR-2 también puede estimular la linfangiogénesis. Sin embargo, los nuevos vasos linfáticos formados por VEGF-A son funcionalmente y estructuralmente anormales ³³⁷. bFGF y PDGF-BB también pueden inducir la linfangiogénesis ^{338 339}. En este sentido, se ha descrito que los PDGFs se encuentran expresados frecuentemente en tumores que han aumentado la incidencia de metástasis linfáticas ³⁴⁰. También se ha descrito el papel de la angiopoyetina-2 en la linfangiogénesis ³⁴¹. Por otro lado se ha visto un papel estimulador tanto *in vitro* como *in vivo* del factor de crecimiento

hepatocitario ³⁴² e “insulin-like growth factor-1 y -2” ³⁴³ en la formación de vasos linfáticos.

1.7.7. La angiogénesis como diana terapéutica

Folkman ya apuntó la idea de aplicar terapias antiangiogénicas en el tratamiento del cáncer en 1972 ³⁴⁴.

Las estrategias que bloquean la señalización de VEGF-A/VEGFR2 son las más abundantes en el campo clínico de la terapia antiangiogénica. En los tumores, los altos niveles de VEGF detectados en muchas líneas celulares tumorales han sido inhibidos *in vivo* por métodos de anticuerpos diana o con el uso de moléculas de pequeño tamaño inhibitoras de VEGF o VEGFR2 ³⁴⁵.

El Avastin® (bevacizumab) fue el primer medicamento aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), es una proteína que se une al VEGF bloqueándolo ³⁴⁶, ³⁴⁷. En combinación con quimioterapia demostró un beneficio en la supervivencia en pacientes con metástasis de carcinoma colorrectal de varios meses ³⁴⁸. Además del Avastin® existen algunos otros inhibidores VEGF que están clínicamente aprobados. El rol de VEGF en la cooptación vascular sugiere que las terapias anti-VEGF pueden considerarse no sólo para bloquear la angiogénesis sino también para inhibir la maduración vascular en el proceso de cooptación vascular ³⁴⁹. Por tanto, se necesitan inhibidores VEGF más potentes para prevenir tanto la angiogénesis como la cooptación vascular.

A parte de los efectos adversos de los inhibidores angiogénicos, también la aparición de resistencias contra estos agentes debe ser mencionada. Hay pruebas emergentes que evidencian que VEGF-A puede ser reemplazado por otras rutas angiogénicas y otros miembros de la familia VEGF ³⁵⁰. Otros de los mecanismos que pueden participar en la resistencia es la selección de células resistentes a la hipoxia y que son menos dependientes de la angiogénesis ³⁵¹ y la normalización de los vasos tumorales que llegan a responder menos a la terapia anti-angiogénica ³⁵². Además, la hipótesis que las células endoteliales son genéticamente más estables que las tumorales está en entredicho especialmente

tras varias publicaciones sobre anomalías genéticas en células endoteliales de vasos tumorales ^{353, 354}. Se acepta también como hipótesis, que la inhibición del proceso de angiogénesis puede estimular el proceso de intususcepción vascular, lo que podría explicar la resistencia generada a fármacos antiangiogénicos en algunos tumores. El hecho de que en la intususcepción sólo se involucre la migración de células endoteliales y remodelación vascular pero no la proliferación vascular, hace que sea poco probable que los agentes antiangiogénicos vayan a ser capaces de prevenirla. Por tanto, para desarrollar estrategias efectivas antiangiogénicas, se deben descubrir también nuevos fármacos antimigración celular ²⁶¹.

La alta incidencia de metástasis linfáticas y el conocimiento de varios marcadores linfáticos urgían a los investigadores a investigar la inhibición de la linfangiogénesis como una estrategia terapéutica tumoral. Stacker et al. ³⁵⁵ publicaron que la reducción de la extensión linfática bloqueando el VEGF-D con un anticuerpo monoclonal. La aplicación de una proteína de fusión VEGFR-3 (llamada VEGF-C/D trap) era capaz de inhibir el crecimiento de los linfáticos asociados al tumor e inhibían las metástasis tumorales ³⁵⁶. Sin embargo, la regulación del crecimiento de vasos linfáticos es más difícil porque no está promovida sólo por el sistema VEGF-C, VEGF-D/VEGFR-3. Algunos otros factores de crecimiento y moléculas específicas para la linfangiogénesis, cuya función exacta no se ha resuelto todavía, podría jugar un papel importante. Una eficiente terapia antilinfangiogénica debería ir dirigida a diferentes factores de crecimiento linfático.

A pesar que se han identificado muchos de los mediadores y rutas angiogénicas, está claro que la inhibición de este proceso es muy compleja. En las últimas cuatro décadas, el descubrimiento de múltiples genes, factores de transcripción y cascadas de señalización han revelado simplemente la complejidad del proceso de angiogénesis y su comprensión ³⁵⁷. Sin embargo, ahora ya, parece seguro que un tratamiento eficiente contra el cáncer estará compuesto de la combinación de quimioterapia con factores anti-angiogénicos que bloqueen las múltiples rutas angiogénicas ³⁵⁷.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Los tumores de hueso y partes blandas son neoplasias muy poco frecuentes, sin embargo continúan afectando a personas en edades tempranas y teniendo una alta mortalidad. La escasa frecuencia de estos tumores dificulta el estudio de grandes series de ensayos clínicos con nuevos fármacos antineoplásicos.

La angiogénesis es un proceso clave en el crecimiento, invasión y capacidad metastásica. Existen múltiples genes y factores implicados en dicho proceso entre los cuales se encuentran las quimiocinas.

La terapia antiangiogénica constituiría una posible diana terapéutica en estos tumores si existiera una mejor evidencia preclínica de factores implicados en este proceso en sarcomas de hueso y partes blandas.

Un mayor conocimiento a nivel morfológico, fenotípico y molecular de las etapas iniciales de la angiogénesis en sarcomas de hueso y partes blandas de origen humano podrían constituir la base de estudios con las terapias antiangiogénicas más dirigidas a cada contexto.

2.2. OBJETIVOS

- 1-** Observar los cambios morfológicos asociados a las fases iniciales de angiogénesis en un modelo in vivo de sarcomas de partes blandas y óseos de origen humano xenotrasplantados en ratones atímicos.
- 2-** Estudiar la expresión IHQ de diferentes factores relacionados con la angiogénesis y neoformación vascular en el modelo que se propone.
- 3-** Estudiar la expresión de tres quimiocinas (CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10) y sus receptores (CXCR2 y CXCR3) en diferentes sarcomas, correlacionando la inmunohistoquímica convencional con el método indirecto de peroxidasa, e inmunofluorescencia indirecta.
- 4-** Analizar la correlación entre las dos técnicas inmunohistoquímicas que se emplean para el estudio de las quimiocinas y sus receptores.

- 5- Averiguar los mecanismos de adaptación y cambios en distintos tiempos de las primeras fases de crecimiento tumoral, desde las primeras 24h hasta 28 días postxenotrasplante.
- 6- Buscar correlaciones en los perfiles de expresión de estas quimiocinas con otros factores angiogénicos, así como con el índice proliferativo tumoral.
- 7- Correlacionar estos perfiles de expresión con cambios morfológicos en cada una de las neoplasias en las primeras fases de desarrollo tumoral.
- 8- Determinar los niveles de VEGF humano y murino en suero en el modelo de experimentación in vivo propuesto.
- 9- Observar mediante técnicas de RT-PCR cuantitativa los diferentes perfiles de expresión de los múltiples genes relacionados con la angiogénesis.
- 10-Buscar una correlación entre la expresión de quimiocinas y otros factores angiogénicos o angiostáticos entre las técnicas inmunohistoquímicas y otras técnicas como el ELISA y la RT-PCR cuantitativa.
- 11-Buscar un perfil de expresión que permita diferenciar y predecir comportamientos biológicos neoplásicos más agresivos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Muestras estudiadas y planteamiento de la experiencia

Una vez planteados los objetivos del presente trabajo se seleccionaron diversos modelos de sarcomas humanos, 1 ES, 1 OS, 1 Ch grado 2, 1 Ch grado 3, 1 SS y 1 GIST. Para ello recurrimos a las instalaciones de experimentación animal del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

Dichas instalaciones comenzaron hace algo más de treinta años en la Universidad de Valencia. Por ellas han pasado 541 líneas tumorales procedentes de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia y que han sido injertados en ratones atímicos como explicaremos posteriormente. Actualmente continúan 18 líneas tumorales activas en ratones atímicos. Estas líneas tumorales se han basado fundamentalmente en tumores de hueso y partes blandas. Estos tumores han sido objeto de participación en numerosos y prestigiosos proyectos de investigación europeos como Prothets (Nº Contrato: 503036) y EuroBonet (Nº Contrato: 018814). Pero sin duda, el tumor más estudiado de todos ellos ha sido el ES, cuyo banco corresponde al de mayor número de casos a nivel europeo. Este estudio, por tanto, está avalado por los diferentes proyectos de investigación que se acaban de mencionar y cuenta con la aprobación de los Comités de Ética y Científico de la Universidad de Valencia y del Hospital Clínico Universitario.

Gracias por tanto a estas instalaciones se ha podido plantear un trabajo de estas características.

Los sarcomas objeto de estudio en este trabajo fueron obtenidos de pacientes procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los tumores fueron recibidos en fresco, se escogieron fragmentos para congelación, cultivo y estudio histopatológico. Posteriormente fueron clasificados con tinciones histopatológicas e inmunohistoquímicas por diversos patólogos (ALLB, SN, IM, EM y FG) como: sarcoma de Ewing/PNET, condrosarcoma grado 2, condrosarcoma grado 3, osteosarcoma osteogénico, sarcoma sinovial monofásico fibroso y tumor del estroma gastrointestinal (GIST). Ver tabla 3.1.

Posteriormente un fragmento tumoral en fresco (de 0.2-0.3 cm³ de tamaño) es introducido en el tejido subcutáneo de la espalda de dos ratones nude (athymic Balb-c nude mice), machos de cuatro semanas en condiciones de esterilidad. Después el tumor se deja crecer *in vivo* hasta que alcanza un tamaño de entre 1 y 1.5 cm de diámetro máximo, momento en el que se sacrifican los ratones. De este tumor se escogen fragmentos para congelación, cultivo, microscopía electrónica, estudio histopatológico, biología molecular y se realiza la autopsia de los ratones sacrificados (fig.3.1). De este tumor en fresco se escogen nuevamente fragmentos de 0.2-0.3 cm³ de tamaño inoculándolos de nuevo en dos ratones atímicos sanos. Cada uno de estos procedimientos se denomina pase y los días que se tarda en realizar un pase de un ratón a otro se denomina velocidad de crecimiento tumoral en xenotrasplantes. Ver tabla 3.1.

Como se ha mencionado anteriormente se han elegido 6 modelos de sarcomas humanos. Realmente estos modelos no surgen de tumores primarios, si no ya de tumores previamente xenotrasplantados.

Tabla 3.1. Resumen datos clínicos de los tumores inoculados en ratones nude utilizados en nuestro trabajo. NV: no valorable.

	Fecha de inoculación	Edad(años)	Sexo	Localización	Pase	Velocidad de crecimiento (días)
ES	20/02/2004	6	Varón	cuello	13	132
Ch grado 2	11/07/2006	32	Varón	pala iliaca derecha	1	129
Ch grado 3	19/09/2006	cultivo	cultivo	cultivo	0	62
OS	02/12/2004	22	Varón	costilla	2	170
SS	27/03/2006	31	Varón	muslo derecho	11	175
GIST	01/03/2005	63	Varón	estómago	2	131

En la tabla hemos reflejado la fecha de inoculación del tumor original humano en el ratón. Sexo, edad y localización del tumor en el paciente. El número de pase de cuyo material se realizó nuestra experiencia que posteriormente describiremos y la velocidad de crecimiento del tumor en el ratón.

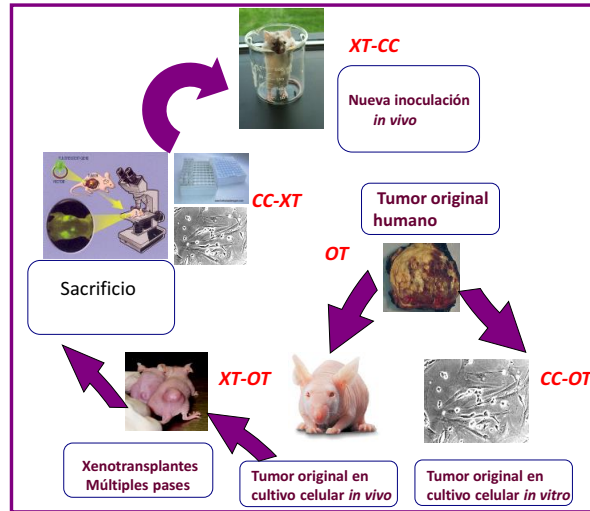


Figura 3.1. Esquema del estudio del tumor xenotrasplantado en cada pase de ratón. Xenotrasplantamos tumores de partes blandas y hueso procedentes de humanos en ratones nude obteniendo material para estudio histopatológico, cultivo, ME y nuevos xenotrasplantes (pases).

Para llevar a cabo cada una de nuestras experiencias se efectuaron implantes subcutáneos del sarcoma humano en fresco (de 0.2-0.3 cm³ de tamaño) en la espalda de 14 ratones atímicos (athymic Balb-c nude mice), machos de cuatro semanas en condiciones de esterilidad. Dichos animales se sacrificaron por parejas a las 24h, 48h, 96h, 7, 14, 21 y 28 días tras el xenoinjerto, siguiendo el esquema de la figura 3.2. En el momento del sacrificio, se obtuvo en condiciones de esterilidad, tejido tumoral en fresco y plasma murino a partir de los cuales se llevaron a cabo los estudios histológicos, inmunofenotípicos y moleculares que mostramos en la figura 3.1.

MODELO EXPERIMENTAL

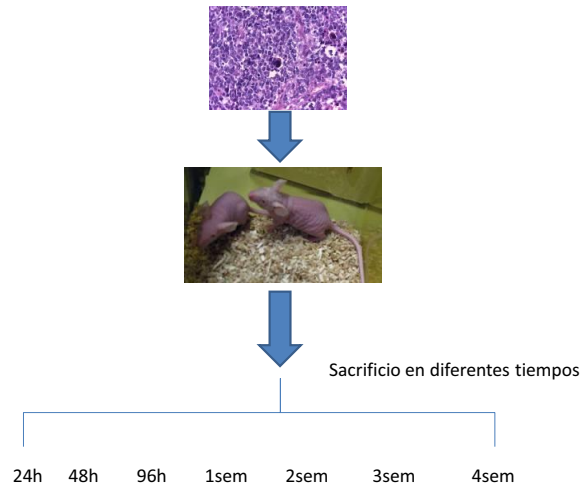


Figura 3.2. Esquema del modelo de experiencia realizada en ratones nude. Realizamos modelos experimentales con 6 tipos de tipos de tumores, xenotrasplantándolos a 14 ratones nude al mismo tiempo y que son sacrificados posteriormente en diferentes tiempos (24h, 48h, 96h, 1sem, 2sem, 3sem y 4sem) por parejas.

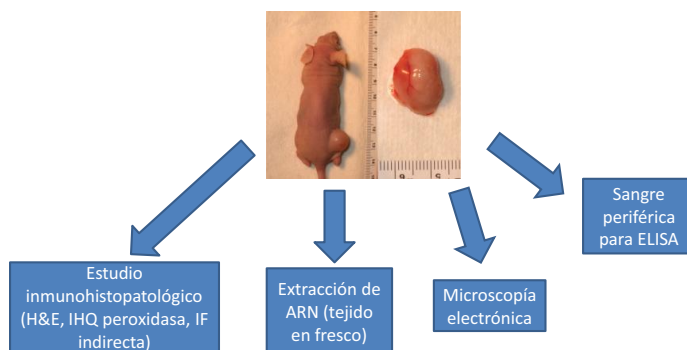


Figura 3.3. Esquema de recogida del xenoinjerto tras sacrificio. Tras el sacrificio de los ratones de los modelos experimentales se recoge material tumoral para estudio inmunohistopatológico, tejido en fresco (ARN), ME y sangre murina (ELISA).

3.2.- Caracterización morfológica

La caracterización morfológica la realizamos sobre muestras de tejido tumoral fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina. En el caso del OS osteoblástico se decalcificó previamente a la fijación con formaldehído con ácido nítrico durante 6h. Se cortaron secciones de 3 µm en un microtomo y se montaron en portaobjetos con Poly-L-lisina para el estudio IHQ, como se detallará más adelante. Para el estudio morfológico, orientado al diagnóstico, se utilizaron técnicas convencionales de Hematoxilina-Eosina sobre cortes de parafina de 3 µm.

La hematoxilina-eosina es la técnica de tinción histológica convencional, en la que se emplea la hematoxilina (Merck co) para teñir el núcleo de azul y la eosina (Merck co), colorante ácido que tiñe el citoplasma de rojo a rosa. Brevemente, el protocolo de la tinción que se ha seguido se detalla a continuación:

-Incubamos las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de **desparafinar**, para que después sea más fácil la desparafinación que se realiza en xilol (Merck co) durante 5 min.

-Seguidamente, realizamos pases por etanol (Merck co) (90°/80°/70°) para **hidratar**, de 2 a 5 veces en cada uno. Una vez hidratadas las muestras, realizamos la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris, 5 minutos y enjuagamos con agua destilada 2 minutos (en forma de zambullidas).

-Para **decolorar**, sumergimos las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (Merck co) (un pase rápido). Lavamos con agua corriente y luego con hidróxido de amonio (Merck co). Nuevamente realizamos un lavado rápido con agua corriente.

-Para la **tinción citoplasmática**, sumergimos las muestras en eosina durante 4 minutos y lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas).

-**Deshidratamos** de nuevo con pases en etanol (70°/80°/90°), aproximadamente de 30 segundos cada uno. Finalmente aclaramos con xilol, 1 minuto.

-Para último, montamos con "entellan" y cubreobjeto y ya podemos **observar la laminilla** al microscopio.

Las muestras fueron revisadas por patólogos experimentados (ALLB, SN, IM y FG) y en este estudio se tuvieron en cuenta características, como: presencia de necrosis, distribución de capilares, interacción del tumor con el tejido circundante del huésped, con la zona de necrosis y vasos sanguíneos. Se excluyeron del estudio aquellas muestras que carecían de células tumorales no necrosadas.

3.3.- Inmunohistoquímica

3.3.1. IHQ convencional

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización de antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos, que utilizan una enzima conjugada como trazador. Por este motivo, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más una sustancia cromógena, lo que da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. La enzima peroxidasa es el “trazador” más comúnmente utilizado y empleado en técnicas con anticuerpos marcados directa o indirectamente.

La técnica empleada en nuestros casos fue la técnica de avidina-biotina-immunoperoxidasa (ABC) (DAKO®) con anticuerpos marcados indirectamente, en la que el anticuerpo secundario se une al primario que, a su vez, ya se ha unido al antígeno específico a estudio. La técnica ABC o complejo de avidina-biotina-peroxidasa ³⁵⁸, introduce una forma hipersensible para amplificar la señal de la reacción, sobre todo cuando los antígenos se encuentran en tejidos en parafina.

Para el estudio inmunohistoquímico, cada muestra se procesa con el método ABC con algunas modificaciones para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos utilizados (tabla 3.2). A continuación se detalla el procedimiento seguido:

- Las muestras se **desparafinan** calentándolas durante 12 a 24 horas a 37°C y 45 min en una estufa a 60°C. A continuación se sumergen en xilol durante 15 min a temperatura ambiente (pases de 5 min).

- Tras esta incubación, las muestras se **hidratan** con alcoholes de concentración decreciente (90-80-70%) y posteriormente se lavan con agua destilada. Se realiza un pretratamiento de recuperación antigénica introduciendo las secciones en una solución tampón específica (tampón citrato 10X, DAKO®) y

después en un autoclave (microclave selecta) hasta una presión atmosférica de 1,5 atmósferas durante cinco minutos. A continuación se llevan a cabo una descompresión y enfriamiento lento de los preparados.

- Con objeto de **inhibir la peroxidasa endógena**, las muestras se sumergen en una solución de agua oxigenada (97 volúmenes de metanol al 2% y 3 volúmenes de agua oxigenada) a temperatura ambiente durante 30min.

-Seguidamente, se **bloquea la colágena tisular** para evitar la unión de las inmunoglobulinas al estroma con suero de caballo (Gibco) al 20% durante 20min.

- Se voltean los preparados y se le añade el **anticuerpo primario** (CXCL9, CXCL10, CXCL1/2/3, CXCR2, CXCR3, VEGF, Flk-1, Flt1, Flt4, VE-CAD, PDGFRA, HIF-1 α y Ki67) (ver tabla 3.2) durante 45 min- 60min. a temperatura ambiente (dependiendo del anticuerpo).

- Las secciones histológicas se lavan 3 veces con tampón fosfato (PBS) (Cloruro de Sodio, Cloruro Potásico, 2 H₂O hidrogenfosfato de di- Sodio, dihidrogenofosfato de potasio) (Gibco) y se incuba seguidamente con el **anticuerpo secundario** durante 30 min, empleando el sistema LSAB-2 de DAKO®, cuya **solución 1** está constituida por una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-mouse y policlonales anti-rabbit biotinilados.

- A continuación, se lleva a cabo 3 lavados con PBS y se añade el **complejo avidina-biotina (solución 2** del sistema LSAB-2 de DAKO®) durante 30 minutos (este complejo se prepara con 30 min. de antelación).

- Seguidamente, se vuelven a lavar las preparaciones 3 veces con PBS y se procede al **revelado** de la reacción mediante una solución de *diaminobenzidina tetrahidroclohídrica* (DAB) (Sigma®) en un tampón de *trisclorhídrico* 0,2 M hasta un pH=7. Una vez ajustado el pH se añade la DAB y por último el agua oxigenada pura de 110 volúmenes (para 100ml de Tris se utilizan 75 mg de DAB y 50 microlitros de agua oxigenada). Durante el revelado, las preparaciones se protegen de la luz, metiéndolas en la estufa de 37°C durante 5 min, y al finalizar el revelado se lava con agua corriente.

- Se contrastan los núcleos con **hematoxilina de Harris** durante **30 segundos**, se deshidratan los cortes con alcoholes crecientes (70%-80%-90%) y finalmente se realizan varios pasos en xilol y se montan los cubreobjetos (Menzel-Glaser®) con "entellan" (Merck®).

- Cada uno de los anticuerpos fueron testados con tejidos controles positivos en cada uno de los procedimientos.

Tabla 3.2. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica convencional.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	RA	LOCALIZACIÓN	CASA COMERCIAL	CLON
CXCL9	1/100	AUTOCLAVE TAMPON CITRATO PH BAJO	CITOPLASMA	R&DSYSTEMS®	POLICLONAL
CXCL10	1/100	AUTOCLAVE TAMPON CITRATO PH BAJO	CITOPLASMA	R&DSYSTEMS®	POLICLONAL
CXCL1/2/3	1/200	AUTOCLAVE TAMPON CITRATO PH BAJO	CITOPLASMA	R&DSYSTEMS®	POLICLONAL
CXCR2	1/20	AUTOCLAVE TAMPON CITRATO PH BAJO	CITOPLASMA	ABCAM®	POLICLONAL
CXCR3	1/200	AUTOCLAVE TAMPON CITRATO PH BAJO	CITOPLASMA	ABCAM®	CLON 2Ar1
VEGF	1/100	AUTOCLAVE TAMPON PH ALTO (TRIS- EDTAPH9)	CITOPLASMA	NEOMARKERS®	CLON VG1
FLK-1 (VEGFR2)	1/400	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	CITOPLASMA	SANTA CRUZ®	POLICLONAL
FLT-1 (VEGFR1)	1/400	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	MEMBRANA	SANTA CRUZ®	POLICLONAL
FLT-4 (VEGFR3)	1/400	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	MEMBRANA	SANTA CRUZ®	POLICLONAL

Tabla 3.2. (cont)

ANTICUERPO	DILUCIÓN	REC. ANTIG.	LOCALIZACIÓN	CASA COMERCIAL	CLON
VE-CAD	1/50	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	MEMBRANA	SANTA CRUZ®	POLICLONAL
PDGFRA	1/100	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	MEMBRANA /CITOPLASMA	SANTA CRUZ®	POLICLONAL
HIF-1A	1/500	AUTOCLAVE TAMPON PH ALTO (TRIS- EDTAPH9)	CITOPLASMA	CHEMICON®	CLON H1ALPHA67
KI67	1/200	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	NUCLEAR	DAKO®	CLON MIB-1
VIMENTINA	1/300	AUTOCLAVE TAMPON PH BAJO (TRIS- EDTAPH6)	CITOPLASMA	NOVOCASTRA®	CLON V9
CD99	1/50	AUTOCLAVE TAMPON PH ALTO (TRIS- EDTAPH9)	MEMBRANA	DAKO®	CLON 12E7

3.3.2. Evaluación de la IHQ convencional.

La expresión de las diferentes quimiocinas, receptores y marcadores angiogénicos fue valorada por dos patólogos (ALLB y FG) utilizando una escala de 0 a 3. Siendo 0 la positividad de 0-5% de las células tumorales, 1 de 5-25%, 2 de 25-75% y 3 de 75-100%. En esta escala se valoró tanto el número de células positivas como la intensidad de la expresión. Ver gráficas en resultados. En el caso del Ki67, se valoró de 1 a 3, siendo 1, de 0 a 10% de células positivas, 2 de 10 a 20% y 3 más del 20% de células con núcleos positivos.

3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta nos permitió marcar dos proteínas con dos colores distintos, para cuantificar y localizar la expresión de las quimiocinas y sus receptores en las células tumorales y a su vez, con un marcador característico de ellas (vimentina y CD99). De esta forma, podemos visualizar en el mismo corte histológico en parafina la expresión de ligandos, receptores y proteínas tumorales. Escogemos en este caso el CD99 en el ES por ser un marcador característico de este tumor y la vimentina en el resto de tumores por ser el anticuerpo con especificidad del animal con el anticuerpo secundario fluorescente que tenemos. Los anticuerpos primarios que hemos utilizado han sido: CXCL9, CXCL10, CXCL11/2/3, CXCR2, CXCR3, vimentina y CD99.

Seguimos el protocolo de tinción de la casa comercial R&D Systems® y Abcam®:

- Las muestras se **desparafinan** calentándolas durante 12 a 24 horas a 37°C. A continuación se sumergen en xilol durante 15 min a temperatura ambiente (pases de 5 min).

- Tras esta incubación, las muestras se **hidratan** con alcoholes de concentración decreciente (90-70-50%) y posteriormente se lavan con agua destilada. Se realiza un pretratamiento de recuperación antigénica introduciendo las secciones en una solución tampón específica (tampón citrato 0,01M, a pH6.0) y después en un autoclave (microclave selecta) hasta una presión atmosférica de 1,5 atmósferas durante tres minutos. A continuación se llevan a cabo una descompresión y enfriamiento lento de los preparados. Tras enfriar, lavamos durante 10 min en agua destilada en dos pases de 5 min y luego en PBS 10 min también en dos pases de 5 min.

- Ponemos los anticuerpos primarios diluyéndolos con PBS/BSA 1% (ver tabla) y los incubamos durante toda la noche (14-20h) en cámara húmeda.

- Lavamos las muestras en PBS durante 15 min en tres pases de 5 min.

- Ponemos los anticuerpos secundarios marcados con moléculas fluorescentes (Alexa-fluor®) (ver tabla 3.2.), diluyéndolos con PBS/BSA 1%.

Los anticuerpos secundarios los incubamos durante 60 min en oscuridad y en cámara húmeda.

- Lavamos en PBS durante 15 min en pases de 5 min.
- Montamos las muestras con Slowfade de Invitrogen® y las sellamos con esmalte ungueal, las mantenemos en oscuridad y en frío (3-4°C) hasta verlas y fotografiarlas en el microscopio confocal (Olympus® FV1000).

Las combinaciones de los anticuerpos en los estudios de IF indirecta fueron en el ES: CXCL9 (Alexa-Fluor® 633nm)-CD99(Alexa-Fluor® 488nm); CXCL10(Alexa-Fluor® 633nm)-CD99(Alexa-Fluor® 488nm); GRO(Alexa-Fluor® 633nm)-CD99(Alexa-Fluor® 488nm); CXCR2(Alexa-Fluor® 488nm)-GRO(Alexa-Fluor® 633nm); CXCR3(Alexa-Fluor® 488nm)-CXCL9(Alexa-Fluor® 633nm); CXCR3(Alexa-Fluor® 488nm)-CXCL10(Alexa-Fluor® 633nm).

En el resto de sarcomas estudiados las combinaciones fueron: CXCL9(Alexa-Fluor® 633nm)-VIMENTINA(Alexa-Fluor® 488nm); CXCL10(Alexa-Fluor® 633nm)-VIMENTINA(Alexa-Fluor® 488nm); GRO(Alexa-Fluor® 633nm)-VIMENTINA(Alexa-Fluor® 488nm); CXCR2(Alexa-Fluor® 488nm)-GRO(Alexa-Fluor® 633nm); CXCR3(Alexa-Fluor® 488nm)-CXCL9(Alexa-Fluor® 633nm); CXCR3 (Alexa-Fluor® 488nm)-CXCL10 (Alexa-Fluor® 633nm).

Tabla 3.3. Anticuerpos secundarios inmunofluorescentes utilizados.

Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial	Animal
Alexa-fluor®488	1/300	Invitrogen®	cabra
Alexa-fluor®633	1/300	Invitrogen®	cabra
Alexa-fluor®633	1/300	Invitrogen®	burro
Alexa-fluor®488 anti-human CXCR2	1/20	BioLegend®	ratón

La concentración de cada uno de los anticuerpos inmunofluorescentes se testó sobre tejidos control incluidos en parafina.

3.3.4. Evaluación de la IF indirecta.

La expresión de las diferentes quimiocinas y receptores fue valorada por dos patólogos (ALLB y FG) utilizando una escala de 0 a 3. Siendo 0 la positividad de 0-5% de las células tumorales, 1 de 5-25%, 2 de 25-75% y 3 de 75-100%. En esta escala se valoró tanto el número de células positivas como la intensidad de la expresión. Ver gráficas en resultados.

3.4.-Estudios de biología molecular

Para los estudios de biología molecular realizamos un estudio de expresión génica de 96 genes relacionados con la proliferación y angiogénesis utilizando la tecnología RT-PCR de las tarjetas microfluídicas de baja densidad. Para ello en primer lugar se procedió a la extracción de ARN a partir del tejido tumoral xenotrasplantado, seguida de una cuantificación del ARN obtenido, una retrotranscripción inversa y finalmente una cuantificación en tiempo real de la expresión génica. A continuación se exponen los procesos que se han llevado a cabo.

3.4.1. Aislamiento de ARN a partir de tejido en fresco.

Con el objetivo de realizar la RT-PCR con garantías de éxito es necesario contar con un ARNm de la mayor calidad posible. Debido a la conformación tridimensional del ARN y que no tiene una doble cadena que lo estabilice, se trata de una molécula muy lábil siendo afectada por la temperatura y la presencia de RNasas, unas proteínas bastante ubicuas.

Para la extracción de ARN se emplea el Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). Este procedimiento básicamente consta de una digestión con proteinasa K, un paso de digestión con ADNasas y una serie de lavados. Todo el proceso se lleva a cabo reteniendo el ARN en un filtro de fibra de vidrio incluido en una columna. A continuación se detalla el protocolo empleado:

1. Sometemos a digestión enzimática, con 4 μ l de proteinasa K, entre 50-200 mg de tejido en 400 μ l de tampón de lisis proporcionado por el fabricante.
2. La solución de digestión se incuba a 50°C 3h vorteadando ocasionalmente hasta que se alcanza la digestión completa.
3. Añadimos 480 μ l de Isolation additive. A continuación vorteamos.
4. Añadimos 1100 μ l de etanol (100%) y mezclar bien con la pipeta.
5. Montamos la columna en un tubo de recogida suministrado en el kit, pasar 700 μ l de la mezcla, centrifugar 1 min. a 10000 rpm y desechar el líquido que queda en el tubo.
 6. Repetimos el paso 15 hasta haber pasado todo el líquido.
 7. Lavamos con 700 μ l de la solución Wash 2/3.
 8. Centrifugamos 30 seg. a 10000 rpm.
 9. Eliminamos líquido.
 10. Lavamos con 500 μ l de solución wash 2/3.
 11. Centrifugamos 30 seg. a 10000 rpm.
 12. Eliminamos líquido.
 13. Damos spin de 30 seg. para acabar de secar.
 14. Preparamos el Mix para la digestión enzimática con ADNasa:
 - i. 6 μ l de 10x Dnase buffer.
 - ii. 4 μ l Dnase .
 - iii. 50 μ l agua libre de ADNasas.
 15. Añadimos 60 μ l del mix a la columna e incubar 30 min. a temperatura ambiente.

16. Lavamos con 700 μ l de la solución Wash 1.
17. Incubamos 1 min. a temperatura ambiente.
18. Centrifugamos 30 seg. a 10000 rpm.
19. Desechamos el líquido.
20. Lavamos con 500 μ l de la solución Wash 2/3.
21. Centrifugamos 30 seg. a 10000 rpm.
22. Desechamos el líquido.
23. Repetimos los pasos 30-32.
24. Pasamos la columna a un tubo colector limpio y añadir 30 μ l de agua libre de RNasas a temperatura ambiente.
25. Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
26. Centrifugamos 1 min. a 14500 rpm.
27. Repetimos la elución con otros 30 μ l (que harían un volumen total de elución de 60 μ l).
28. Hacemos electroforesis con 5 μ l el producto en un gel de agarosa al 1% 90V, 30 min., con el fin de chequear la integridad del ARN.

3.4.2. Cuantificación de la concentración de ARN mediante espectrofotometría

La concentración del ARN se midió en un espectrofotómetro Nanodrop-1000, mediante la absorción de luz UV con una longitud de onda de 260 nm. La contaminación con proteínas se mide con el ratio de absorbancias a 260/280 nm, considerándose adecuado un ratio de 1,8 a 2. En la figura 3.4. se observa la cuantificación de una de las muestras estudiadas.

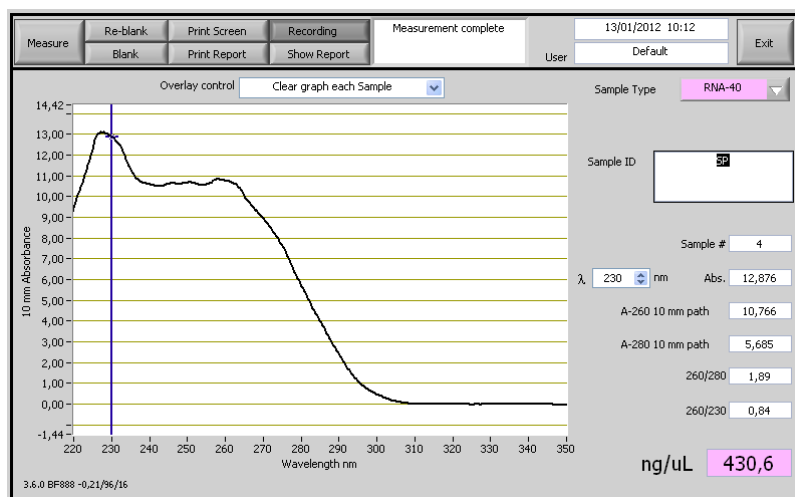


Figura 3.4. Cuantificación de una muestra de ARN obtenido de tejido criopreservado en un espectrofotómetro ND-1000.

3.4.3. Testado de la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa.

Como control de calidad adicional, se puede medir la integridad del ARN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para la elaboración del gel de agarosa al 1% se pesa la cantidad de agarosa necesaria en la balanza de precisión y se introduce en un erlenmeyer. A continuación se añade el volumen preciso (según el molde usado) de tampón TBE 0.5X y se calienta en microondas hasta que se diluya la agarosa. Se añaden los peines en el molde y se vierte la solución de agarosa y tampón. Acto seguido se añade una gota de bromuro de etidio y se deja enfriar y solidificar antes de su uso.

En cada uno de los pocillos del gel se cargan 5 μ l (o aproximadamente 1 μ g) del eluido de ARN y se le somete a un campo eléctrico de 90 V durante 15 minutos. A

continuación se visualiza el gel en un transiluminador UV con una cámara fotográfica acoplada. En un ARN bien conservado se deben observar dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S (Figura 3.5.).

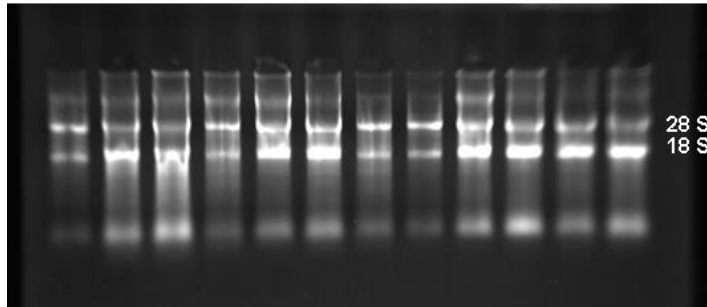


Figura 3.5. Perfil electroforético del ARN obtenido de la extracción a partir de tejido criopreservado resuelto en un gel de agarosa al 1%. En la parte derecha de la figura se pueden apreciar las marcas que indican la presencia de las bandas ribosomales 28S y 18S, cuya presencia nos indica la integridad del ARN extraído.

3.4.4. Transcripción inversa (RT-PCR) y cuantificación de expresión génica.

La transcripción inversa o retrotranscripción (RT) es un proceso que genera una cadena de ADNc de simple cadena a partir de ARNm, de cadena sencilla, que actúa como secuencia 'molde' y una polimerasa de origen retroviral denominada transcriptasa inversa.

Para llevar a cabo la reacción de RT se empleó un termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems®).

Para la cuantificación de la expresión de los genes que nos ocupan, adoptamos una técnica de RT-PCR en dos pasos. En el primero, seguimos una estrategia basada en primers hexámeros al azar, que servirán de cebadores para la transcriptasa reversa para producir una librería de ADNc (RT). Para llevar a cabo esta reacción, empleamos el kit High Capacity cDNA reverse transcription kit

(Applied Biosystems®) aplicando el siguiente protocolo de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial:

1.- Descongelamos todos los reactivos necesarios (detallados en la tabla 3.4.)

2.- Preparamos la mezcla de reacción multiplicando el volumen de cada reacción por el número de casos que vayamos a retrotranscribir más un 10% adicional para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 3.4. Composición de la mezcla de reacción de la RT.

Reactivo	Volumen (µl) por reacción	Concentración
RT Buffer	6.0	10X
dNTP Mix (100 mM)	2.4	25X
RT random primers	6.0	10X
Multiscribe™ Reverse Transcriptase (20 U/µl)	3.0	20 U
Inhibidor de RNasas (50 U/µl)	3.0	50 U
Agua libre de RNasas	Ajustar a 60 µl	
ARN	400 ng	

Total por reacción (μl)	60
--------------------------------	----

3.- Vorteamos y centrifugamos brevemente la mezcla de reacción.

4.- Se añade el volumen de reacción correspondiente a cada tubo de 200 μl.

5.- Añadimos el volumen adecuado de ARN (el volumen equivalente a 400 ng de ARN total) y rotular los tubos

6. Introducir los tubos en el termociclador y cargar el siguiente programa de temperaturas (tabla 3.5).

Tabla 3.5. Condiciones de la reacción de RT en cuanto a temperatura y tiempos de incubación.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

7.-El ADNc obtenido se almacena a -20°C hasta el momento de su uso.

3.4.5. PCR cuantitativa.

La expresión de los genes incluidos en el presente estudio se llevó a cabo utilizando la tecnología de sondas TaqMan y tarjetas microfluídicas de baja densidad (Applied Biosystems®).

En la tabla 3.6 se especifican los genes estudiados. Entre los genes incluidos en el estudio destacamos: promotores e inhibidores específicos de la angiogénesis (5); factores de crecimiento y receptores (43); citocinas y quimiocinas (15); moléculas de adhesión (5); proteínas de la matriz, proteasas e inhibidores (17); factores de transcripción (6); otros (5).

Tabla 3.6. Genes y ensayos incluidos en la matriz de baja densidad para el estudio de expresión de factores angiogénicos y de proliferación por RT-PCR cuantitativa.

N	Símbolo del gen	Referencia del ensayo (Applied Biosystems)	Amplicon tamaño (pb)	OMIM
Promotores e inhibidores específicos				
1	<i>AMOT (angiomotin)</i>	Hs00611096_m1	65	300410
2	<i>ANG (angiogenina)</i>	Hs00265741_s1	91	105850
3	<i>ANGPT1 (angiopoietin-1)</i>	Hs00181613_m1	87	601667
4	<i>ANGPT2 (angiopoietin-2)</i>	Hs00169867_m1	73	601922
5	<i>CHGA (Vasostatin/Chromogranin-A)</i>	Hs00154441_m1	115	118910
Factores de crecimiento y receptores				
6	<i>Ephrin 2A (EFNA2)</i>	Hs00154858_m1	89	602756
7	<i>Ephrin-A5 (EFNA5)</i>	Hs00157342_m1	98	601535
8	<i>Ephrin-B2 (EFNB2)</i>	Hs00187950_m1	63	600527
9	<i>EPHB4 (Ephrin B4)</i>	Hs00174752_m1	82	600011
10	<i>FGF1 (aFGF)</i>	Hs00265254_m1	65	131220
11	<i>FGF2 (bFGF)</i>	Hs00266645_m1	82	134920
12	<i>FGF4</i>	Hs00173564_m1	53	164980
13	<i>FGF6</i>	Hs00173934_m1	64	134921
14	<i>FGF7</i>	Hs00384281_m1	85	148180
15	<i>FGFR1</i>	Hs00241111_m1	81	136350
16	<i>FGFR2 (KGRF)</i>	Hs00240792_m1	77	176943
17	<i>FGFR3</i>	Hs00179829_m1	104	134934
18	<i>FGFR4</i>	Hs00242558_m1	74	134935
19	<i>PDGFA</i>	Hs00234994_m1	93	173430
20	<i>PDGFB</i>	Hs00234042_m1	80	190040
21	<i>PDGFRA</i>	Hs00183486_m1	92	173490
22	<i>PDGFRB</i>	Hs00182163_m1	86	173410
23	<i>PF4 (Platelet factor 4)</i>	Hs00236998_m1	86	173460
24	<i>TGFA</i>	Hs00177401_m1	95	190170
25	<i>TGFB1</i>	Hs00171257_m1	63	190180
26	<i>TGFB2</i>	Hs00234244_m1	92	190220
27	<i>TGFB3</i>	Hs00234245_m1	75	190230
28	<i>TGFBR1</i>	Hs00610319_m1	126	190181
29	<i>TGFBR2</i>	Hs00234253_m1	70	190182
30	<i>TGFBR3</i>	Hs00234257_m1	60	600742
31	<i>FIGF (VEGFD)</i>	Hs00189521_m1	130	300091
32	<i>FLK1 (KDR)</i>	Hs00176676_m1	84	191306
33	<i>FLT1 (VEGFR2)</i>	Hs00176573_m1	55	165070

34	PGF	Hs00182176_m1	56	601121
35	VEGF	Hs00173626_m1	77	192240
36	VEGFB	Hs00173634_m1	69	601398
37	VEGFC	Hs00153458_m1	126	601528
38	FLT4 (VEGFR3)	Hs01047679_m1	89	136352
39	CD36	Hs00169627_m1	77	173510
40	EDG1	Hs00173499_m1	102	601974
41	EGF	Hs00153181_m1	95	131530
42	EGFR	Hs00193306_m1	69	131550
43	GRO1 (CXCL1)	Hs00236937_m1	70	155730
44	HGF (Scatter factor)	Hs00300159_m1	92	142409
45	IGF1	Hs00153126_m1	70	147440
46	IGF1R	Hs00181385_m1	77	147370
47	TEK (Tie-2)	Hs00176096_m1	82	600221
48	TIE1	Hs00178500_m1	74	600222
Citocinas y quimiocinas				
49	CSF3	Hs00236884_m1	78	138970
50	IFNA1	Hs00256882_s1	115	147660
51	IFNB1	Hs00277188_s1	134	147640
52	IFNG	Hs00174143_m1	79	147570
53	IL10	Hs00174086_m1	119	124092
54	IL12A	Hs00168405_m1	67	161560
55	IL8	Hs00174103_m1	101	146930
56	MDK	Hs00171064_m1	102	162096
57	NRP1 (neuropilin-1)	Hs00826129_m1	97	602069
58	PRL (prolactin)	Hs00168730_m1	76	176760
59	PTN (pleiotrophin)	Hs00383235_m1	76	162095
60	SCYA2	Hs00234140_m1	101	158105
61	SPARC	Hs00277762_m1	122	182120
62	TNFA	Hs00174128_m1	80	191160
63	TNFSF15 (VEGI)	Hs00353710_s1	97	604052
Moléculas de adhesión				
64	CDH5 (VE-Cadherin)	Hs00174344_m1	66	601120
65	ITGA5 (integrin α 5)	Hs00233743_m1	86	135620
66	ITGAV (integrin α V)	Hs00233808_m1	64	193210
67	ITGB3	Hs00173978_m1	89	173470
68	PECAM1 (CD31)	Hs00169777_m1	65	173445
Proteínas de la matriz, proteasas e inhibidores				
69	ADAMTS1 (METH1)	Hs00199608_m1	68	605174
70	ADAMTS8 (METH2)	Hs00199836_m1	59	605175
71	COL18A1 (LOC51695 /endostatin)	Hs00181017_m1	72	120328
72	FN1 (fibronectin)	Hs00415006_m1	86	135600
73	HPSE (heparanase)	Hs00180737_m1	59	604724
74	MMP2	Hs00234422_m1	83	120360
75	MMP9	Hs00234579_m1	54	120361
76	MSR1	Hs00234012_m1	80	153622
77	PLAU (uPA)	Hs00170182_m1	104	191840
78	SERPINB5 (maspin)	Hs00184728_m1	104	154790
79	SERPINF1 (PEDF)	Hs00171467_m1	88	172860
80	THBS1	Hs00170236_m1	109	188060
81	THBS2	Hs00170248_m1	87	188061

82	<i>THBS3</i>	Hs00200157_m1	85	188062
83	<i>THBS4</i>	Hs00170261_m1	98	600715
83	<i>TIMP1</i>	Hs00171558_m1	104	305370
85	<i>TIMP2</i>	Hs00234278_m1	73	188825
Factores de transcripción				
86	<i>ERBB2</i>	Hs00397754_m1	58	164870
87	<i>ETS1</i>	Hs00428287_m1	92	164720
88	<i>HIF1A</i>	Hs00153153_m1	76	603348
89	<i>ID1</i>	Hs00357821_g1	62	600349
90	<i>ID3</i>	Hs00171409_m1	129	600277
91	<i>MADH1 (SMAD1)</i>	Hs00195432_m1	67	601595
Otros genes relacionados				
92	<i>ENG (endoglin)</i>	Hs00164438_m1	81	131195
93	<i>PTGS1 (cox-1)</i>	Hs00168776_m1	109	176805
94	<i>PTGS2 (cox-2)</i>	Hs00153133_m1	75	600262
95	<i>B2M (Housekeeping)</i>	Hs99999907_m1	75	109700
96	<i>18S (Housekeeping)</i>	Hs99999901_s1	187	180473

Para el estudio de los niveles de expresión de los genes, se ha procedido a realizar una PCR cuantitativa en un termociclador ABI 7900 HT fast (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) que es capaz de hacer lecturas de fluorescencia en cada ciclo de la amplificación. La característica de esta amplificación es que en la reacción, además de los primers específicos, se añaden unas sondas diseñadas para hibridar en el centro de la secuencia amplificada (sondas TaqMan) y una polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa. Las sondas TaqMan se caracterizan por contener una molécula fluorófora y una atenuadora de fluorescencia (*quencher*) que actúan por transferencia electrónica de la resonancia (FRET), de forma que no emite fluorescencia. En cada ciclo de PCR las sondas se hibridan a las monohebras de ADN que se han formado en ciclos anteriores y que representan un molde para la nueva síntesis de ADN. La polimerasa incorpora nucleótidos en dirección 3'-5' hasta que llega al punto en que se encuentra con la sonda TaqMan hibridada en la dirección 5'-3' (sentido complementario). En este momento activa su función 5'-3' exonucleasa que degrada la sonda, separando fluoróforo y atenuador, emitiéndose así fluorescencia. La monitorización de este cambio de fluorescencia permite inferir la cantidad inicial de ADN en nuestra muestra (figura 3.6).

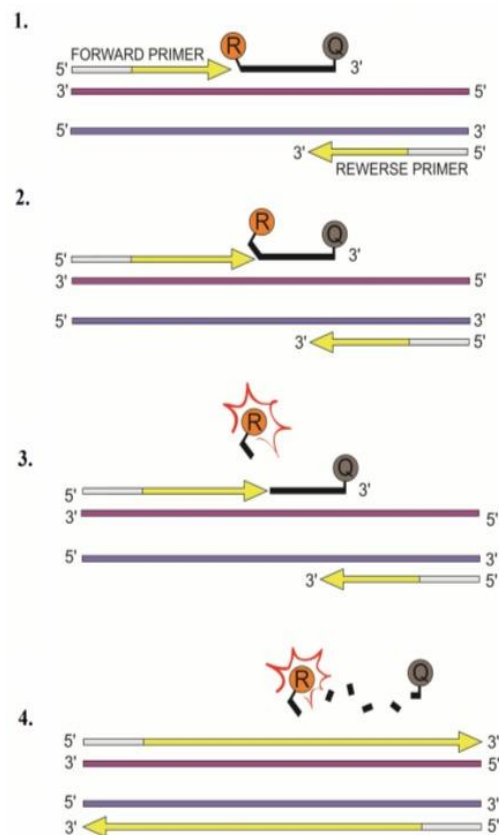


Figura 3.6. Mecanismo de actuación de las sondas TaqMan usadas para la detección de secuencias génicas en la PCR en tiempo real. Imagen tomada de <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/real-time-pcr>.

Además de las precauciones generales adoptadas para la PCR cualitativa, hay otra adicional para la reacción cuantitativa: los productos de PCR además de cortos deben ser homogéneos para garantizar una mayor reproducibilidad y comparación fiable de los resultados ^{359, 360}.

3.4.5.1.- Cuantificación relativa por RT-PCR cuantitativa.

Para analizar los niveles de expresión de genes implicados en la angiogénesis tumoral en las primeras fases del crecimiento, empleamos la

modalidad de qPCR relativa. En ésta se cuantifica la expresión relativa de nuestra muestra con respecto a una población control (tumor previo al trasplante). Esta transformación se lleva a cabo con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Es un modelo que no requiere el cálculo de las eficiencias de la reacción, ya que asume que es el 100% en la cuantificación del gen problema y del gen control ³⁶¹. Este método se aplica para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica estudiando la relación entre los valores del ciclo umbral (Ct) de la muestra y los valores Ct del control.

En las tablas 3.7 y 3.8 se muestran la mezcla de la reacción el programa de temperaturas y los assays (ABI) usados en la qPCR relativa:

Tabla 3.7. Mezcla de reacción para la qPCR relativa en modo fast.

Reactivo	Volumen (µl) por reacción	Concentración
Taq Man Master Mix Fast (ABI)	5.0	2X
Assay	1.0	10X
ADNc	2.0	
Agua libre de RNasas (DEPC)	2.0	
Volumen final	10.0	

Tabla 3.8. Condiciones de la qPCR para cuantificación relativa (modo fast)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	20 segs	1
95°C	3 segs	40
60°C	30 segs	

3.4.5.2.- Método de análisis de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los datos obtenidos en la PCR cuantitativa están expresados en Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral), este valor indica el ciclo en el que el termociclador en tiempo real empieza a detectar fluorescencia en la fase exponencial de la cinética de amplificación. Por tanto, este valor nos da una medida indirecta e inversa de la cantidad inicial de ADNc y por tanto de ARNm existente en nuestra muestra, de modo que a mayor Ct menor cantidad de ADNc y por tanto menos se expresa el gen estudiado. Una forma de calcular la expresión relativa de un determinado gen es utilizar el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que consiste en una transformación matemática para convertir los datos relativos en absolutos^{362, 363 361}. Este segundo método es el que se utiliza en este trabajo para medir la expresión génica de los 96 genes estudiados.

3.4.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Muestras de sangre fueron tomadas de todos los ratones nude sacrificados en los diferentes tiempos (fig.3.2) en cada uno de los seis modelos experimentales. El suero se evaluó para niveles de VEGF en humanos y ratones usando los kits de RayBio® VEGF ELISA (ELH-VEGF-001 y ELM-VEGF-001 para humanos y ratones respectivamente) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La lectura colorimétrica se realizó en el lector de placas MultiRead 400 (Anthos).

A continuación se describe brevemente el procedimiento llevado a cabo.

Para cada uno de los ensayos se parte de las mismas cantidades de suero animal (200 µl aproximadamente) sin la posibilidad de duplicados.

3.4.6.1.- VEGF humano y murino.

Tanto el kit RayBio ® Human VEGF ELISA como el RayBio ® Mouse VEGF ELISA (Enzyme-Linked Método Inmunoenzimático) son ensayos *in vitro* inmunoenzimáticos para la medición cuantitativa de VEGF humano y de ratón respectivamente, tanto en suero, plasma, sobrenadantes de cultivos celulares y en orina. Este ensayo emplea un anticuerpo específico para el VEGF humano (ELH-VEGF-001) o de ratón (ELM-VEGF-001) cubierto sobre una placa de 96 pocillos. Los patrones y las muestras son pipeteadas en los pocillos y el VEGF presente en la muestra se unirá a los pocillos por el anticuerpo inmovilizado. Luego, los pocillos se lavan y se añade el anticuerpo VEGF antihumano o antiratón biotinilado. Después de lavar el anticuerpo anti-VEGF no unido, se pipetea en los pocillos estreptavidina conjugada con HRP. Se lavan de nuevo los pocillos, se añade una solución de sustrato TMB a los pocillos y aparece una intensidad de color en proporción a la cantidad de VEGF unido. La solución de parada cambia el color de azul a amarillo, y la intensidad de color es medida en 450nm.

El kit de ELISA no muestra reactividad cruzada con ninguna de las citocinas testadas (e.g., angiogenina humana, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , leptina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC,

MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ , PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF- β , TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , TNF- β , TPO).

3.4.6.1.1.- REACTIVOS

1. Microplaca de VEGF(ítem A): 96 pocillos revestidos con VEGF antihumano (ELH-VEGF-001) o antiratón (ELM-VEGF-001).
2. Concentrado de tampón lavado (20x)(ítem B): 25ml de solución concentrada 20x.
3. Estándares (ítem C): 2 viales de VEGF recombinante humano (ELH-VEGF-001) o ratón (ELM-VEGF-001).
4. Diluyente A (ítem D): 30ml, 0.09% de azida de sodio como conservante.
5. Diluyente B(ítem E): 15ml de tampón concentrado 5x.
6. Detección del anticuerpo VEGF(ítem F): 2 viales de anti-VEGF biotinilado (cada vial es suficiente para el ensayo con media microplaca).
7. Concentrado de HRP-estreptavidina (ítem G): 8 μ l de HRP-estreptavidina concentrada 15,000x.
8. Sustrato reactivo TMB de un paso (ítem H): 12ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina(TMB) en solución tamponada.
9. Solución de parada (ítem I): 8ml de ácido sulfúrico 2M.

3.4.6.1.2.- ALMACENAMIENTO

Puede almacenarse durante más de 5 meses a 2-8°C desde la fecha de producción. El estándar (proteína recombinante) debe almacenarse a -20°C o -80°C (se recomienda esta última) tras la reconstitución. Las microplacas abiertas de pocillos y los reactivos pueden almacenarse durante más de un mes de 2° a 8°C.

3.4.6.1.3.- MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS

Para llevar a cabo las pruebas de ELISA hiczo falta el siguiente material suplementario:

1. Microplaca lectora capaz de medir la absorbancia a 450nm [MultiRead 400 (Anthos)].
2. Pipetas de precisión para repartir volúmenes de 2 µl a 1ml (multicanal semielectrónica Eppendorff).
3. Pipetas ajustables de 1-25ml para preparar reactivos.
4. Cilindros graduados de 100ml y 1l.
5. Papel absorbente.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Ordenador con software para analizar los datos de ELISA.
8. Tubos para preparar estándares o diluciones muestra.

3.4.6.1.4.- PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Atemperar (18 - 25 ° C) todos reactivos y muestras antes de utilizar.
2. Preparación estándar: girar el vial del diluyente C, a continuación, se añade 400 µl de diluyente A (para muestras de suero / plasma) en el frasco C para preparar un estándar de 50ng/ml. Disolver el polvo a fondo con un movimiento suave. Añadir 180 µl de VEGF estándar del vial C, en un tubo con 320 µl de diluyente A para preparar 18000pg / ml solución estándar. Pipetear 400 µl de diluyente A en cada tubo. Luego se utiliza la solución estándar de reserva para realizar una serie de diluciones (fig.3.7). Mezclar cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia. El diluyente A sirve como el estándar cero (0pg/ml).

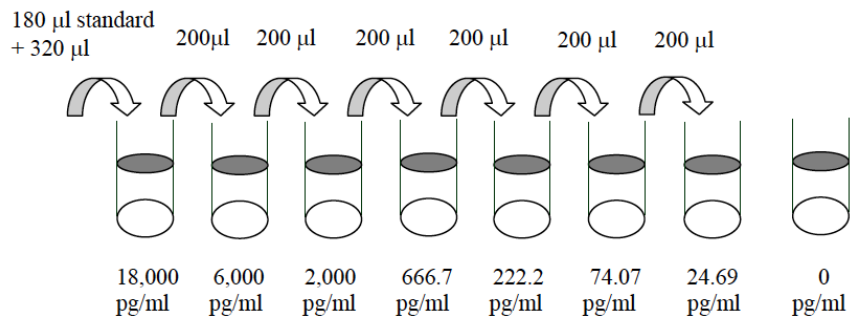


Figura 3.7. Esquema de modo de realización de las sucesivas diluciones para realizar las preparaciones o diluciones estándar.

3. Dilución muestra: si las muestras necesitan ser diluidas, el diluyente A (marcado D) se usa para la dilución de las muestras de suero/plasma.

4. Si el concentrado de lavado (20x) (item B) contiene cristales visibles, calentar a temperatura ambiente y mezclar suavemente hasta que se disuelva. Diluir 20 ml de tampón de lavado concentrado en agua desionizada o destilada para dar 400 ml de tampón de lavado 1x.

5. Girar el vial de detección de anticuerpos (item F) antes de su uso. Añadir 100µl de diluyente B 1x en el vial para preparar un concentrado de anticuerpo de detección. Pipetear arriba y abajo para mezclar suavemente (el concentrado puede almacenarse a 4 ° C durante 5 días). El concentrado de detección de anticuerpos debe ser diluido 100 veces con diluyente B 1x.

6. Girar el vial de concentrado HRP-estreptavidina (item G) pipetear arriba y abajo para mezclar suavemente antes de su uso. El concentrado HRP-estreptavidina debe ser diluido 15000 veces con el diluyente B 1x.

3.4.6.1.5.- PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Atemperar todos los reactivos y muestras (18 - 25 ° C) antes de utilizar.
2. Añadir 100 µl de cada estándar y muestra en los pocillos apropiados. Se cubre bien y se incuba durante 2,5 horas durante toda la noche a 4 ° C con agitación suave.
3. Después del período de incubación, se desecha la solución y se lava 4 veces con solución de lavado 1x (200 µl en cada uno).
4. Añadir 100 µl de anticuerpo biotinilado preparado 1x a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.
5. Desechar la solución y lavar 4 veces con solución de lavado 1x. Repetir el lavado como en el paso 3.
6. Añadir 100 µl de solución de estreptavidina preparada a cada pocillo. Incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
7. Desechar la solución y lavar 5 veces con solución de lavado 1x. Repetir el lavado como en el paso 3.
8. Añadir 100 µl de TMB reactivo de un solo paso (item H) a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad agitando suavemente.
9. Añadir 50 µl de solución de parada (item I) a cada pocillo. Leer a 450 nm inmediatamente.

3.4.6.1.6.- CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcular la absorbancia media para cada conjunto de los estándares, los controles y las muestras, y restar el promedio de densidad óptica estándar cero. Trazar la curva estándar en papel logarítmico o usar el software apropiado, con nivel de concentración estándar en el eje x y la absorbancia en el eje y. Dibujar el mejor ajuste en línea recta a través de los puntos estándar. La dosis mínima detectable de VEGF es normalmente menos de 20pg/ml.

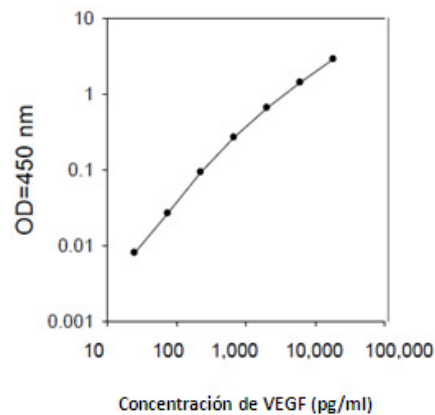


Figura 3.8. Curva estándar donde se representa la medida de absorbancia a 450nm de cada una de los puntos de la curva de concentración conocidos. Los valores de las concentraciones de las muestras de estudio se obtienen por extrapolación a las curvas obtenidas. Para cada experimento es necesaria la elaboración de una nueva curva estándar.

3.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de la matriz se realizaron utilizando el *Gene Expression Pattern Analysis Suite v3.1* (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

4. RESULTADOS

A continuación, enumeraremos y describimos con detalle cada una de las experiencias realizadas en los sarcomas incluidos en el estudio y describiremos los cambios tumorales que se producen en las primeras fases del crecimiento neoplásico tras el xenotrasplante a nivel morfológico con H&E, inmunohistoquímico utilizando tanto la técnica de peroxidasa como Inmunofluorescencia IF indirecta valorando los niveles de expresión de las quimiocinas (GRO, CXCL9 y CXCL10) y sus receptores (CXCR2 y CXCR3), así como de otros factores angiogénicos. Por último, describimos los niveles de expresión de genes relacionados con la angiogénesis por técnicas de biología molecular y estudiaremos la posible correlación con la expresión de citocinas anteriormente citadas.

4.1. SARCOMA DE EWING.

El tumor primario humano procede de un varón de 6 años de edad que presentaba una masa cervical.

El ES que utilizamos en nuestra experiencia es un ES/PNET convencional típico constituido por células pequeñas redondas y azules con escaso estroma tumoral. El tumor presenta un crecimiento difuso con abundantes áreas parcheadas de necrosis y vascularización. El perfil inmunohistoquímico muestra positividad franca para CD99 y vimentina, positividad débil para enolasa neuronal específica, sinaptofisina y S-100. Por otro lado, muestra negatividad para expresión de citoqueratinas, actina de músculo liso y desmina. Los estudios moleculares revelaron la característica traslocación *EWS/FLI1*.

El tumor fue inoculado en ratones nude generando sucesivos pases. Concretamente el tumor que escogimos para la experiencia provenía del pase número 13 de ratones nude.

4.1.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

A las **primeras 24h** tras el implante aparece una amplia zona central necrótica (core), rodeado de un anillo de células tumorales bien preservadas de 200 μm de grosor. Además, un anillo de células del huésped aparecen alrededor, se componen de células redondas y fusiformes, pero sin formación de nuevos vasos sanguíneos, acompañado de una hiperemia de los vasos murinos en contacto con el tumor. Se observa edema en el tejido celular peritumoral perteneciente al ratón. En el tumor se observan abundantes figuras de apoptosis, principalmente localizadas en un anillo de células localizadas entre el área central necrótica y el área periférica mejor conservada. En esta última área, persisten los vasos sanguíneos originales del tumor humano en el trasplante.

En resumen, en el tumor xenotrasplantado en esta primeras horas de injerto se distinguen 3 áreas: a) necrosis central, b) capa de células apoptóticas y c) un anillo de células tumorales bien preservadas (aproximadamente 20 capas de células tumorales que mide 200 μm de tamaño). Ver figura 4.1.1A y B.

A las 48h el tumor mantiene las tres áreas bien delimitadas, una zona central con necrosis, una zona de necrobiosis y otra de células bien preservadas de 20 células de espesor. La interfase entre el injerto y el tejido peritumoral murino muestra una infiltración de células redondas y fusiformes de células tipo mesenquimales así como vasos hiperémicos y una respuesta inflamatoria compuesta principalmente por células redondas linfoides.

A las 96h la histopatología permanece parecida, manteniéndose las alteraciones descritas ya en las 48h; sin embargo, la zona tumoral bien preservada muestra una disminución del número de células (alrededor de 10-15 células tumorales de espesor), aumentando el área de células apoptóticas y de necrosis en el área central. Aparece una proliferación de células mesenquimales que emigran desde la zona de interfase del tejido del huésped al interior del tumor y produciendo un patrón pseudolobulillar en el área periférica del tumor. Aisladas células fusiformes con núcleos densos y escaso citoplasma migran hacia el interior del tumor, estas células parecen las predecesores de la formación de nuevos vasos sanguíneos

intratumorales. En la periferia del tumor persiste una intensa hiperemia (fig.4.1.1C y D).

Una semana tras el implante, la histopatología en el injerto tumoral mantiene las alteraciones descritas previamente. Por tanto, la necrosis central decrece al compararlo con las observaciones previas (24, 48, 96 horas). El tumor muestra intussusception significativa de angioblastos agrupados o aisladas pero entremezcladas con las células tumorales en estrecha relación de contigüidad (vascular mimicry). Además, numerosas yemas vasculares aparecen a partir de capilares hiperémicos localizados en la periferia del tumor, en el estroma murino (fig.4.1.1E y F).

El tumor mantiene las 3 áreas bien delimitadas, un área central necrótica, un anillo de necrobiosis y una capa periférica de células bien conservadas de 20 capas de células tumorales. El tumor se encuentra bien delimitado y se observa una proliferación pseudoencapsulada inicial. En la interfase, una proliferación de células redondas y fusiformes aparecen a modo de células mesenquimales junto a mastocitos aislados. El tumor muestra abundantes células mesenquimales y hemangioblásticas en los campos de la interfase. Los brotes vasculares (vascular sprouting) aumentan tanto en la zona peritumoral como en la intratumoral. Al mismo tiempo, se encuentran varios capilares pequeños en el tumor rellenos de hematíes (fig.4.1.1E y F).

En la segunda semana la neoplasia está casi completamente remodelada mientras que la zona necrótica central se ha reabsorbido y la necrosis está ausente. Las células neoplásicas viables componen la totalidad del tumor, pareciéndose al tumor control. El tumor se encuentra aislado por una pseudocápsula del tejido huésped en la que se observan abundantes vasos capilares neoformados junto a angioblastos mesenquimales y células redondas como mastocitos.

En el tumor se encuentra una neoangiogénesis prominente con una proliferación de hemangioblastos, apareciendo nuevos capilares adyacentes o en contigüidad a las células tumorales.

A la cuarta semana, el tumor se encuentra totalmente remodelado y estabilizado mientras el ratón desarrolla una cápsula con células mesenquimales y una red de vasos capilares. La angiogénesis tumoral se asocia a un incremento en la vascularización intratumoral parecida a la existente en el tumor control (fig.4.1.1G y H).

En el estudio morfológico realizamos un recuento de mitosis en los diferentes tiempos. El recuento se realizó en cinco campos a gran aumento. Observamos que en las primeras 48h el tumor presenta un bajo índice proliferativo y aumenta progresivamente a partir de las 96h hasta el tumor control. Este dato se correlaciona con la tinción inmunohistoquímica de Ki67 como veremos posteriormente.

En el recuento mitótico surgieron varias complicaciones entre ellas la dificultad para distinguir figuras de apoptosis y mitosis en las primeras fases del desarrollo que junto a la variabilidad del área tumoral viable en los distintos tiempos, hace que dicha valoración no sea todo lo objetiva que debiera.

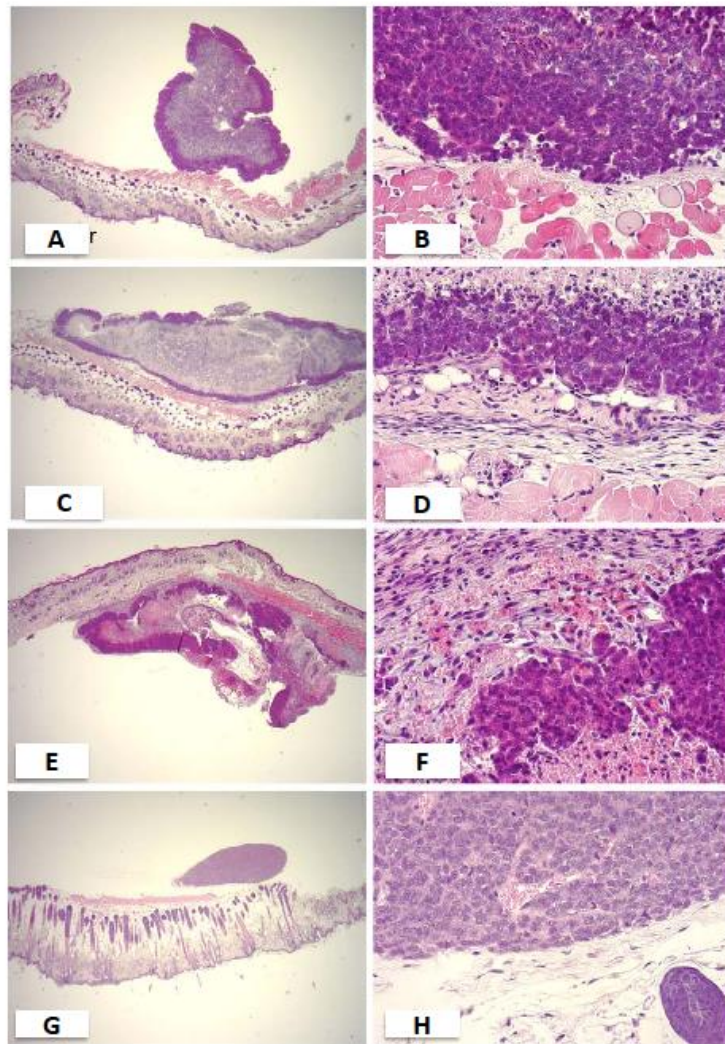


Figura 4.1.1. Progresión morfológica de los procesos de angiogénesis tumoral correspondiente al ES. **A**, xenotrasplante a las 24h con abundante necrosis central (macro-micro). **B**, implante tumoral a las 24h, con las tres áreas tumorales descritas anteriormente (200X). **C**, xenotrasplante a las 96h con adelgazamiento evidente de la capa de células tumorales viables (macro-micro). **D**, xenoinjerto a las 96h con presencia de un infiltrado inflamatorio linfoide con vasos capilares hiperémicos (200X). **E**, xenotrasplante a los siete días mostrando una ligera disminución de la zona de necrosis central (macro-micro). **F**, muestra del injerto en la primera semana postrasplante con abundantes células mesenquimales y angioblásticas peritumorales asociadas a células inflamatorias (200X). **G**, muestra del injerto tumoral a la cuarta semana postrasplante con ausencia de necrosis tumoral central (macro-micro). **H**, injerto tumoral a la cuarta semana en el que destaca una cápsula fibrosa peritumoral y vasos capilares intratumorales hiperémicos (200X).

4.1.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

A continuación se describen los resultados de la expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO junto a sus respectivos receptores CXCR3 y CXCR2. En primer lugar se expondrán los resultados con peroxidasa para a continuación destacar los resultados con inmunofluorescencia indirecta.

4.1.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.1.2.1.1. -CXCL9

En el modelo de sarcoma de Ewing analizado, la expresión de CXCL9 en las células tumorales es fundamentalmente citoplasmática. La positividad en general es de moderada a intensa, cuya variabilidad podemos verla en las figuras 4.1.2 y 4.1.6. La expresión alcanza su máximo a las 96h para disminuir progresivamente. Debemos reseñar que en general presenta una expresión sutilmente más intensa en las zonas tumorales perinecroticas y en contacto con el estroma murino (fig. 4.1.2B).

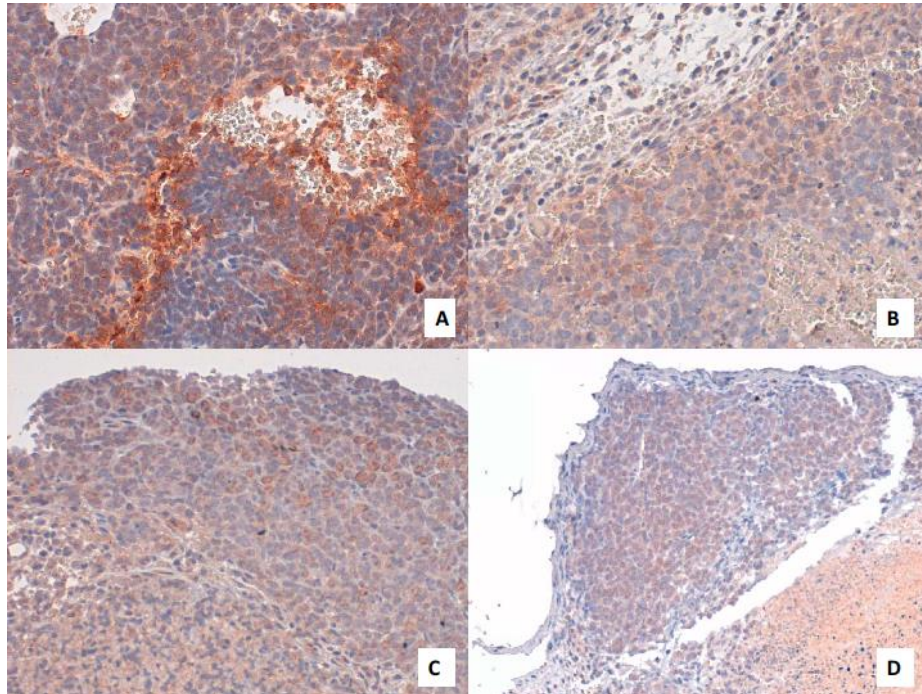


Figura 4.1.2. Expresión de CXCL9 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el ES. **A**, expresión intensa de CXCL9 en el tumor control con intensidad ligeramente mayor en las áreas perinecroticas (200X). **B**, expresión leve-moderada de CXCL9 a las 24h con expresión en las células estromales y células tumorales periféricas en contacto con el estroma (200X). **C**, expresión citoplasmática moderada-intensa de CXCL9 en la primera semana (200X). **D**, expresión intensa citoplasmática de CXCL9 en la 2 sem (100X).

4.1.2.1.2. -CXCL10

La expresión de esta quimiocina es citoplasmática y nuclear en las células neoplásicas. La positividad suele ser moderada en prácticamente todos los tiempos alcanzando su pico de expresión a las 48h, para disminuir progresivamente tras una fase de meseta (fig. 4.1.5). La expresión es bastante homogénea en todas las células aunque parece ser ligeramente más intensa en las áreas perinecroticas y adyacentes al estroma murino desde las 48h a la

primera semana postrasplante. En el resto de tiempos la expresión es más homogénea (fig.4.1.3).

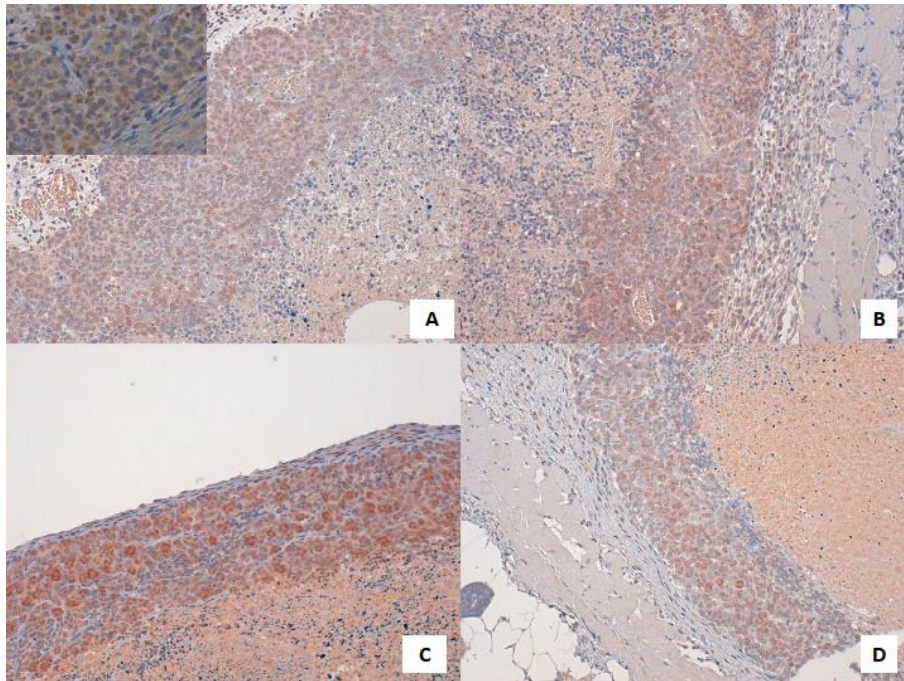


Figura 4.1.3. Expresión de CXCL10 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el ES. **A**, expresión moderada y nuclear de CXCL10 a las 24h (100X), expresión nuclear (detalle 630X). **B**, expresión intensa de CXCL10 tumoral y estromal a las 48h (100X). **C**, expresión intensa de CXCL10 a las 96h, con ligera positividad más intensa en el área periférica y perinecrotica (100X). **D**, expresión moderada de CXCL10 a las 2sem (100X).

4.1.2.1.3.-CXCR3

Expresión citoplasmática en las células tumorales, homogénea en todas ellas pero se observa una expresión heterogénea en los diferentes tiempos, presentando una positividad mayor en las primeras fases, observándose dos picos de expresión, uno a las 48h y el otro a la segunda semana. En la segunda

semana se observa mayor positividad en las células tumorales adyacentes al área de necrosis. Ver figura 4.1.4.

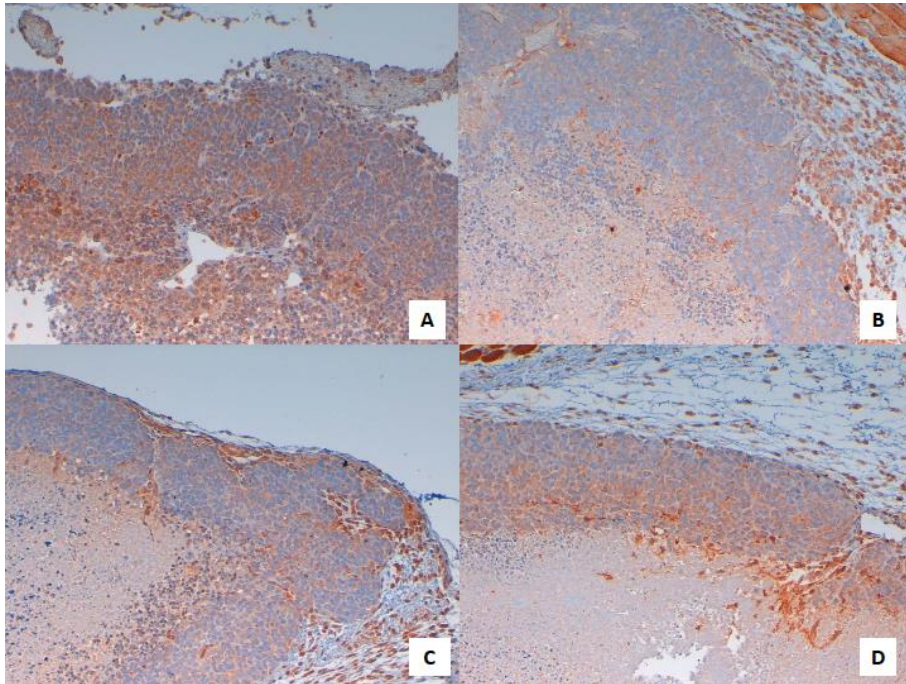


Figura 4.1.4. Expresión IHQ con peroxidasa de CXCR3 en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión intensa y homogénea de CXCR3 a las 24h (100X). **B**, expresión moderada y homogénea de CXCR3 a las 96h (100X). **C**, expresión moderada de CXCR3 a la 1sem con expresión del estroma murino peritumoral (100X). **D**, expresión moderada-intensa de CXCR3 a la 2sem, levemente más intensa en las áreas perinecroticas (100X).

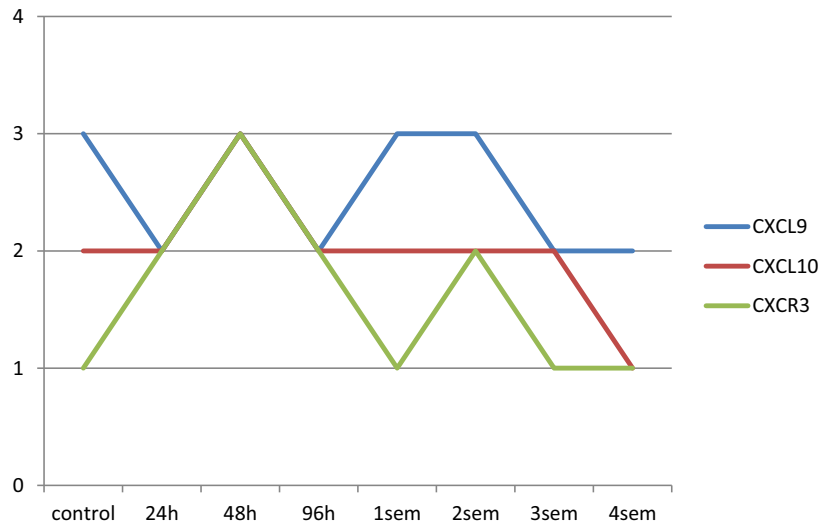


Figura 4.1.5. Gráfica de los niveles de expresión observado de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 según tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el ES.

4.1.2.1.4.-GRO

La expresión de GRO fue muy tenue en todos los tiempos presentando una expresión citoplasmática y nuclear aislada. La positividad fue homogénea en todas las células tumorales en los diferentes tiempos. Sólo en las primeras 48h y a partir de la tercera semana se observan dos picos de expresión (fig.4.1.7), presentándose un ligero aumento de la positividad en las áreas perinecroticas.

4.1.2.1.5.-CXCR2

La expresión citoplasmática y nuclear del receptor CXCR2 en el ES es intensa hasta las primeras 96h, presentando una positividad homogénea en todas las células neoplásicas. La expresión parece ser de menor intensidad a partir de la primera semana del xenotrasplante. Ver figura 4.1.6.

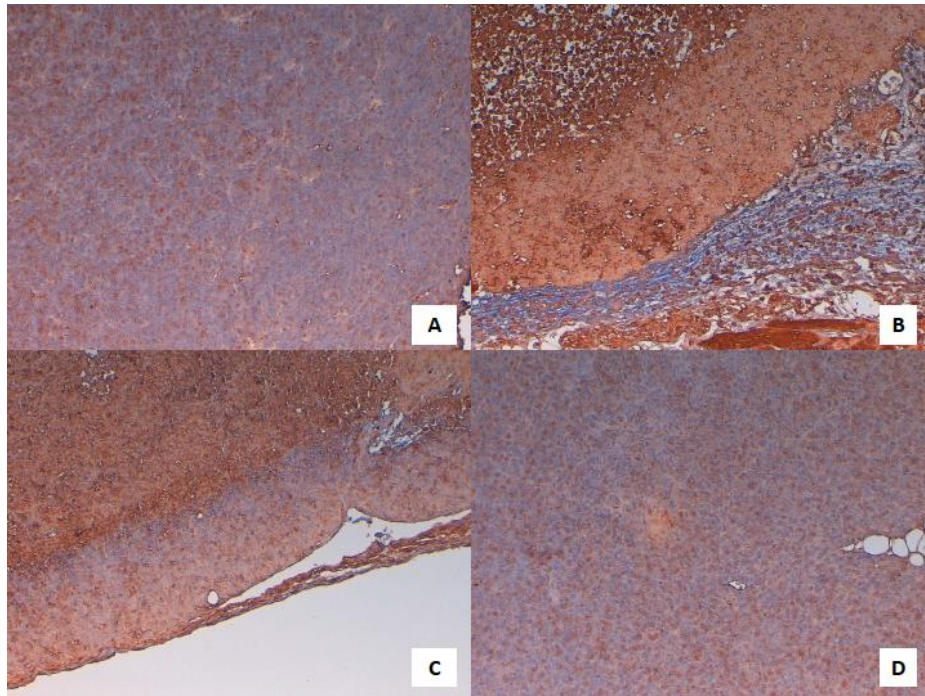


Figura 4.1.6. Expresión IHQ con peroxidasa de CXCR2 en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión moderada de CXCR2 en el tumor control (200X) citoplásmica y nuclear (detalle 400X). **B**, expresión intensa y homogénea de CXCR2 a las 48h, expresión del estroma murino peritumoral (100X). **C**, expresión intensa y homogénea de CXCR2 a las 2sem (100X). **D**, expresión moderada homogénea de CXCR2 a la 4sem (200X).

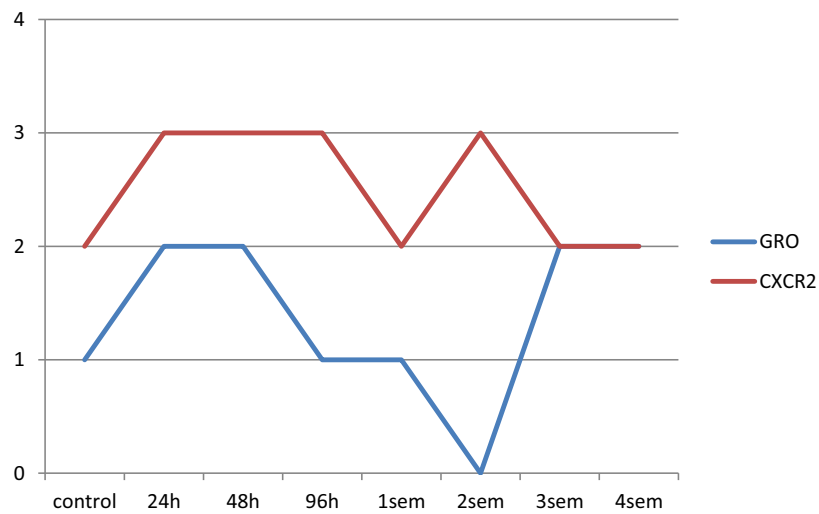


Figura 4.1.7. Gráfica de expresión inmunohistoquímica con peroxidasa de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2.

En **resumen** podemos destacar que en nuestra experiencia en el ES con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

- 1- Existe una mayor expresión de quimiocinas y sus respectivos receptores a las 24 y 48h (CXCL9, CXCL10 con CXCR3 y GRO con CXCR2).
- 2- CXCL9 parece activarse también a partir de la primera semana del xenoinjerto, lo que también se asocia y la expresión de su receptor CXCR3.
- 3- CXCL10 parece activarse sólo a las 48h, en el resto de la experiencia mantiene un nivel de expresión constante.
- 4- GRO al igual que CXCL9, se activa también en fases tardías de la experiencia (3ª y 4ª semana) y parece asociarse a la expresión de su receptor CXCR2.

4.1.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.1.2.2.1.-CXCL9-CD99

Al igual que en la peroxidasa la expresión citoplasmática y membranosa de CXCL9 en las células neoplásicas es moderada e intensa en todos los tiempos siendo ligeramente más intensa en las áreas perinecróticas y periestromales. (fig. 4.1.8). La quimiocina es expresada también por las células del estroma peritumoral. Por otro lado la expresión de membrana de CD99 es intensa y homogénea en todos los tiempos y nos distingue claramente la zona de células neoplásicas del estroma murino y áreas de necrosis.

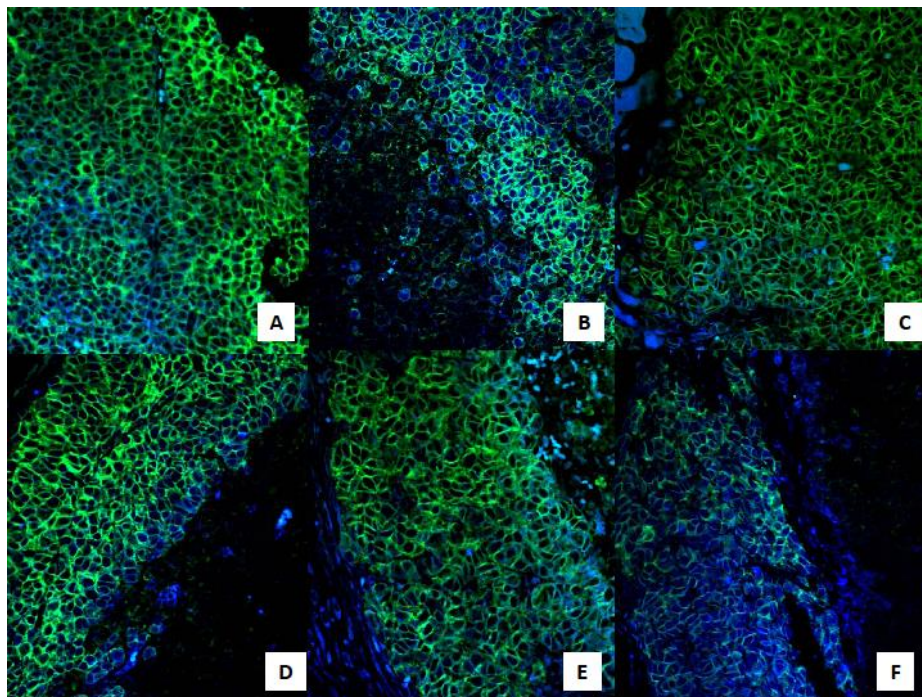


Figura 4.1.8. Expresión IHQ con inmunofluorescencia indirecta (IF) de CXCL9 (azul) en los diferentes tiempos en combinación con CD99 (verde). **A**, expresión intensa y heterogénea de CXCL9 en el tumor control (400X). **B**, expresión citoplasmática intensa de CXCL9 a las 24h (400X). **C**, expresión moderada y heterogénea de CXCL9 a las 48h (400X). **D**, expresión moderada-intensa de CXCL9 a las 96h, más intensa en el área perinecrótica (400X). **E**, expresión intensa de

CXCL9 a la 1sem con expresión del estroma peritumoral (400X). **F**, expresión intensa de CXCL9 heterogénea y citoplasmática a la 2sem (400X).

4.1.2.2.2.-CXCL10-CD99

La expresión citoplasmática y nuclear de CXCL10 en IF es moderada e intensa en todos los tiempos del ES (fig. 4.1.9), y al igual que ocurre con CXCL9 suele ser más intensa en las áreas perinecroticas y adyacentes al estroma murino en algunos tiempos. La quimiocina es expresada también por las células del estroma peritumoral. Por otra parte, la expresión de CD99 es de membrana, intensa y homogénea en todos los tiempos y nos demuestra que se trata de células tumorales de ES.

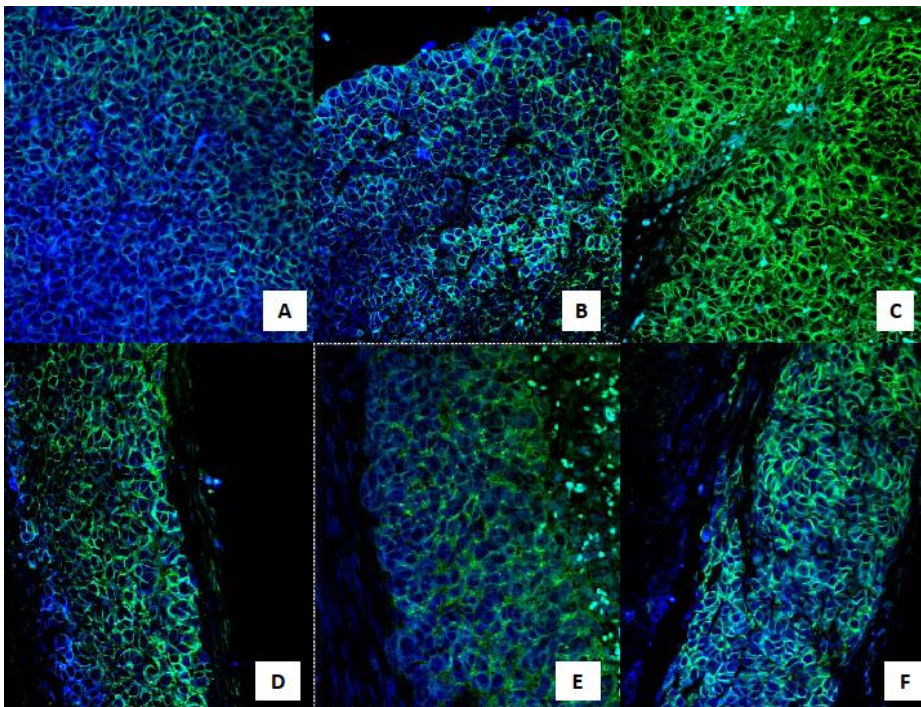


Figura 4.1.9. Expresión de IHQ con IF indirecta de CXCL10 (azul) en los diferentes tiempos postxenotrasplante combinado con el CD99 (verde). **A**, expresión intensa de CXCL10 citoplasmática y nuclear en el tumor control (400X). **B**, expresión intensa y homogénea de CXCL10 a las 24h (400X). **C**, expresión débil de CXCL10 a las 48h (400X). **D**, expresión

moderada-intensa de CXCL10 a las 96h, más intensa en el área perinecrotica y periférica (400X).
E, expresión intensa de CXCL10 a la 1sem con expresión del estroma murino peritumoral (400X).
F, expresión intensa y heterogénea de CXCL10 a la 2 sem (400X).

4.1.2.2.3-GRO

La expresión citoplasmática de GRO es más intensa en IF que en peroxidasa, aunque la expresión es en general más débil con respecto a las otras dos quimiocinas. La positividad es homogénea y en la primera semana postrasplante es más intensa en las áreas periestromales y perinecroticas. La quimiocina es expresada también por las células del estroma peritumoral con bastante intensidad (fig. 4.1.10).

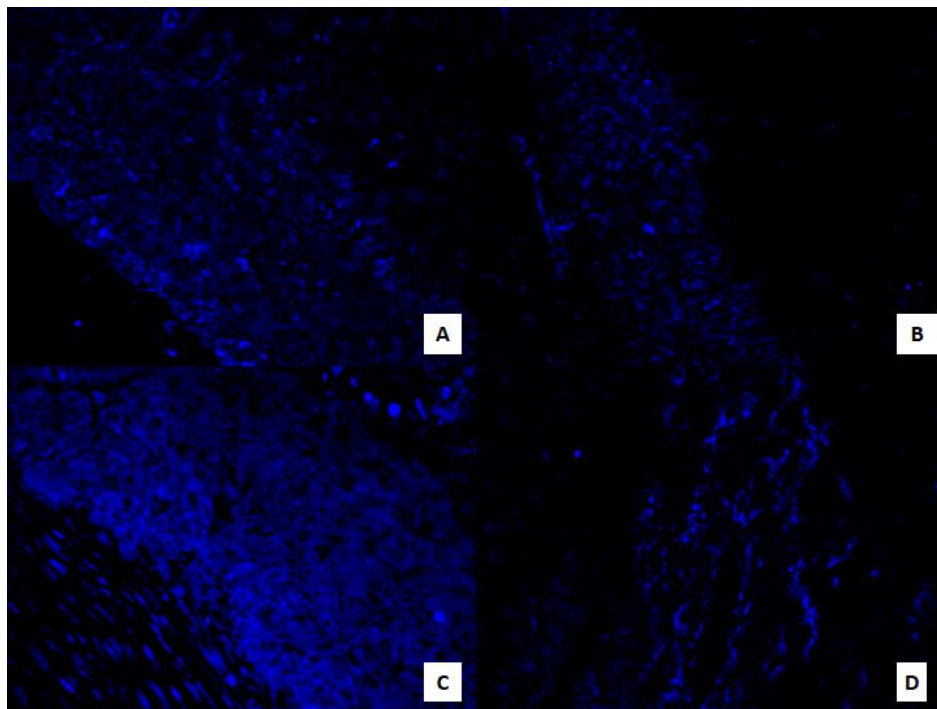


Figura 4.1.10. Expresión de GRO con IF indirecta en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión moderada y citoplasmática de GRO a las 24h (400X). **B**, expresión moderada de GRO a las 96h en el ES (400X). **C**, expresión intensa de GRO tumoral y en el estroma murino en la 1sem, obsérvese

la mayor intensidad en el área periférica del tumor (400X). **D**, expresión moderada y heterogénea de GRO a las 4sem (400X).

En resumen podemos destacar que los ligandos CXCL9, CXCL10 y GRO son expresados y producidos por las propias células neoplásicas, expresándose de forma moderada-intensa, siendo esta expresión ligeramente más intensa en las áreas del tumor más cercanas a la necrosis central y al estroma murino. Las células inflamatorias intratumorales y estromales del huésped como los linfocitos y fibroblastos nos sirven de control interno en la técnica.

4.1.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

La expresión de CXCL9 combinado con su receptor CXCR3 es mucho más tenue que en peroxidasa. La expresión es más homogénea, sólo a las 24h se observa una intensidad mayor en las células tumorales adyacentes o cercanas al estroma del huésped para CXCL9. La expresión del ligando es más intensa en las primeras horas postrasplante.

La expresión membranosa y citoplasmática del receptor CXCR3 es moderada-intensa y homogénea en todos los tiempos del ES y en las células del estroma tumoral expresándose de manera al parecer constitutiva. Ver figura 4.1.11.

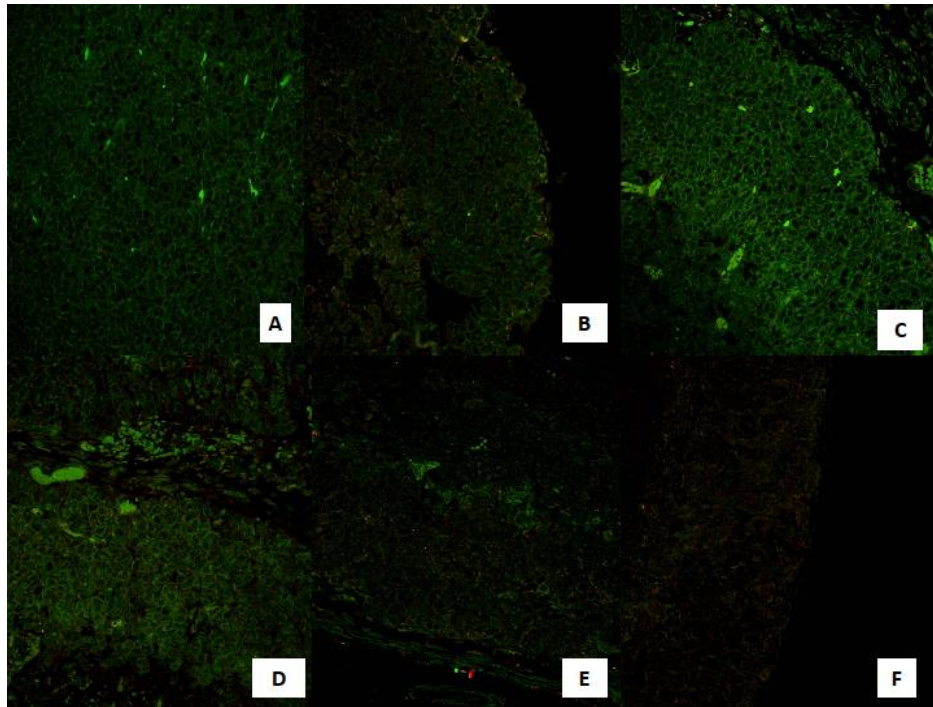


Figura 4.1.11. Expresión IF indirecta de CXCL9 (rojo) con su receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión ausente de CXCL9 y moderada de receptor en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de ligando y receptor a las 24h (400X). **C**, expresión débil de ligando y moderada de receptor (400X). **D**, expresión leve de CXCL9 y moderada de CXCR3 en el tumor y en el estroma alas 96h (400X). **E**, expresión leve de ligando y receptor en la 1sem, con ligero aumento de expresión de CXCL9 en el área perinecrotica y periférica del tumor (400X). **F**, expresión leve de ligando y moderada de receptor en la 2sem (400X).

4.1.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

La expresión de ligando en general es leve-moderada siendo ligeramente más intensa en las áreas periestromales y/o perinecroticas (fig.4.1.12B). Por otro lado el receptor CXCR3 muestra una intensidad de expresión mayor y más homogénea en todas las células neoplásicas, expresándose también en las células del estroma tumoral de forma constitutiva (fig.4.1.12E). CXCL10 comparte el mismo perfil de expresión IHQ que el CXCL9.Ver figura 4.1.13.

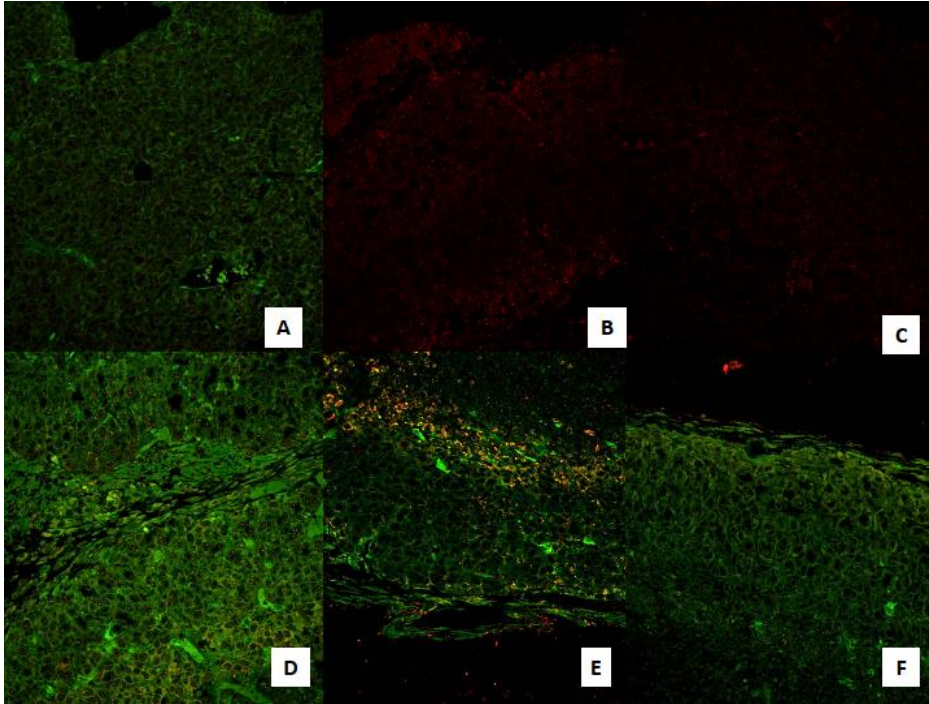


Figura 4.1.12. Expresión IF indirecta de CXCL10 (rojo) con su receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión leve de CXCL10 y moderada de receptor en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de ligando a las 24h, mayor expresión en el área perinecrotica y periférica (400X). **C**, expresión leve de ligando en las 48h (400X). **D**, expresión moderada de ligando y receptor, expresión de ambos en el estroma murino peritumoral a las 96h (400X). **E**, expresión leve de ligando y receptor en la 1sem (400X). **F**, expresión muy tenue de ligando y moderada de receptor en la 2sem (400X).

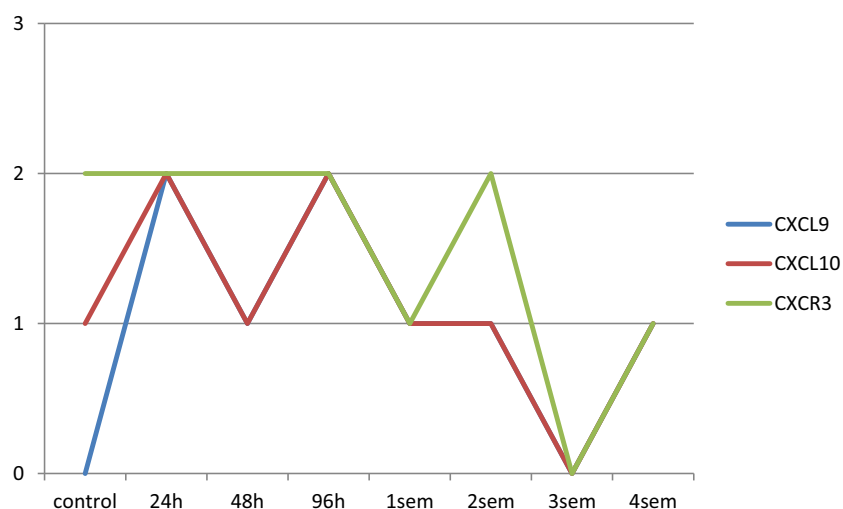


Figura 4.1.13. Gráfica de expresión de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos del ES con IF indirecta. En la tercera semana no fueron valorables los resultados.

4.1.2.2.6.-GRO-CXCR2

La expresión de ligando GRO presenta dos picos de expresión, el primero a las 24h y el segundo a la 1sem. La expresión es más intensa combinada con su receptor CXCR2 que en el resto de técnicas al contrario que CXCL9 y CXCL10. La expresión es moderada-intensa en casi todos los tiempos disminuyendo la positividad a partir de la segunda semana (fig.4.1.15). Por otro lado la expresión de receptor citoplasmática y membranosa se mantiene moderada, homogénea y constante en todos los tiempos. La quimiocina y el receptor son expresados también por las células del estroma peritumoral del huésped. Ver figura 4.1.14C.

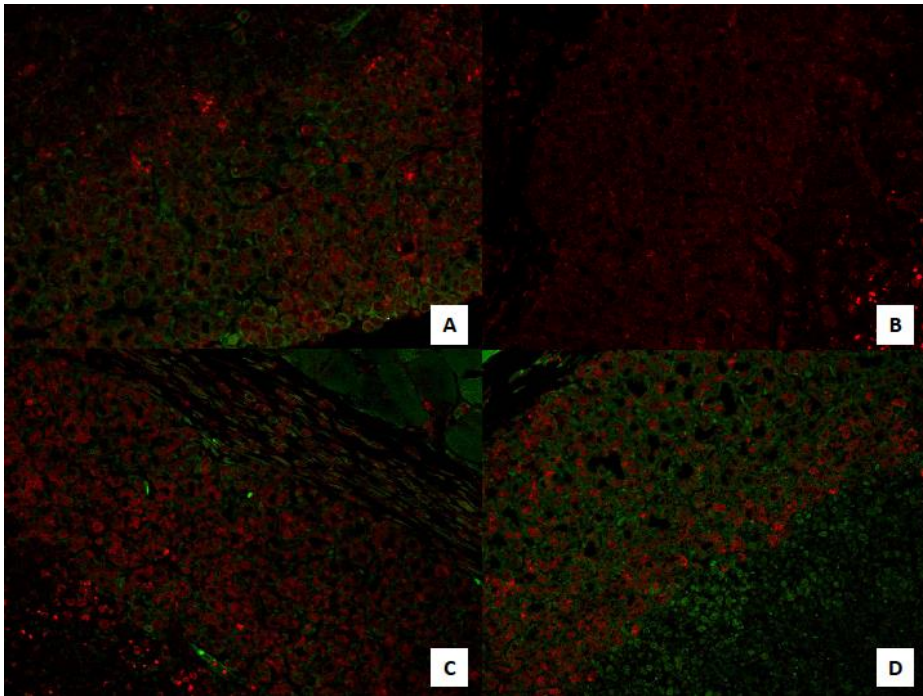


Figura 4.1.14. Expresión en IF indirecta de GRO (rojo) con su receptor CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos del ES. **A**, expresión intensa de GRO y moderada de ligando a las 24h (400X). **B**, expresión moderada y citoplasmática de GRO a las 48h (400X). **C**, expresión intensa de GRO tumoral y estromal en la 1sem. La expresión de CXCR2 es tenue tanto en el tumor como en el estroma (400X). **D**, expresión intensa de GRO y moderada de CXCR2 en la 2sem, la expresión de ligando es ligeramente mayor en el área perinecrótica y periférica (400X).

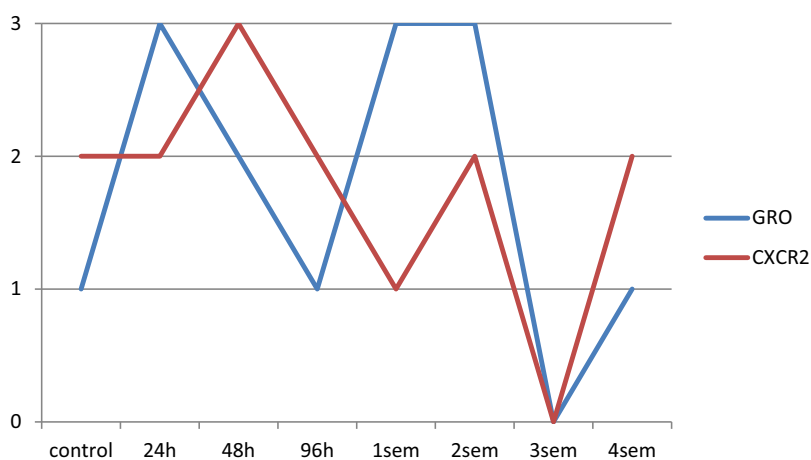


Figura 4.1.15. Gráfica de expresión de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2 en los diferentes tiempos del ES con IF indirecta. En la tercera semana no fueron valorables los resultados.

La IF indirecta tiene un 40% de concordancia con la peroxidasa. Con el receptor CXCR3 la concordancia entre las dos técnicas inmunohistoquímicas es mayor que con el resto de marcadores.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el ES con el estudio inmunohistoquímico :

- 1- Las células tumorales coexpresan ligandos de linfocinas (CXCL9, CXCL10 y GRO) y sus receptores (CXCR2 y CXCR3).
- 2- La expresión de quimiocinas parece ser ligeramente superior en las áreas del tumor adyacentes al área de necrosis tumoral y del estroma murino tanto en peroxidasa como en IF indirecta.
- 3- Las quimiocinas y sus receptores son expresados no sólo por las células neoplásicas si no también por las células del componente inflamatorio como linfocitos y fibroblastos del estroma peritumoral del huésped.
- 4- En IF indirecta, CXCL9 y CXCL10 alcanzan su máxima expresión en las primeras 24h y 96h disminuyendo a partir de la primera semana. Su receptor CXCR3 se mantiene elevado hasta la segunda semana donde

empieza a decaer ligeramente su actividad. Ambas quimiocinas comparten el mismo perfil de expresión (fig. 4.1.13).

- 5- En IF indirecta, GRO alcanza su máxima expresión a las 24h, primera y segunda semana, sin embargo su receptor CXCR2 alcanza su máxima expresión a las 48h y la expresión es más mantenida y moderada (fig. 4.1.15).
- 6- En general la expresión de ligandos es más fluctuante, observándose dos picos de expresión dentro de las cuatro semanas. Por otra parte, la expresión de receptores es más mantenida y constante en el tiempo por las células tumorales.
- 7- La IF indirecta tiene un 40% de concordancia con la peroxidasa. Con el receptor CXCR3 la concordancia entre las dos técnicas inmunohistoquímicas es mayor que con el resto de marcadores.
- 8- En el 50% de todas las determinaciones la intensidad de la expresión de linfocinas y sus receptores con peroxidasa fue mayor que con IF indirecta. Sólo GRO mostró más casos de mayor intensidad de expresión inmunofenotípica con IF indirecta.

4.1.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.1.2.3.1. Índice proliferativo.

El índice proliferativo estudiado con la expresión de Ki67 en las células neoplásicas muestra una menor positividad en las primeras horas del desarrollo tumoral, aumentando su intensidad a partir de las 96h del injerto tumoral (fig.4.1.16). Este dato se correlaciona con lo que observamos en el estudio morfológico, epígrafe 4.1.1.

Mostramos a continuación una figura gráfica de la expresión del Ki67.

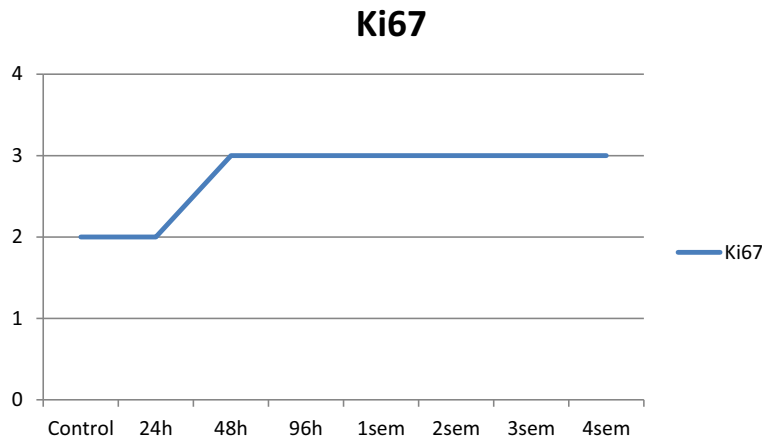


Figura 4.1.16. Gráfica de expresión de Ki67 en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa.

4.1.2.3.2. Factores angiogénicos.

La expresión citoplasmática de VEGF es homogénea e intensa en la práctica totalidad de las primeras horas y semanas, disminuyendo sólo a partir de la tercera semana del xenotrasplante y en el tumor control. VEGFR1 y PDGFRA muestra un rápido aumento de expresión en las primeras 48h y se mantiene elevado. La expresión citoplasmática del resto de receptores, VEGFR2, VEGFR3, FGF2 y VE-CAD es intensa en prácticamente todos los tiempos y células neoplásicas desde las 24h tras el xenotrasplante. Ver figuras 4.1.17, 4.1.18 y 4.1.19.

La expresión de VEGF y sus receptores es intensa no sólo en las células tumorales sino también en las células inflamatorias y fibroblastos del estroma peritumoral. Ver figura 4.1.17C.

Finalmente HIF1A no fue valorable en nuestra experiencia con peroxidasa en el ES.

Seguidamente mostramos una figura con la expresión de VEGF y VEGFR1 en diferentes tiempos tras el xenotrasplante junto con gráficas comparativas de expresión numérica entre VEGF y sus receptores, PDGFRA, FGF2 y VE-CAD.

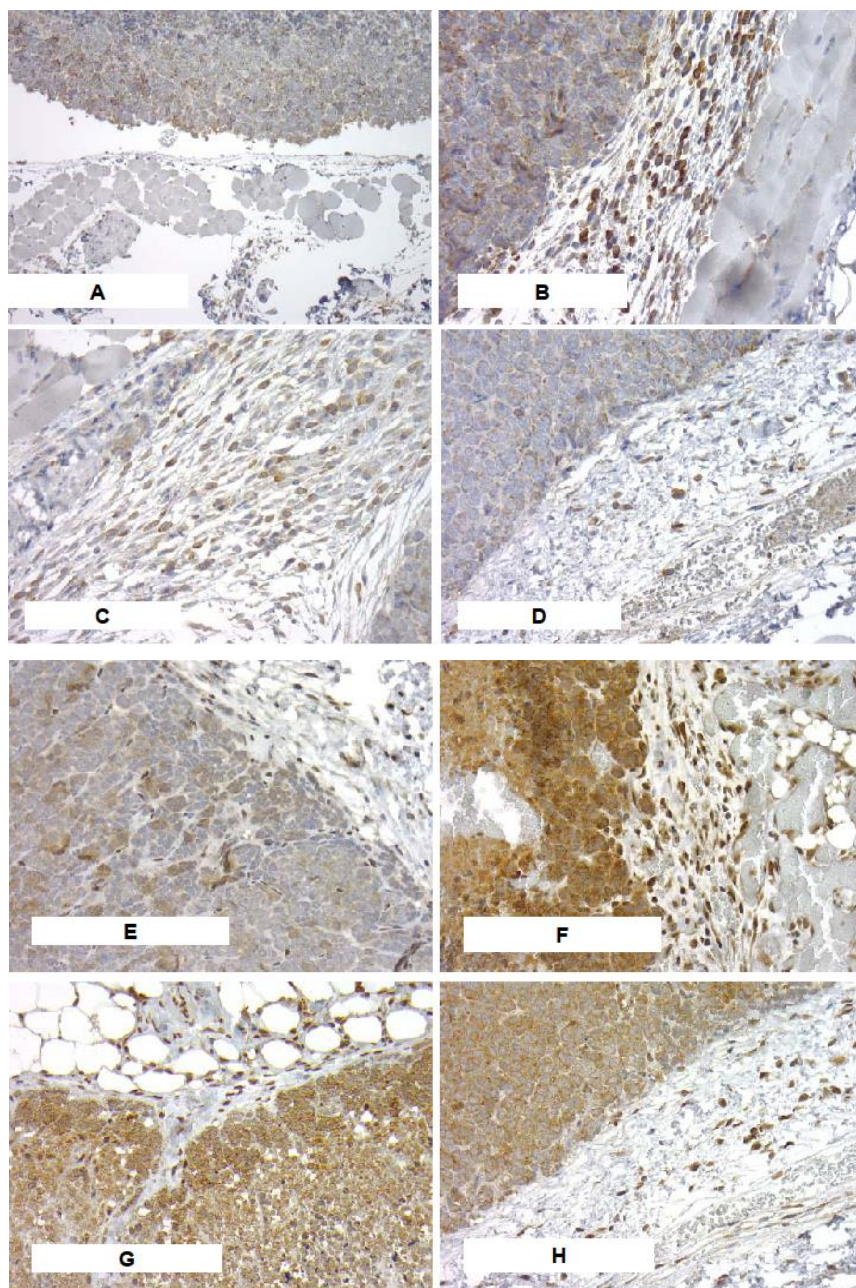


Figura 4.1.17. Expresión con peroxidasa de VEGF y el receptor VEGFR1 en los diferentes tiempos del xenotrasplante en ES. **A**, expresión de VEGF moderada-intensa del tumor a las 24h (200X). **B**, expresión de VEGF moderada-intensa a las 96h en el tumor y en el estroma del ratón (400X). **C**, expresión moderada de VEGF en la 1sem en el estroma murino (400X). **D**, expresión débil de VEGF en la 4sem en el tumor y en el estroma del ratón (400X). **E**, expresión moderada de

VEGFR1 en el tumor y en el estroma del ratón a las 24h (400X). **F**, expresión intensa de VEGFR1 en el tumor y estroma a las 96h (200X). **G**, expresión intensa de VEGFR1 en el tumor y el estroma en la 1sem (200X). **H**, expresión intensa de VEGFR1 en el tumor y fibroblastos estromales en la 4sem (200X).

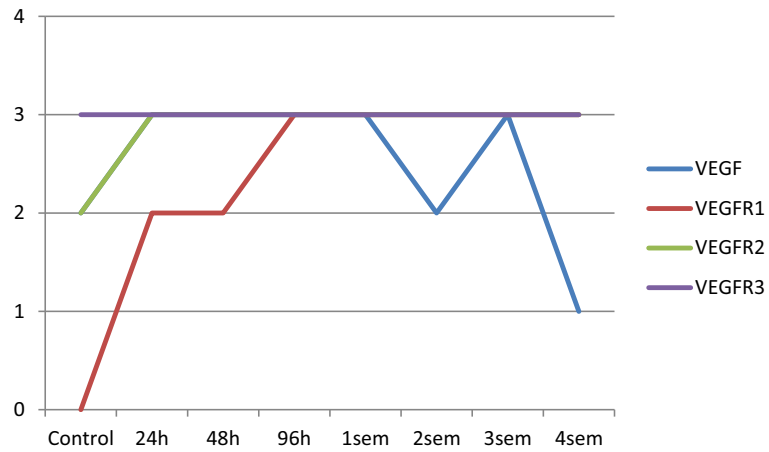


Figura 4.1.18. Gráfica de expresión de VEGF y sus distintos receptores en los diferentes tiempos tras el xenotrasplante.

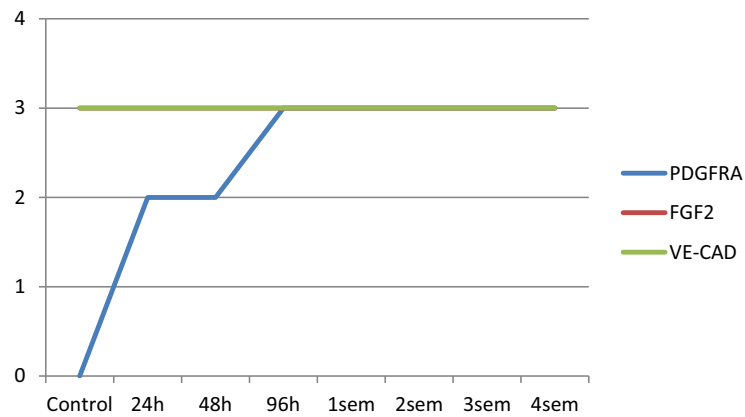


Figura 4.1.19. Gráfica de expresión de los factores PDGFRA, FGF2 y VE-CAD con peroxidasa en los distintos tiempos del xenotrasplante. FGF2 y VE-CAD comparten perfil de expresión.

4.1.3. ESTUDIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1.3.1. ELISA

Como se ha indicado en la sección de Material y Métodos (nº de epígrafe 3.4.6), se procedió a la determinación en suero de VEGF de origen humano y de ratón mediante ELISA. En este caso particular, no se detectó expresión de VEGF humano en toda la experiencia. Sin embargo, y tal y como se muestra en la Fig. 4.1.20 los niveles de VEGF de ratón fueron superiores durante las primeras horas tras el implante del tumor, lo que sugiere que:

1.- El VEGF humano se produce a nivel local con el objeto de estimular a las células endoteliales de los capilares que rodean al tumor (que se produce en las primeras fases de la experiencia, durante la inducción de la angiogénesis);

2.- La expresión de VEGF de ratón también se incrementa en las primeras fases del experimento, probablemente asociada, no solo al rápido crecimiento del tumor, sino también a la movilización de células pluripotentes angioblásticas de la médula ósea del ratón que contribuirían al remodelado angiogénico intratumoral durante la primera semana de la implantación del tumor.

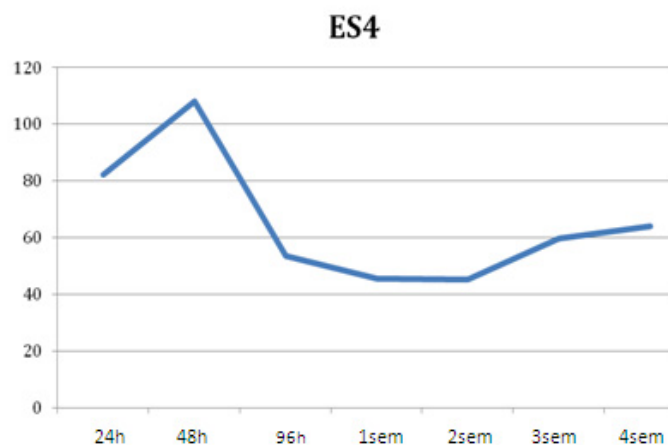


Figura 4.1.20. Perfiles de nivel de VEGF en suero de ratón en la serie del ES, mostrando un incremento de la expresión de VEGF en el comienzo del implante. Unidades eje ordenadas pg/ml.

4.1.3.2. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluidica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación.

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite” v3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.1.21 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal.

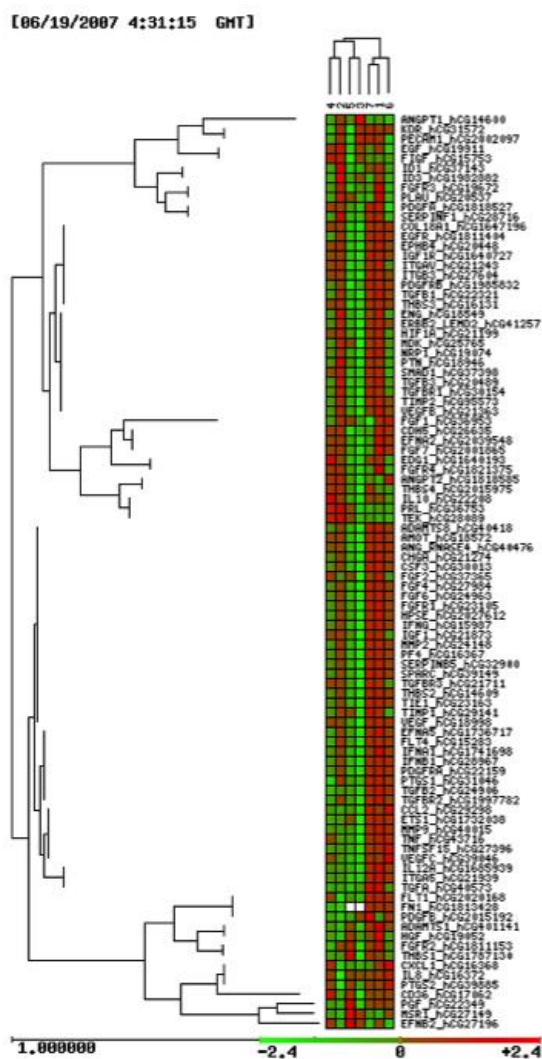


Figura 4.1.21. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis en el ES.1,24h; 2,48h; 3,96h; 4,1sem; 5,2sem; 6,3sem; 7,4sem.

De esta matriz obtuvimos la siguiente información:

1 -. Las muestras de 24, 48h, 96h y 28 días compartieron un perfil genómico similar y diferente del perfil genómico observado en las muestras correspondientes a una, dos y tres semanas. Por lo tanto, dos patrones de expresión pueden ser distinguidas: la **fase temprana** (primeras 96 horas),

que coincide con la activación morfológica e inmunofenotípica del proceso angiogénico, y la **fase tardía**, que se asocia con el proceso de remodelado angiogénico y que incluyen la movilización de angioblastos de la médula ósea del ratón al tumor.

2 -. La fase temprana del proceso angiogénico se define por la sobreexpresión de genes claramente implicados en la inducción de la angiogénesis. Entre los genes incluidos en este grupo son: *VEGF*, *PDGFA*, *PDGFB*, *VEGFC* y sus receptores (figuras 4.1.22 y 4.1.23).

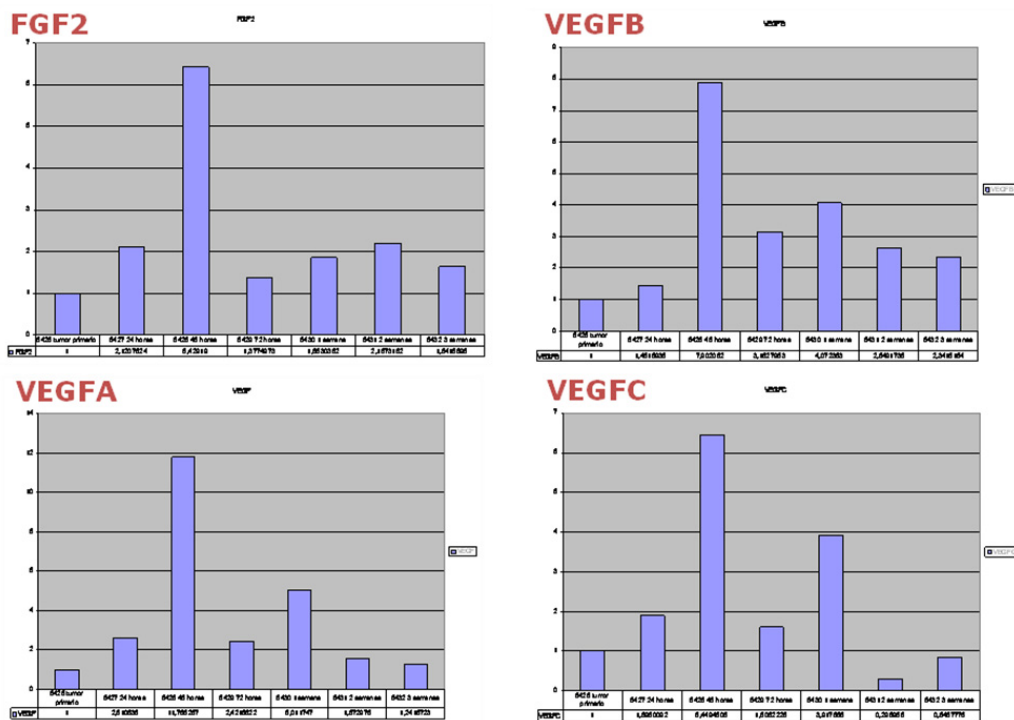


Figura 4.1.22. Histogramas mostrando la sobreexpresión de algunos factores promotores de la angiogénesis a las 48h desde la implantación del tumor.

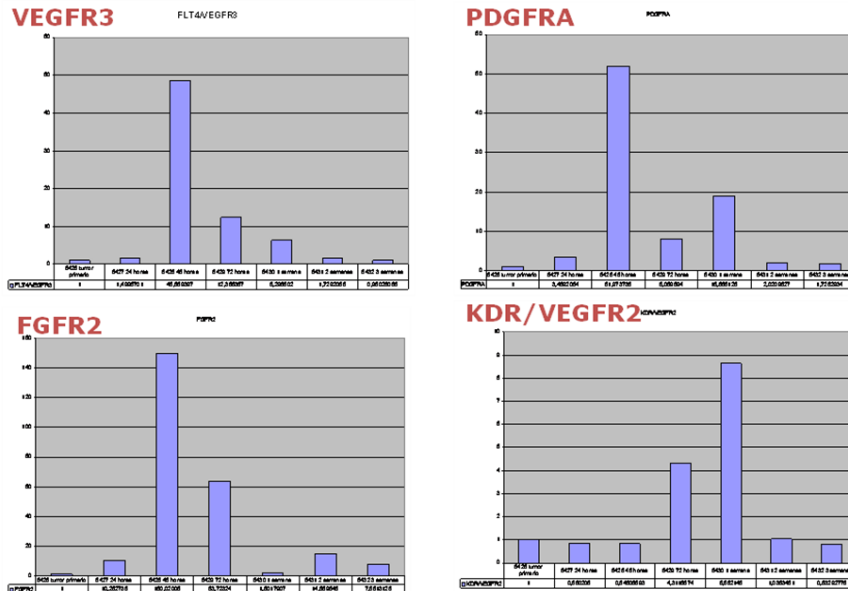


Figura 4.1.23. Histogramas mostrando la sobreexpresión equivalente de los receptores desde los correspondientes factores de crecimiento pro-angiogénicos.

Curiosamente, y al contrario de la expresión esperada, *VEGFR2* se produce principalmente en la primera semana desde el implante y coincide con la observación a nivel morfológico, del “vascular sprouting” y el reclutamiento de células angioblásticas en circulación.

3 -. Por otra parte, en la fase tardía del proceso angiogénico (primera, segunda y tercera semana) los genes que se sobreexpresan son claramente *TIE*, *TSHBS2*, *THSBS1*, *SERPINB5*, *Ptgs1*, *INFG*, *FGF6*, *FGF1*, *TNFSF15*, *PGF* o *ETS1*.

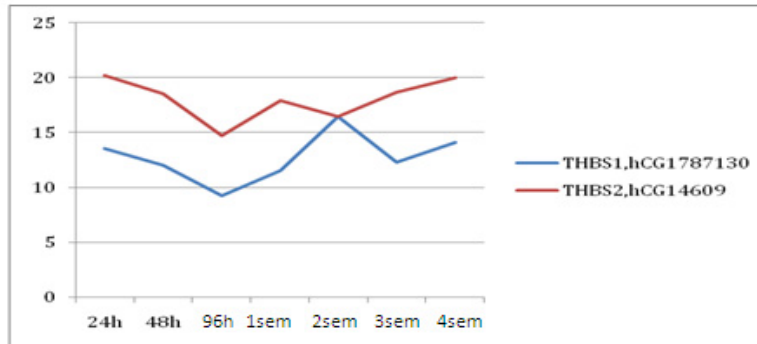


Figura 4.1.24. Perfil de expresión de *THBS2* y *THBS1* en el ES.

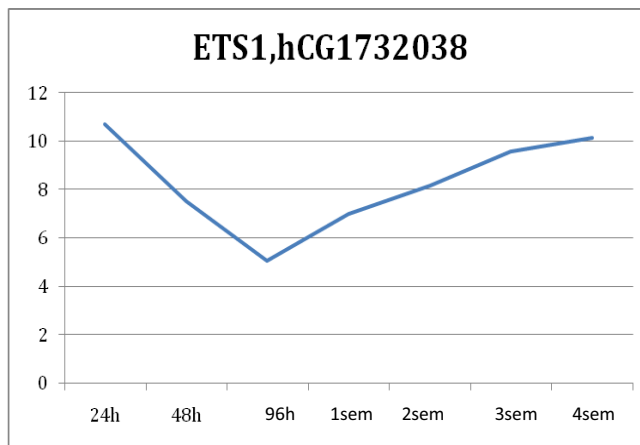


Figura 4.1.25. Perfil de expresión del gen *ETS1* en el ES.

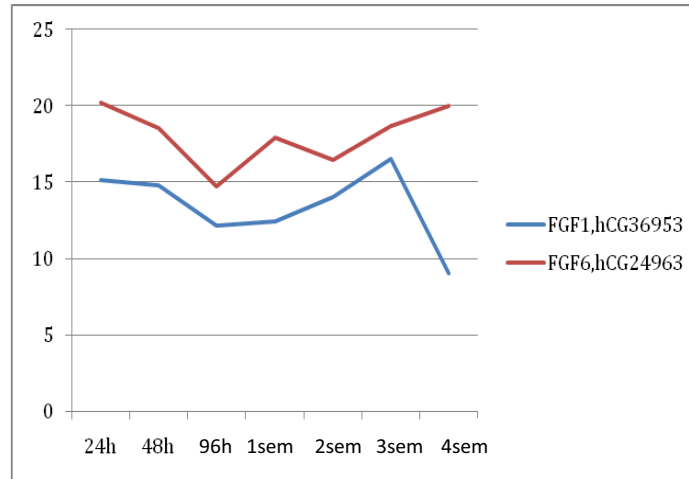


Figura 4.1.26. Perfil de expresión de los genes *FGF1* y *FGF6* en el ES.

4.2. OSTEOSARCOMA OSTEABLÁSTICO

El tumor primario humano procede de un varón de 22 años de edad localizado en la costilla.

El tejido tumoral está constituido por una proliferación de células fusiformes y poligonales que crecen en una matriz osteoide abundante neoplásica de características inmaduras. La citología formada por osteoblastos atípicos dispuestos en nidos o más aislados en matriz osteoide. Hay áreas más mesenquimatosas con fuerte polimorfismo y mitosis. Existen numerosas áreas de necrosis acompañante.

Posteriormente dicho tumor se inoculó en ratones nude generando sucesivos pases. Concretamente el tumor que utilizamos en esta experiencia procedía del segundo pase en ratones.

4.2.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

En las primeras 24-48h tras el implante, el crecimiento tumoral se inicia en la porción externa del implante donde aparece un banda de células tumorales preservadas junto con otras en picnosis y apoptosis. No se ven mitosis en las primeras 24 horas apareciendo a las 48 horas junto con una remodelación del tejido tumoral mejor conservado y periférico. Centralmente hay franca necrosis. La remodelación angiogénica se activa en el estroma peritumoral circundante que se continua con el tejido conjuntivo del la cápsula del ratón. En dicho tejido peritumoral se observa una intensa proliferación angioblástica y congestión capilar con microhemorragias acompañadas de un infiltrado celular de predominio linfocitario. Se observan brotes endoteliales con actividad mitótica en las células endoteliales de los capilares del huésped.

En estos estadios iniciales proliferan los angioblastos activados de origen mesenquimal, entremezclados con numerosos linfocitos y macrófagos, generando una neovascularización mediante formación *in situ* de nuevos brotes vasculares. Se suceden contactos iniciales entre las células endoteliales nuevamente formadas y las células tumorales transplantadas, por “co-option” y brotes formando estructuras tubulares.

En este estadio se observa una capa periférica de 10-14 células tumorales de 300 µm de grosor, bien preservadas y viables, mientras que las células localizadas más profundas se quedan aisladas y sufren apoptosis transformándose en un core necrótico hasta la primera semana tras el xenotransplante (fig.4.2.1A). El momento de mayor cantidad de necrosis tumoral se observa a las 48h tras el xenoinjerto. Al igual que se sucedía en otros tumores el número de mitosis en estas primeras horas del xenotrasplante disminuye o es relativamente menor que en los sucesivos tiempos y es a partir de la segunda semana cuando se recupera el índice divisional característico del tumor, como se observará posteriormente en la figura gráfica de expresión de Ki67 (fig.4.2.17).

El estroma peritumoral del huésped presenta unas características mixoides.

Entre la primera y tercera semana postrasplante, la capa de células viables aumenta progresivamente de grosor, remitiendo la cantidad de necrosis central sobre todo a partir de la segunda semana. Aparece en este momento una intensa vasculogénesis y neoangiogénesis en el parénquima tumoral de dos maneras diferentes. Una, por co-optación intratumoral de angioblastos mesenquimales indiferenciados que de manera selectiva proliferan; y dos por brotes de crecimiento endotelial de nuevos vasos capilares periféricos del huésped. La red capilar preexistente del tumor original xenotrasplantado puede persistir parcialmente, siendo una fuente de angiogénesis intratumoral, pero la mayoría de estas células endoteliales sufren apoptosis.

A partir de la tercera semana se pierde esas tres áreas bien definidas que se distinguen en las primeras 48h. El número de mitosis se recupera y alcanza el del tumor control (fig.4.2.1C).

En la cuarta semana, se observan vasos capilares bien establecidos tanto intra como peritumorales, con escasa necrosis de características parcheadas y práctica ausencia de infiltrado inflamatorio linfocitario acompañante (fig.4.2.1D).

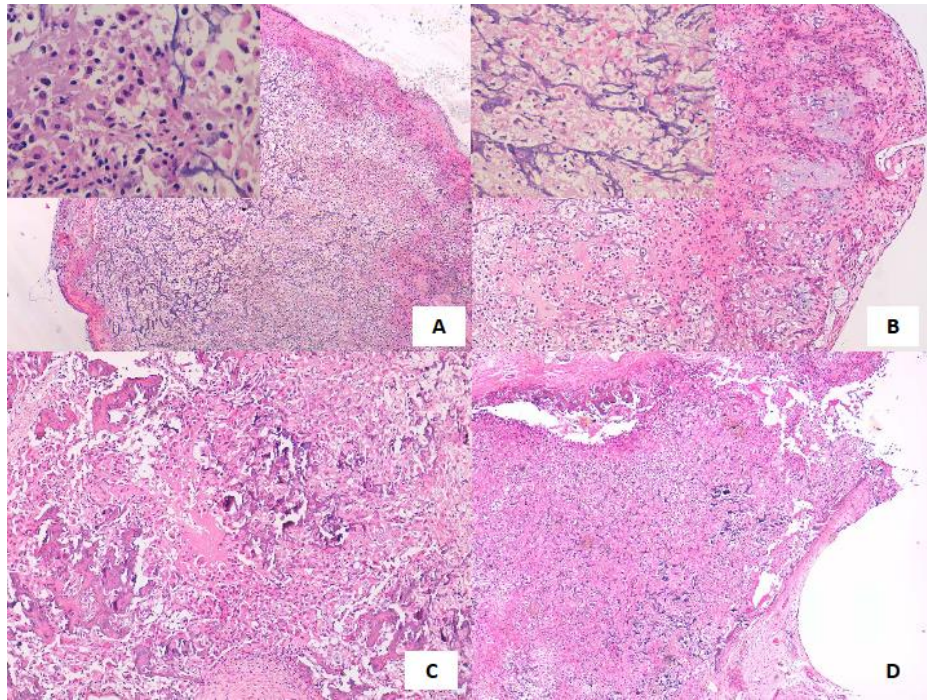


Figura 4.2.1. Imágenes macro-micro del OS osteoblástico en los diferentes tiempos, H&E. **A**, muestra de OS a las 24h con abundantes figuras de apoptosis (detalle 400X). **B**, muestra de OS a las 48h con abundante necrosis (detalle 400X). **C**, muestra de OS en la 2sem con necrosis geográfica. **D**, muestra de OS en la 4sem con escasas áreas de necrosis.

4.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

A continuación se describen los resultados de la expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO junto a sus respectivos receptores CXCR3 y CXCR2. En primer lugar se expondrán los resultados con peroxidasa para a continuación destacar los resultados con inmunofluorescencia indirecta.

4.2.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.2.2.1.1.-CXCL9

Expresión citoplasmática, homogénea y de intensidad leve-moderada en los tiempos, aunque se observa una positividad claramente más intensa a las 48h. Además se observa una leve expresión matricial (fig.4.2.2B).

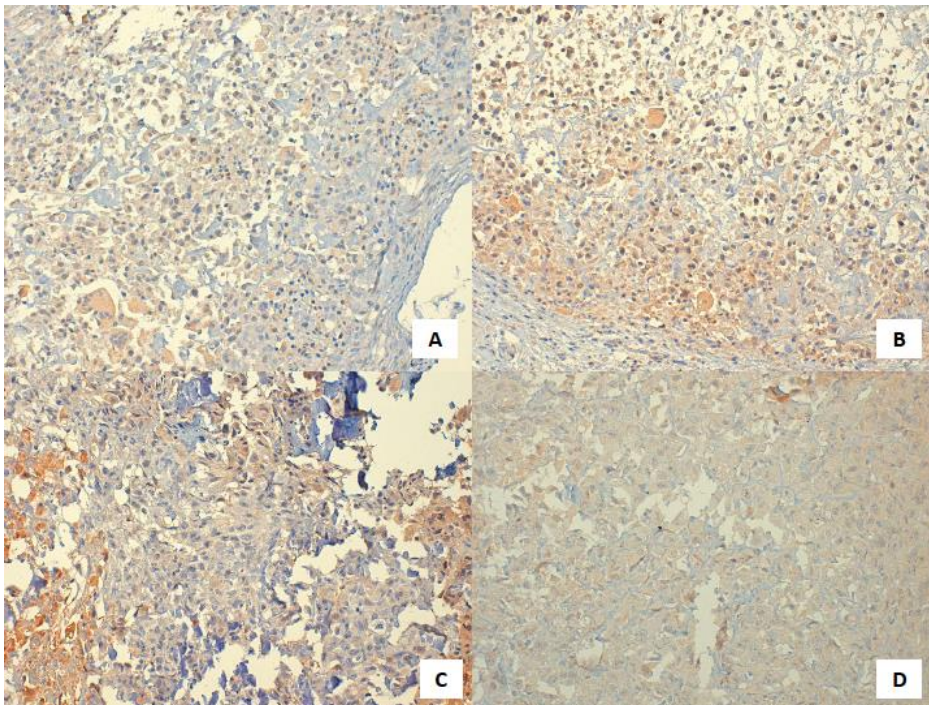


Figura 4.2.2. Expresión de CXCL9 en los distintos tiempos de un OS osteoblástico con inmunotinción con peroxidasa. **A**, expresión moderada y citoplasmática de CXCL9 en las células tumorales y en la matriz osteoide a las 24h (200X). **B**, expresión intensa de CXCL9 en el citoplasma de las células neoplásicas y la matriz de osteoide a las 48h (200X). **C**, expresión moderada de CXCL9 en la 2sem (200X). **D**, expresión moderada de CXCL9 en la 4sem (200X).

4.2.2.1.2.-CXCL10

La expresión citoplasmática de este ligando es leve-moderada en el OS, empieza a incrementarse a las 96h y disminuye ligeramente a partir de la tercera semana. La expresión presenta un carácter homogéneo en las células tumorales. Hay cierta expresión en la matriz osteoide. Ver figura 4.2.3.

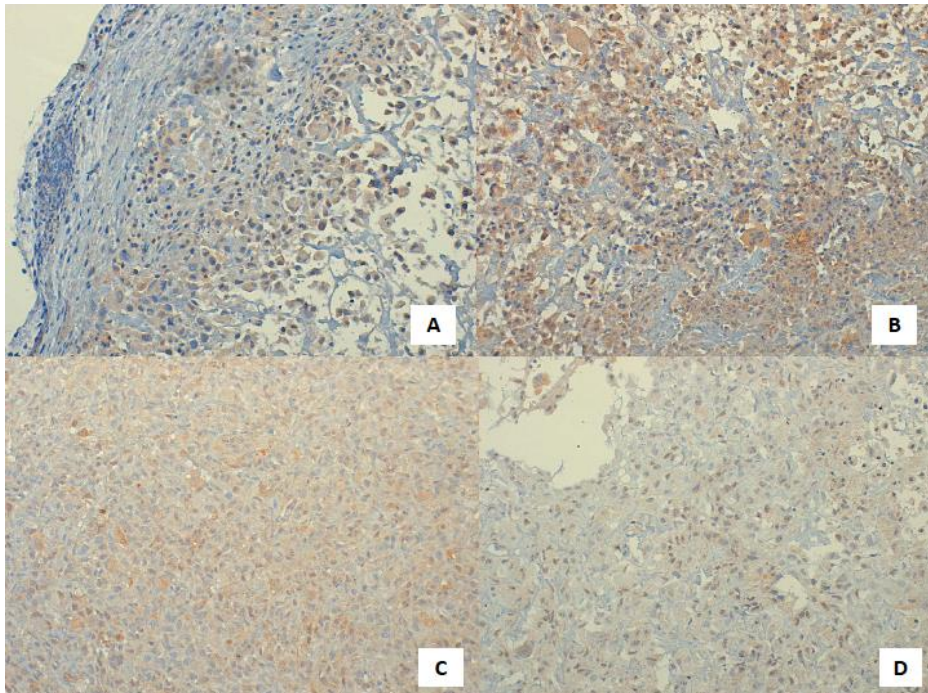


Figura 4.2.3. Expresión de CXCL10 en los distintos tiempos de un OS osteoblástico con inmunotinción con peroxidasa. **A**, expresión leve-moderada de CXCL10 a las 24h (200X). **B**, expresión moderada-intensa de CXCL10 a las 48h en el citoplasma de las células tumorales y estroma osteoide (200X). **C**, expresión moderada de CXCL10 en la 3sem (200X). **D**, expresión débil de CXCL10 en la 4sem (200X).

4.2.2.1.3.-CXCR3

Por otro lado la expresión con peroxidasa del receptor CXCR3 es al igual que CXCR2 intracelular y extracelular, sin embargo resulta ser más heterogénea y parcheada. La expresión en general es moderada. Ver figura 4.2.5.

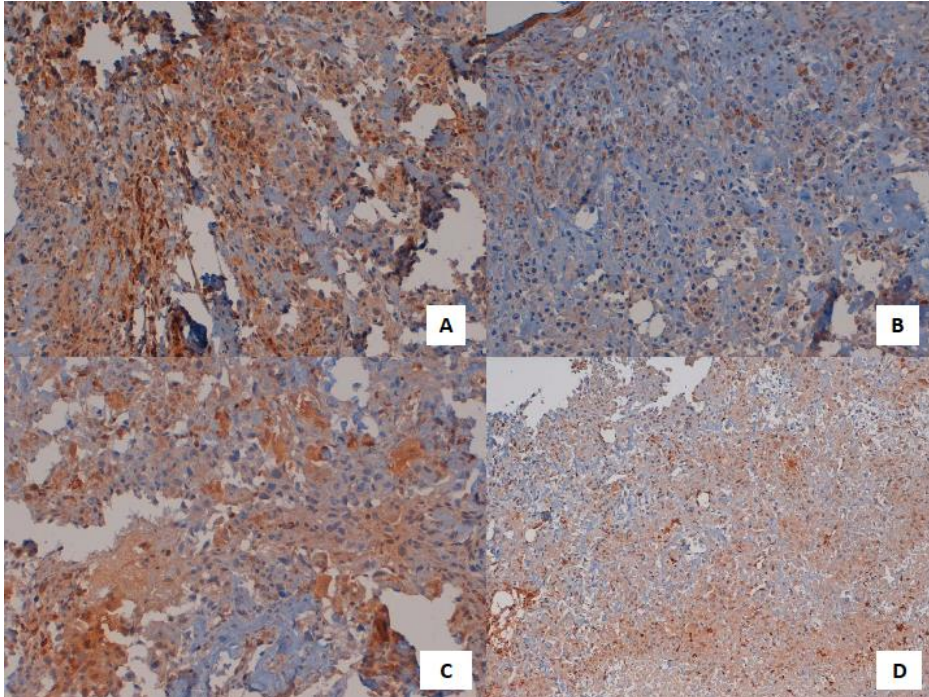


Figura 4.2.4. Expresión de CXCR3 en los distintos tiempos de un OS osteoblástico con inmunotinción con peroxidasa. **A**, expresión intensa de CXCR3 celular y extracelular a las 24h (200X). **B**, expresión moderada de CXCR3 de las mismas características a las 96h (200X). **C**, expresión moderada de CXCR3 celular y extracelular a las 2sem (200X). **D**, expresión intensa de CXCR3 en las células neoplásicas y matriz extracelular osteoide a las 4sem (200X).

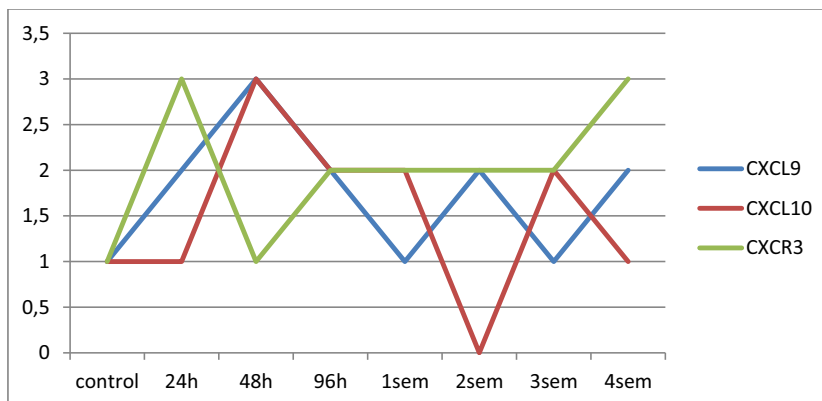


Figura 4.2.5. Gráfica de los niveles de expresión observado de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 según tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el OS.

4.2.2.1.4.-GRO

La expresión de GRO aumenta a las 48h y disminuye posteriormente, acabando siendo nula a la primera semana. El carácter de la expresión es homogéneo y citoplasmático en todas las células neoplásicas. Ver figura 4.2.6.

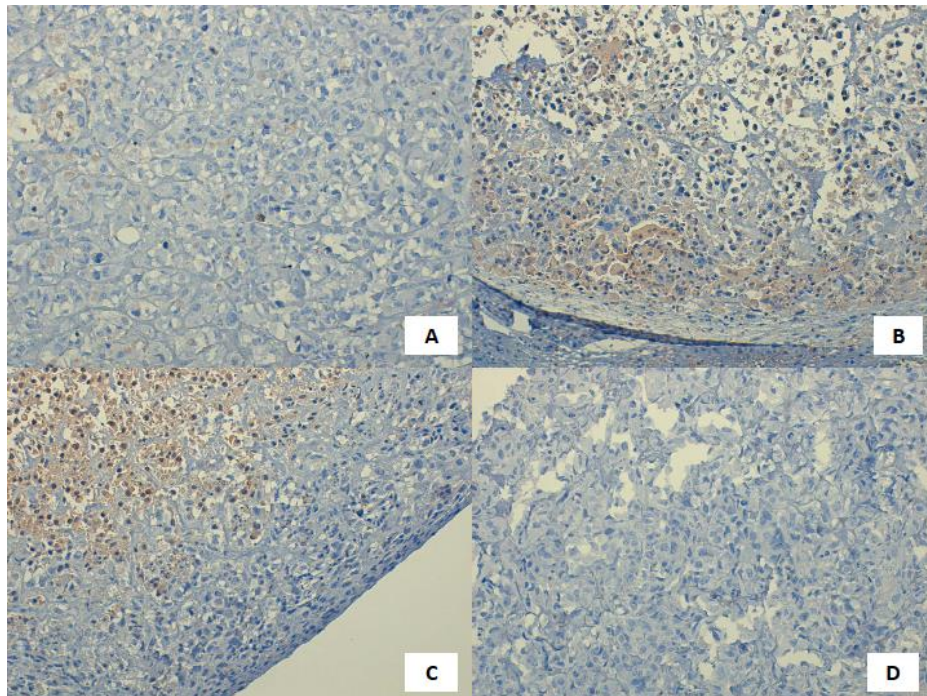


Figura 4.2.6. Expresión de GRO en los distintos tiempos de OS osteoblástico con inmunotinción con peroxidasa. **A**, expresión débil de GRO en el tumor control (200X). **B**, expresión moderada y citoplasmática de GRO a las 48h en las células tumorales y estroma neoplásico (200X). **C**, expresión débil de GRO a las 96h (200X). **D**, expresión ausente de GRO a las 4sem (200X).

4.2.2.1.5.-CXCR2

La expresión citoplasmática es intensa tanto en las células tumorales como en la matriz osteoide en todos los tiempos, esta representa una novedad respecto al resto de sarcomas estudiados, la presencia del receptor en la matriz. La positividad presenta un carácter homogéneo en todo el tumor. Ver figura 4.2.7 y 4.2.8.

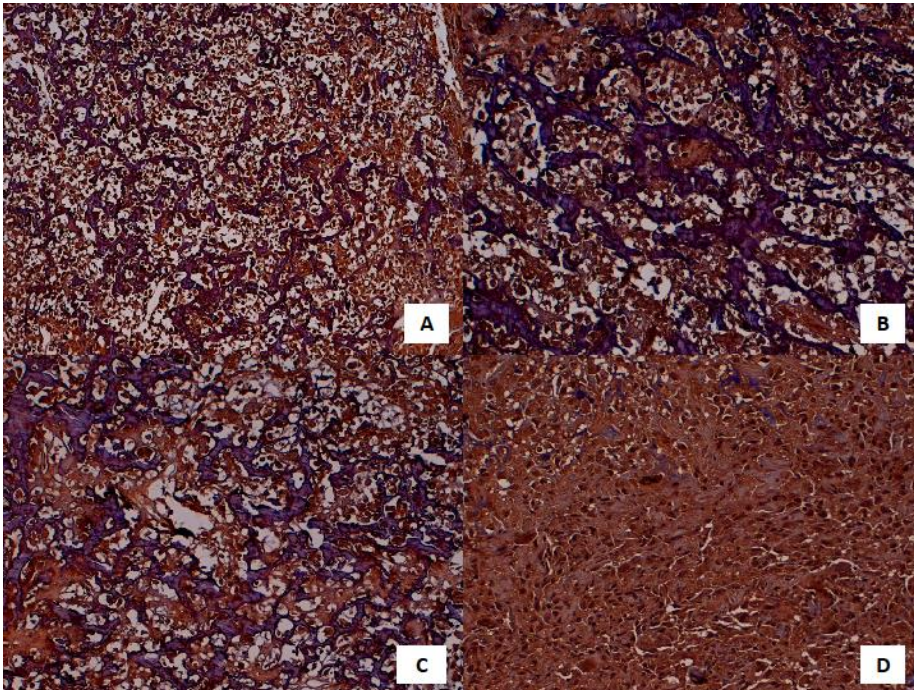


Figura 4.2.7. Expresión de CXCR2 en los distintos tiempos de un OS osteoblástico con inmunotinción con peroxidasa. **A, B, C y D** expresión intensa de CXCR2 en las células tumorales y en el estroma neoplásico a las 24h, 96h, 1sem y 3sem respectivamente (100X).

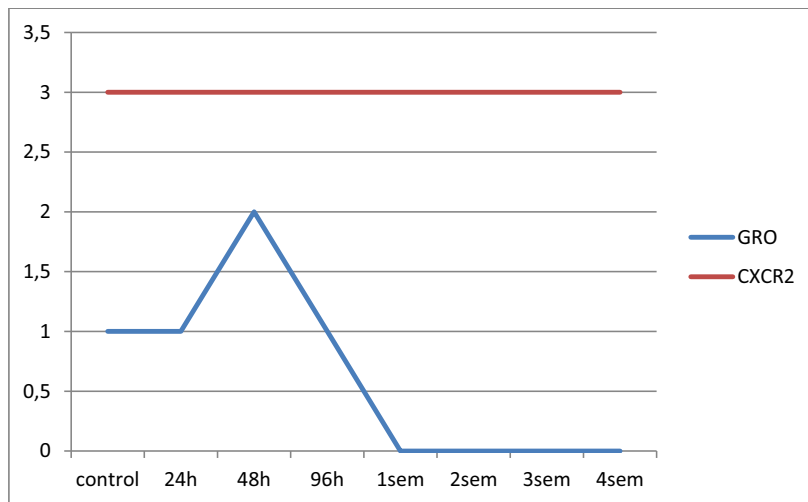


Figura 4.2.8. Gráfica de expresión inmunohistoquímica con peroxidasa de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el OS con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

1. La expresión de receptores de quimiocinas es en general más constante en las primeras fases, mientras que los ligandos muestran pico de expresión claro a las 48h tras el implante.
2. A partir de la tercera semana parece haber otro pico de expresión de CXCR3 y CXCL9 que ascienden en paralelo.
3. En general la intensidad de la expresión de CXCR3 y sus ligandos es parecida mientras que CXCR2 presenta una intensidad claramente mayor que su ligando GRO.

4.2.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.2.2.2.1.-CXCL9-VIMENTINA

La expresión es heterogénea dentro del propio tumor. La expresión de CXCL9 es citoplasmática y de membrana, observándose positividad en la matriz osteoide extracelular. Por otro lado la expresión citoplasmática de vimentina es intensa y homogénea en todos los tiempos y nos distingue claramente la zona de células neoplásicas del estroma murino y áreas de necrosis. Ver figura 4.2.9A.

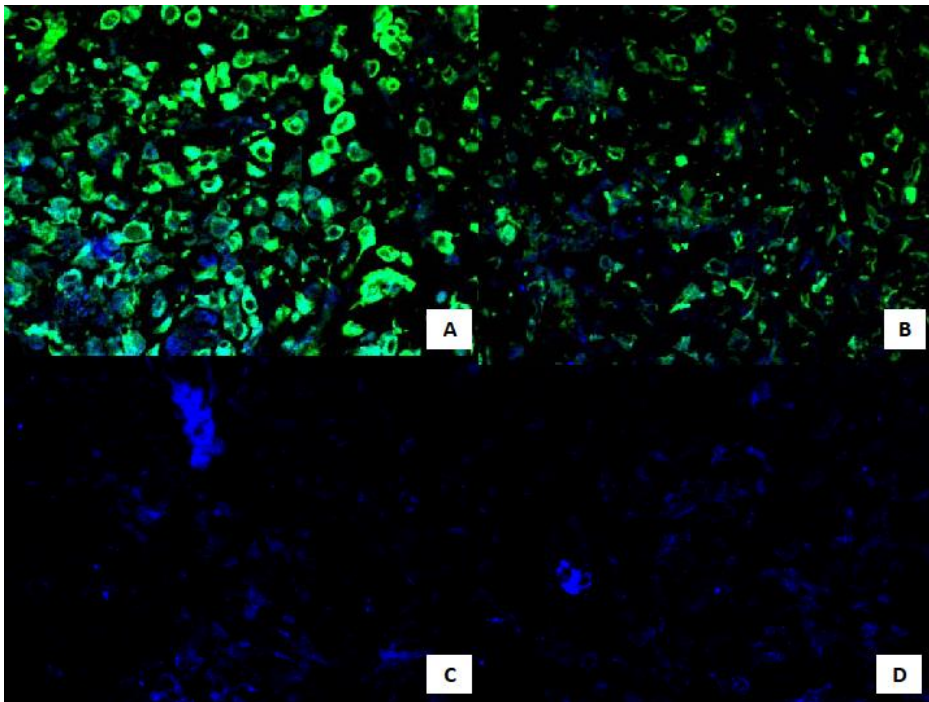


Figura 4.2.9. Expresión de CXCL9 (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión intensa de CXCL9 en las células tumorales y estroma neoplásico a las 24h (400X). **B**, expresión moderada de CXCL9 citoplasmática y extracelular a las 48h (400X). **C**, expresión débil de CXCL9 de las mismas características a las 2sem (400X). **D**, expresión débil de CXCL9 a las 4sem (400X).

4.2.2.2.2.-CXCL10-VIMENTINA

La expresión es más heterogénea que la de CXCL9, en las primeras horas la expresión es más intracelular mientras que en la segunda y cuarta semana la expresión es también extracelular en la matriz osteoide. La tinción es citoplasmática y nuclear (fig.4.2.10A y B). La expresión de vimentina es citoplasmática, intensa y homogénea en las células tumorales permitiéndonos distinguir las áreas de tumor viable del estroma murino y la necrosis tumoral (fig.4.2.10C y D).

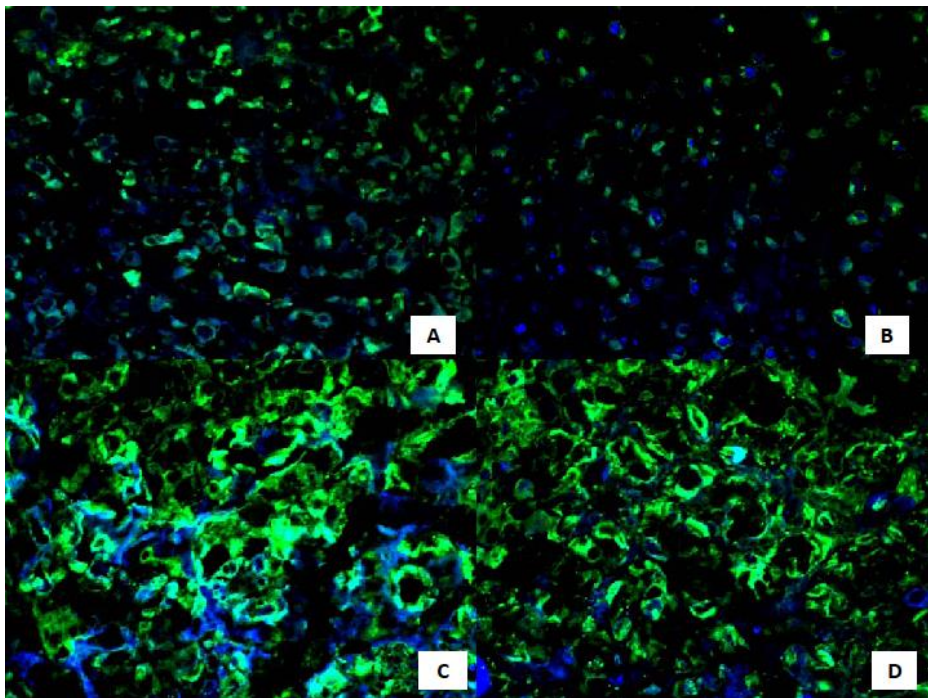


Figura 4.2.10. Expresión de CXCL10 (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión intensa de CXCL10 a las 24h con tinción celular y matricial (400X). **B**, expresión moderada citoplásmica y nuclear de CXCL10 a las 96h (400X). **C**, expresión intensa de CXCL10 extracelular a las 2sem (400X). **D**, expresión moderada intra y extracelular de CXCL10 a las 4sem (400X).

4.2.2.2.3.-GRO-VIMENTINA

La expresión de GRO con la vimentina nos permite demostrar que la expresión es citoplasmática tumoral pero sobre todo es extracelular. La positividad es heterogénea y se acompaña de expresión a nivel extracelular como ocurre con las otras quimiocinas. La expresión de vimentina es citoplasmática, intensa y homogénea en las células tumorales permitiéndonos distinguir las áreas de tumor viable del estroma murino y la necrosis tumoral. La primera y segunda semanas no fueron valorables. Ver figura 4.2.11.

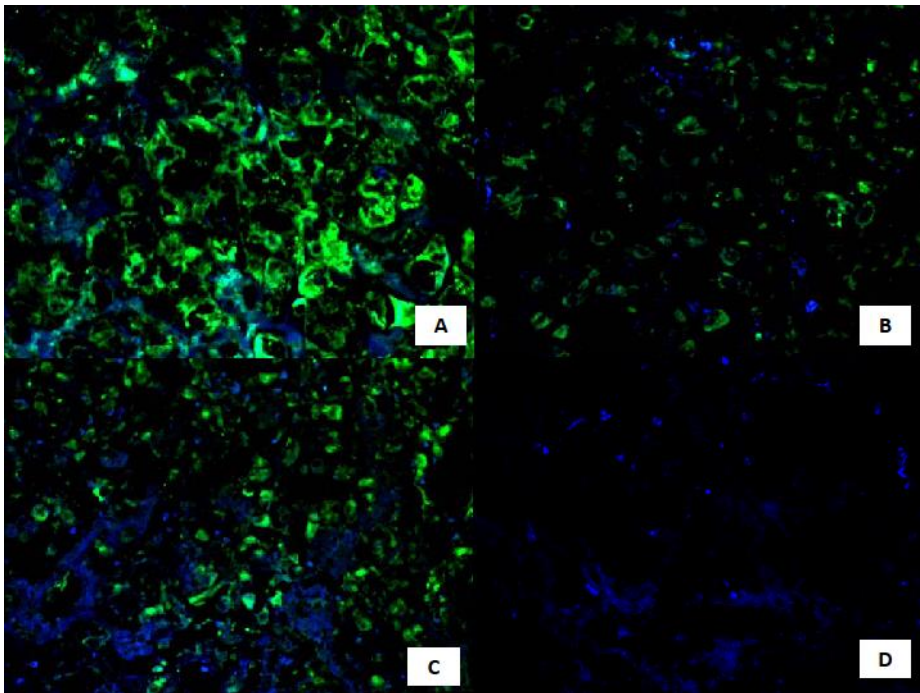


Figura 4.2.11. Expresión de GRO (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión de GRO en el tumor control en las células y el estroma osteoide (400X). **B**, expresión débil de GRO a las 24h (400X). **C**, expresión moderada de GRO a las 96h intra y extracelular (400X). **D**, expresión débil de GRO a las 4sem intra y extracelular (400X).

En resumen podemos destacar que las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO se expresan en el citoplasma de las células neoplásicas así como en la matriz extracelular osteoide de manera heterogénea, sobre todo cabe destacar que suele ser más extracelular la expresión a partir de la segunda semana tras el xenotrasplante.

4.2.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

Expresión de ligando y receptor en las células tumorales y en la matriz extracelular siendo de mayor intensidad en las primeras 24h, disminuyendo en los sucesivos tiempos del implante. Ver figura 4.2.14.

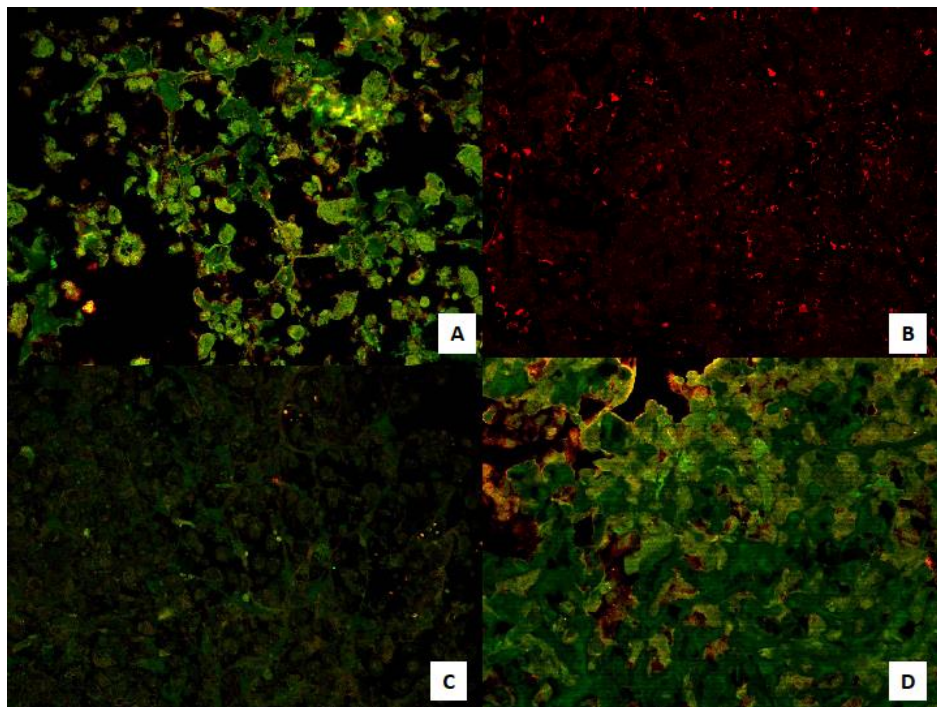


Figura 4.2.12. Expresión de CXCL9 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión intensa de ligando y receptor a las 24h

(400X). **B**, expresión débil de ligando intra y extracelular a las 96h (400X). **C**, expresión débil de ligando y receptor CXCR3 a las 4sem (400X). **D**, expresión moderada de ligando e intensa de receptor en el tumor control expresión tanto intra como extracelular (400X).

4.2.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

Expresión de ligando y receptor en las células tumorales y en la matriz osteoide con expresión más acentuada a las 48h descendiendo progresivamente en los casos posteriores. Ver figura 4.2.14.

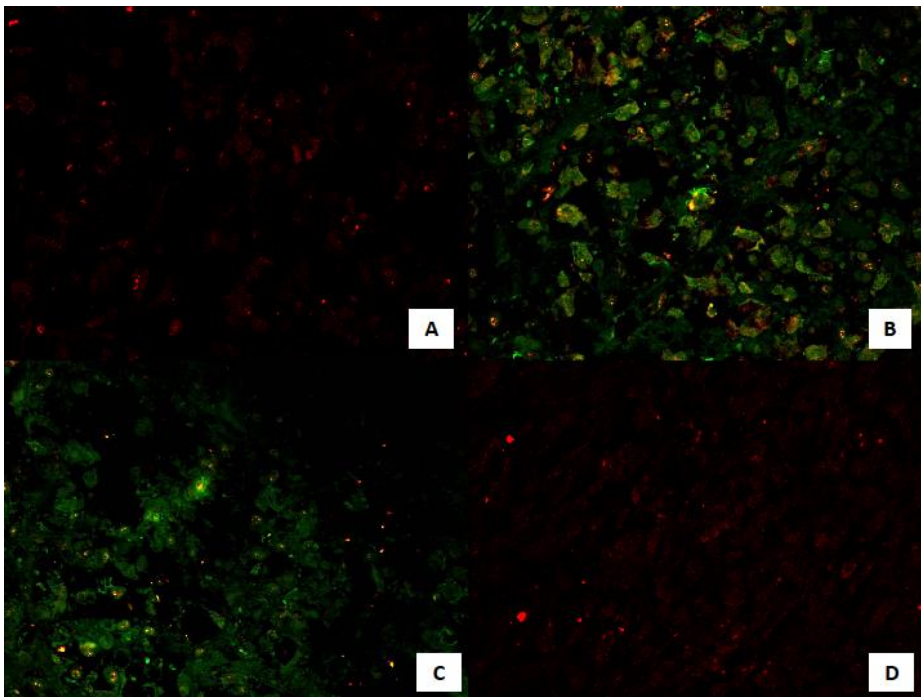


Figura 4.2.13. Expresión de CXCL10 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión débil-moderada de CXCL10 a las 24h, tinción nuclear y granular (400X). **B**, expresión intensa de ligando y receptor a las 48h, tinción del ligando nuclear y granular (400X). **C**, expresión leve de ligando y moderada de receptor a las 96h, expresión del receptor extracelular (400X). **D**, expresión débil de CXCL10 a las 3sem, tinción nuclear (400X).

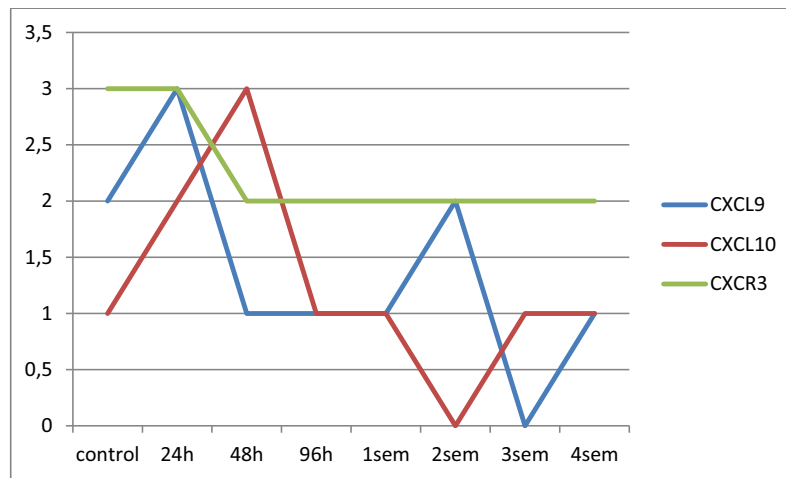


Figura 4.2.14. Gráfica de expresión de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos del OS con IF indirecta. CXCL10 no fue valorable en la segunda semana.

4.2.2.2.6.-GRO-CXCR2

Expresión de ligando en las células tumorales y del receptor en las células tumorales y matriz osteoide (fig.4.2.15D). La expresión es claramente más intensa en las primeras horas después del implante, disminuyendo paulatinamente. Ver figura 4.2.16.

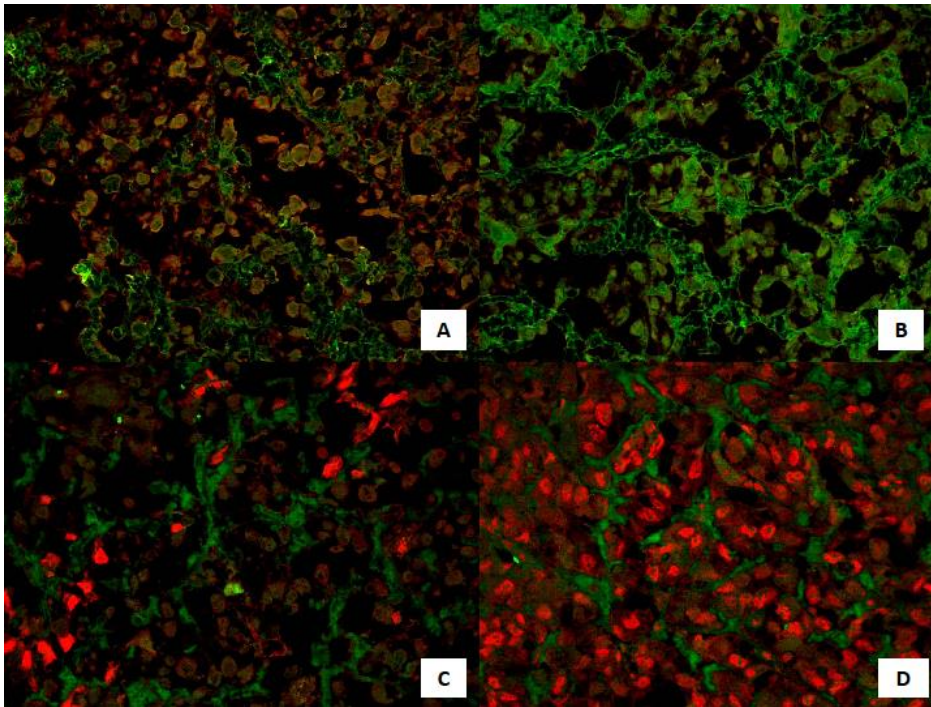


Figura 4.2.15. Expresión de GRO (rojo) y el receptor CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un OS osteoblástico. **A**, expresión intensa de GRO y moderada de CXCR2 a las 24h, expresión extracelular de ambas (400X). **B**, expresión moderada de GRO e intensa de ligando a las 96h con expresión extracelular (400X). **C**, expresión intensa de GRO y moderada del receptor con expresión extracelular a las 2sem (400X). **D**, expresión intensa de ligando y débil de receptor a las 4sem (400X).

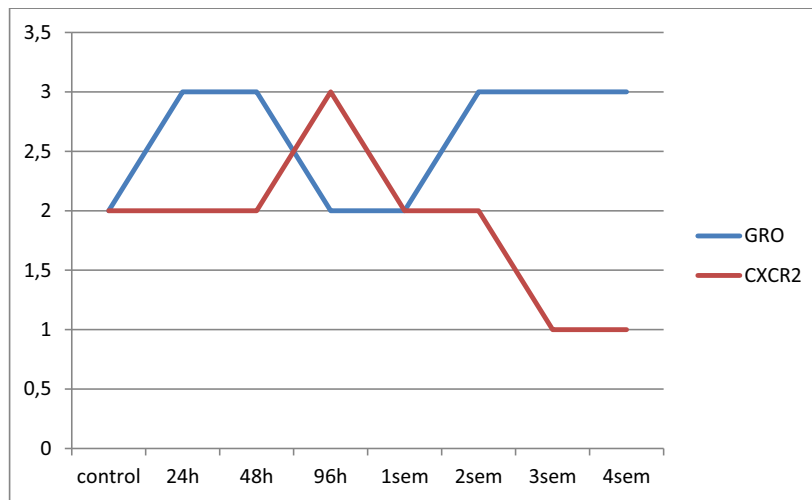


Figura 4.2.16. Gráfica de expresión de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2 en los diferentes tiempos del OS con IF indirecta.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el OS con el estudio inmunohistoquímico :

1. Las células tumorales coexpresan ligandos de linfocinas (CXCL9, CXCL10 y GRO) y sus receptores (CXCR2 y CXCR3).
2. La expresión de ligandos y receptores se observa tanto en las células tumorales como en la matriz osteoide tumoral. La presencia de receptor en la matriz representa una singularidad respecto a los otros sarcomas estudiados.
3. La expresión de CXCL9 y GRO es citoplasmática y nuclear, mientras que la tinción de CXCL10 es fundamentalmente nuclear y puntiforme.
4. Existe un 27.5% de concordancia entre los valores obtenidos con peroxidasa y con IF indirecta en todas la expresión de quimiocinas y sus receptores. CXCR3 es el marcador que más concordancia presenta de todos.
5. La expresión de GRO es mucho más intensa con IF indirecta que con peroxidasa, en el resto de quimiocinas y receptores sucede lo contrario, es más intensa la expresión con peroxidasa en un porcentaje que representa el 40% de todos los casos.

6. La expresión de quimiocinas en IF (CXCL9 y GRO) presenta dos picos de expresión, uno en las primeras 48h y otro a las dos semanas tras el trasplante.
7. CXCL10 presenta un solo pico de expresión en las primeras 48h y comparte un perfil de expresión idéntico tanto en peroxidasa como en IF indirecta donde se observa un bache de expresión a las dos semanas.
8. En general la expresión de ligandos es más fluctuante. Por otra parte, la expresión de receptores es más mantenida y constante en el tiempo por las células tumorales.

4.2.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.2.2.3.1. Índice proliferativo.

El índice proliferativo estudiado con la expresión de Ki67 en las células neoplásicas muestra una menor positividad en las primeras horas del desarrollo tumoral, aumentando su intensidad a partir de la primera semana del injerto tumoral (fig.4.2.17). Este dato se correlaciona con lo que observamos en el estudio morfológico, epígrafe 4.2.1.

Mostramos a continuación una figura gráfica de la expresión del Ki67.

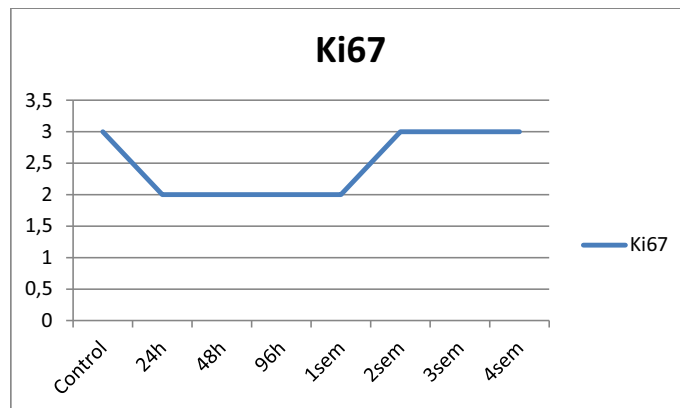


Figura 4.2.17. Gráfica de expresión de Ki67 en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa.

4.2.2.3.2. Factores angiogénicos.

La expresión de VEGF presenta un pico de expresión en las primeras 48h y el segundo en la primera semana del trasplante tumoral. Este perfil de expresión se correlaciona a la vez con los perfiles de sus receptores VEGFR1 y VEGFR2 (fig.4.2.19). Así mismo, la expresión de PDGFRA asciende de manera súbita en las primeras 24h y se mantiene elevada presentando sólo en la primera un pequeño descenso de la expresión a las 96h. Por otro lado la expresión de VE-cadherina es prácticamente nula siendo positiva entre la primera y segunda semana tras el xenoinjerto (fig. 4.2.20).

Podemos decir que los factores angiogénicos sobre todo VEGF y sus receptores, presentan dos picos intensos de expresión, uno en las primeras 48h y otro a partir de la primera semana postrasplante.

Finalmente HIF1A no fue valorable en nuestra experiencia con peroxidasa en el OS.

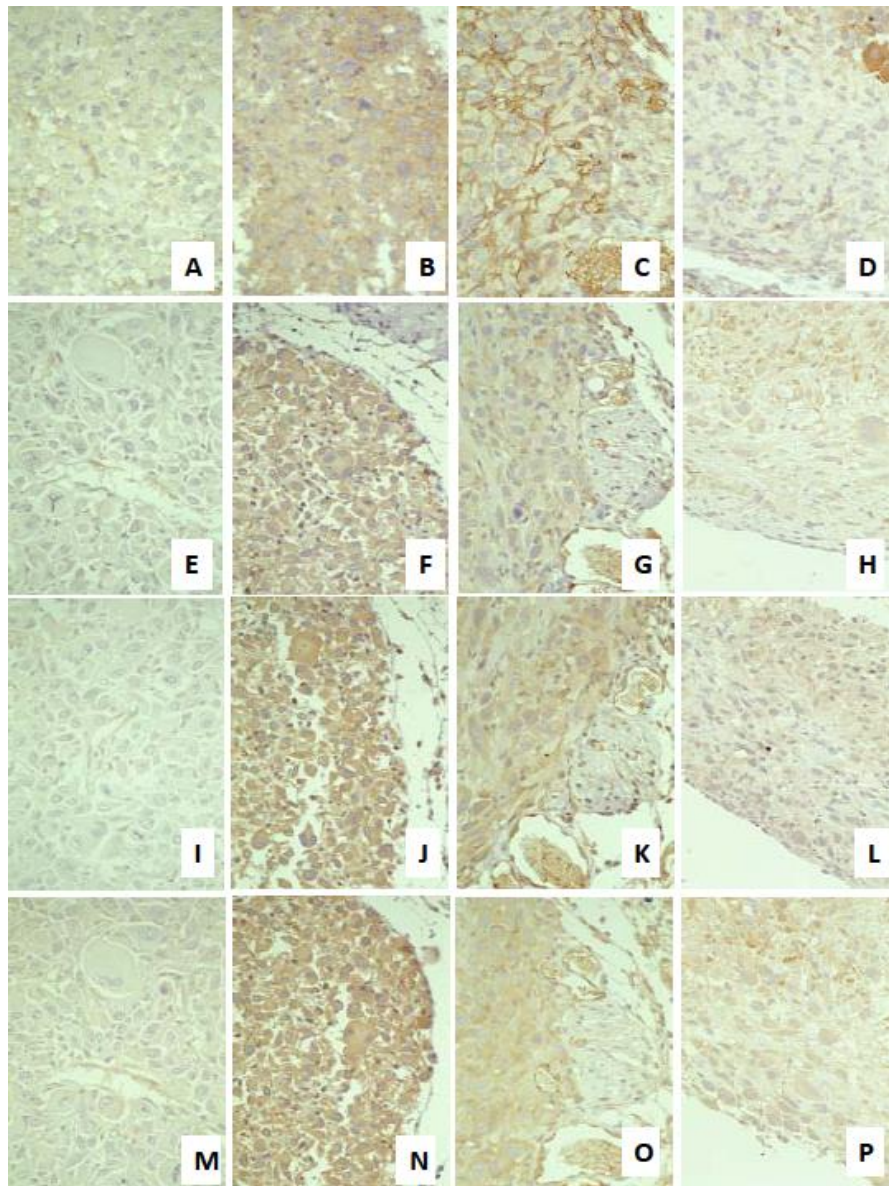


Figura 4.2.18. Expresión con peroxidasa de VEGF y el receptor VEGFR1 en los diferentes tiempos del xenotrasplante en OS. **A**, expresión de VEGF en el tumor control (400X). **B**, expresión de VEGF a las 24h (400X). **C**, expresión de VEGF a las 48h (400X). **D**, expresión de VEGF a las 96h (400X). **E**, expresión de VEGFR1 en el tumor control (400X). **F**, expresión de VEGFR1 a las 24h (400X). **G**, expresión de VEGFR1 a las 48h (400X). **H**, expresión de VEGFR1 a las 96h (400X). **I**, expresión de VEGFR2 en el tumor control (400X). **J**, expresión de VEGFR2 a las 24h (400X). **K**, expresión de VEGFR2 a las 48h (400X). **L**, expresión de VEGFR2 a las 96h (400X). **M**,

expresión de PDGFRA en el tumor control (400X). **N**, expresión de PDGFRA a las 24h (400X). **O**, expresión de PDGFRA a las 48h (400X). **P**, expresión de PDGFRA a las 96h (400X).

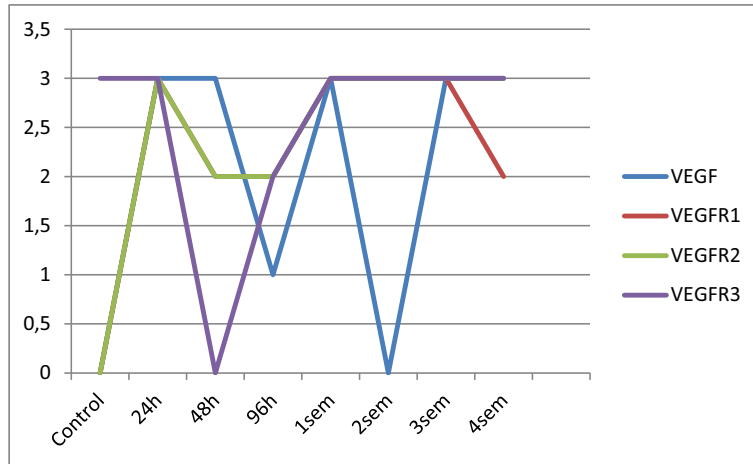


Figura 4.2.19. Gráfica de expresión de VEGF y sus distintos receptores en los diferentes tiempos tras el xenotrasplante.

NV: VEGF a las 2sem; VEGFR3 a las 48h.

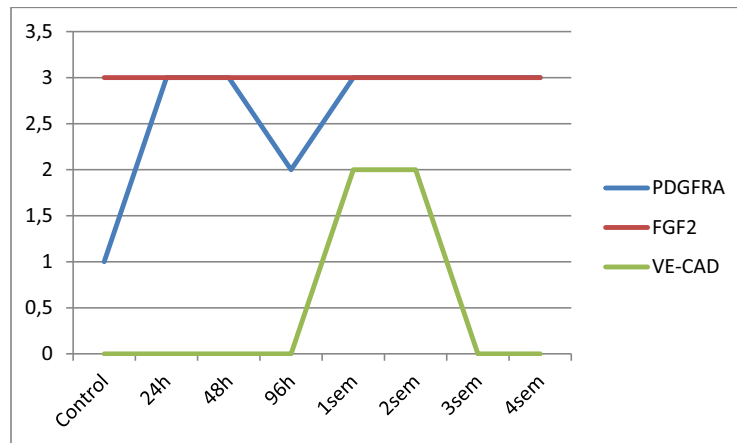


Figura 4.2.20. Gráfica de expresión de los factores PDGFRA, FGF2 y VE-CAD con peroxidasa en los distintos tiempos del xenotrasplante.

4.2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.2.3.1. ELISA

Los resultados de ELISA en la detección de VEGF son superponibles a los encontrados en el ES.

No se encontró expresión de VEGF humano en sangre de ratón, sin embargo, los niveles de VEGF murino en el suero del ratón eran más altos después de la primera semana de la implantación del tumor (fig. 4.2.21), sugiriendo que: primero, el VEGF humano se produce a nivel local para estimular las células endoteliales de los capilares del huésped que rodean al tumor (que se produce en la fase temprana de la experiencia, durante la inducción angiogénica); y segundo, que la expresión de VEGF murino aumenta principalmente en la fase tardía de la experiencia probablemente asociada no sólo con el crecimiento tumoral sino también con la movilización de células pluripotenciales angioblásticas procedentes de la médula ósea de los ratones que contribuirán a la remodelación angiogénica en el tumor.

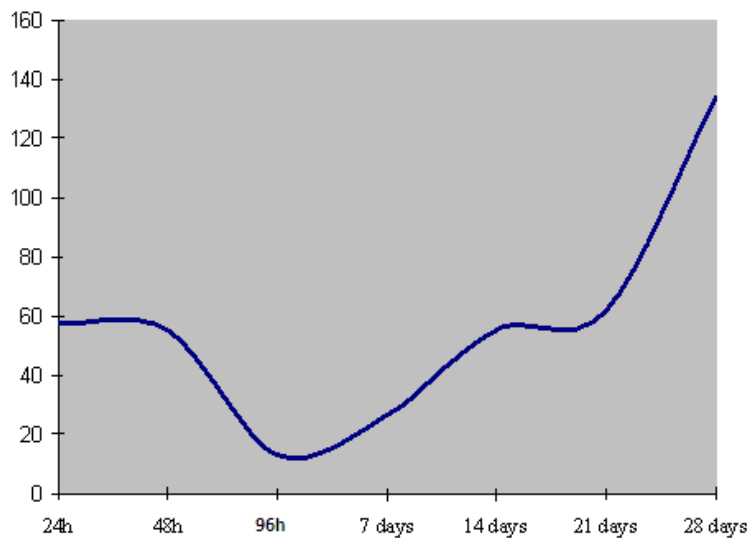


Figura 4.2.21. Perfil de los niveles de expresión en suero de ratón de VEGF murino en la experiencia de OS. Muestran un incremento de la expresión en la fase tardía de la experiencia. Unidades eje ordenadas pg/ml.

4.2.3.2. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluidica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación.

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite” v3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.2.22 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal. De este conglomerado se obtiene la siguiente información:

1- Las muestras de 24h, 48h, 96h y 4sem comparten un perfil genómico similar y difieren del perfil genómico observado en las muestras correspondientes a 1sem, 2sem y 3sem. Además, se pueden distinguir dos patrones de expresión: la fase temprana (las primeras 96h) que enlaza con la activación morfológica e inmunohistoquímica del proceso de angiogénesis; y la fase tardía que se asocia con el proceso de remodelación angiogénica y que incluiría la movilización de células angioblásticas procedentes de la médula ósea del ratón hacia el tumor.

2- La fase temprana está definida por 5 conglomerados de genes (fig. 4.2.23). Estos conglomerados se caracterizan por la sobreexpresión de genes claramente involucrados en la inducción angiogénica. Entre los genes incluidos es este grupo están: *VEGF*, *PDGFA*, *PDGFB*, *VEGFC* y sus receptores.

3- Por otro lado, en la fase tardía del proceso angiogénico o fase de remodelación vascular (1sem, 2sem y 3sem) los genes se agrupan en tres grupos según su sobreexpresión (fig.4.2.24). Entre esos genes se encuentran los siguientes: *THBS1*, *FGFR2*, *ITGAV*, *ANGPT1*, *MDK*, *PDGFRA* e *HIF1A*.

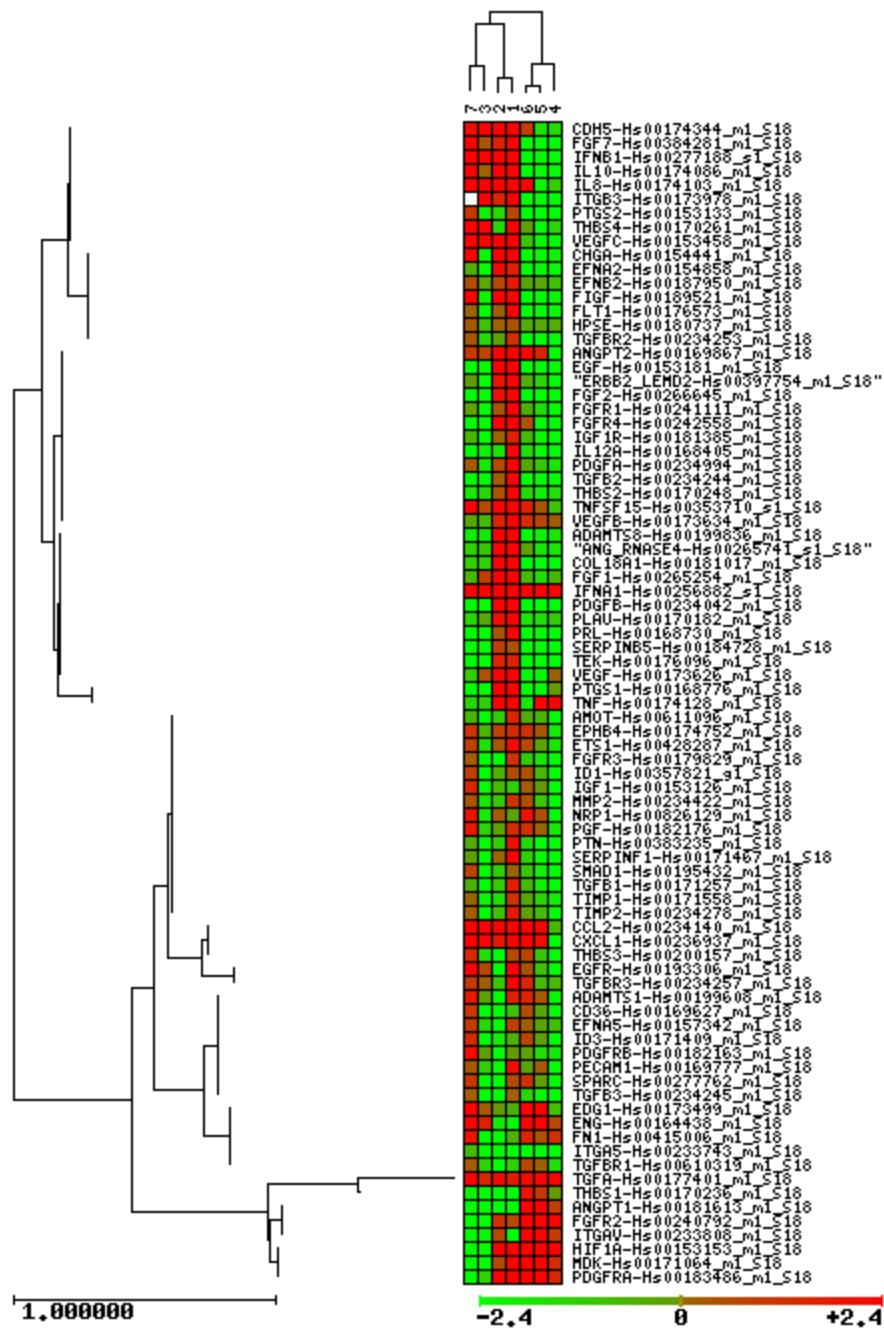


Figura 4.2.22. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis del OS osteoblástico. 1, 24h; 2, 48h; 3, 96h; 4, 1sem; 5, 2sem; 6, 3sem; 7, 4sem.

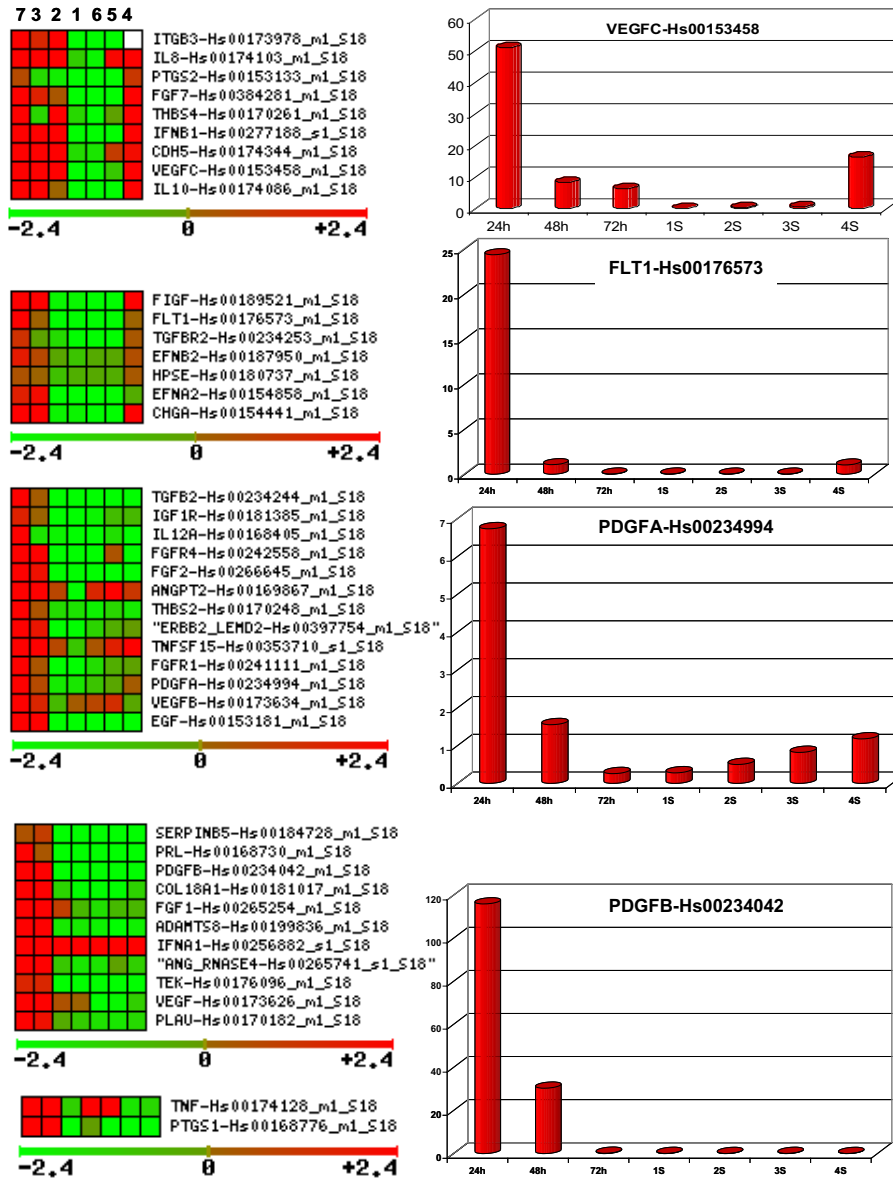


Figura 4.2.23. Conglomerados de genes sobreexpresados en las fases tempranas de la inducción de la angiogénesis en el OS. 1, 24h; 2, 48h; 3, 96h; 4, 1sem; 5, 2sem; 6, 3sem; 7, 4sem.

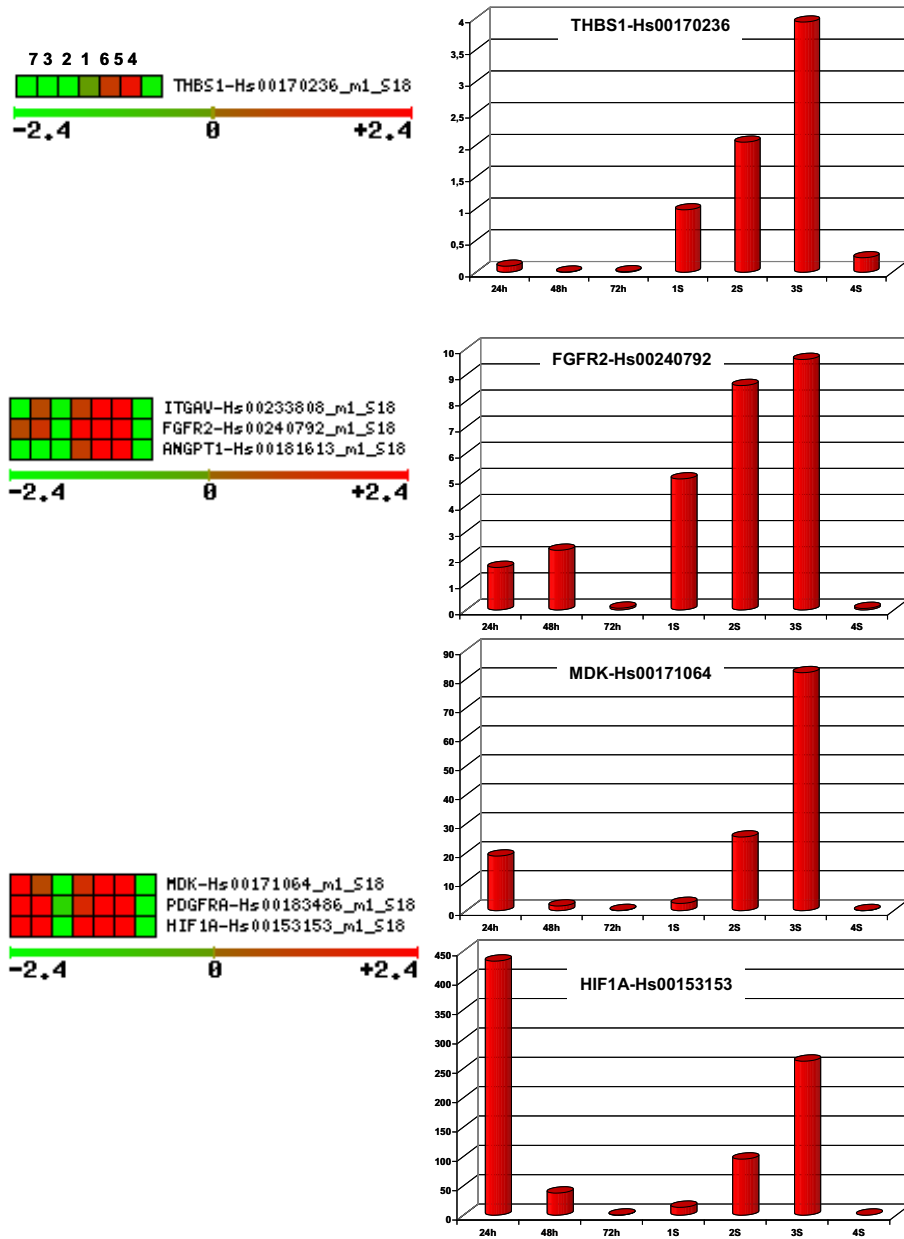


Figura 4.2.24. Conglomerados de genes sobreexpresados en la fase tardía de remodelación de la angiogenesis en el OS. 1, 24h; 2, 48h; 3, 96h; 4, 1sem; 5, 2sem; 6, 3sem; 7, 4sem.

4.3. CONDROSARCOMA GRADO 3

El tumor procede de una línea tumoral cultivada *ch-2879*³⁶⁴ cuyo tumor primario estaba localizado en la pared torácica. Dicha línea de cultivo fue inoculada en el tejido celular subcutáneo de la espalda en ratones nude y creció en ellos. Una vez el tumor se desarrolló en la espalda del ratón, se sacrificó y se utilizó en la experiencia, así que en este caso no llegó a producirse ningún pase entre ratones.

El tumor está constituido por células fusiformes y ovaladas que crecen en un estroma mixoide y condroide inmaduro.

4.3.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

El tejido peritumoral en todos los casos y de forma constante presenta células mesenquimales angioblásticas y no angioblásticas en un estroma mixoide intersticial y denso acompañado de una proliferación capilar angiogénica. El área peritumoral que divide el la cápsula tumoral del huésped muestra una hiperemia con proliferación de pequeños vasos capilares.

En las primeras 48h, se observan pequeñas áreas hemorrágicas peritumorales junto a abundantes figuras de cariorrexis que coincide con el momento de mayor necrosis tumoral, de hipoxia y de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear intratumoral (fig.4.3.1A y B). En este periodo el número de mitosis es más bajo que el que observamos a partir de la primera semana (fig.4.3.17). Se observan mitosis típicas y atípicas. La necrosis tumoral al igual que en el Ch grado 2 es geográfica y parcheada y no alcanza a formar un core de necrosis como en el que vemos en el ES y OS.

A partir de la primera semana, se observan adipocitos maduros en el estroma peritumoral. El índice proliferativo comienza a incrementarse como se comprueba con la técnica inmunohistoquímica de Ki67 (fig.4.3.17). Las áreas de necrosis se reducen y en la tercera semana es prácticamente nula.

Las células tumorales adquieren una apariencia fibroblástica y mesenquimal con numerosas células neoplásicas mostrando grandes gotas lipídicas como vacuolas intracitoplasmáticas a modo de pseudodegeneración lipídica (fig.4.3.1C).

La cápsula tumoral muestra una prominente proliferación vascular y en muchos campos aparecen células fusiformes rodeadas de matriz condral inmadura, entremezclada con angioblastos y células tumorales desdiferenciadas fusiformes (fig.4.3.1D).

La cuarta semana no fue valorable por falta de tumor en la muestra.

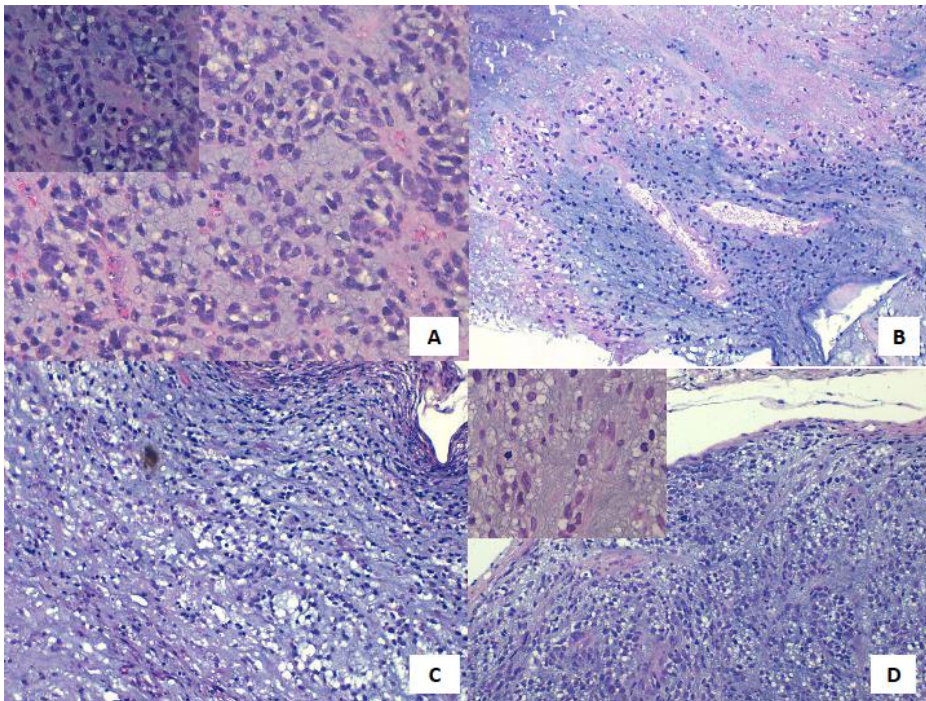


Figura 4.3.1. Imágenes de histopatológicas del Ch grado 3 en los diferentes tiempos (H&E). **A**, muestra de Ch grado 3 a las 24h (200X) con abundantes figuras de cariorrexis (detalle 630X). **B**, muestra de Ch grado 3 a las 48h (40X) con abundante necrosis. **C**, muestra de Ch grado 3 con abundante celularidad tipo fibroblástica y pseudodegeneración lipídica intracitoplasmática en la 1sem (100X). **D**, muestra de Ch grado 3 en la 2sem (40X) con abundantes mitosis (detalle 400X).

4.3.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

A continuación se describen los resultados de la expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO junto a sus respectivos receptores CXCR3 y CXCR2. En primer lugar se expondrán los resultados con peroxidasa para a continuación destacar los resultados con inmunofluorescencia indirecta.

4.3.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.3.2.1.1.-CXCL9

La expresión citoplasmática de CXCL9 en el Ch grado 3 muestra una intensidad leve-moderada de características homogéneas, observándose una expresividad ligeramente mayor en las primeras 24h tras el implante. Se observa ligera expresión en el estroma tumoral (fig.4.3.2A).

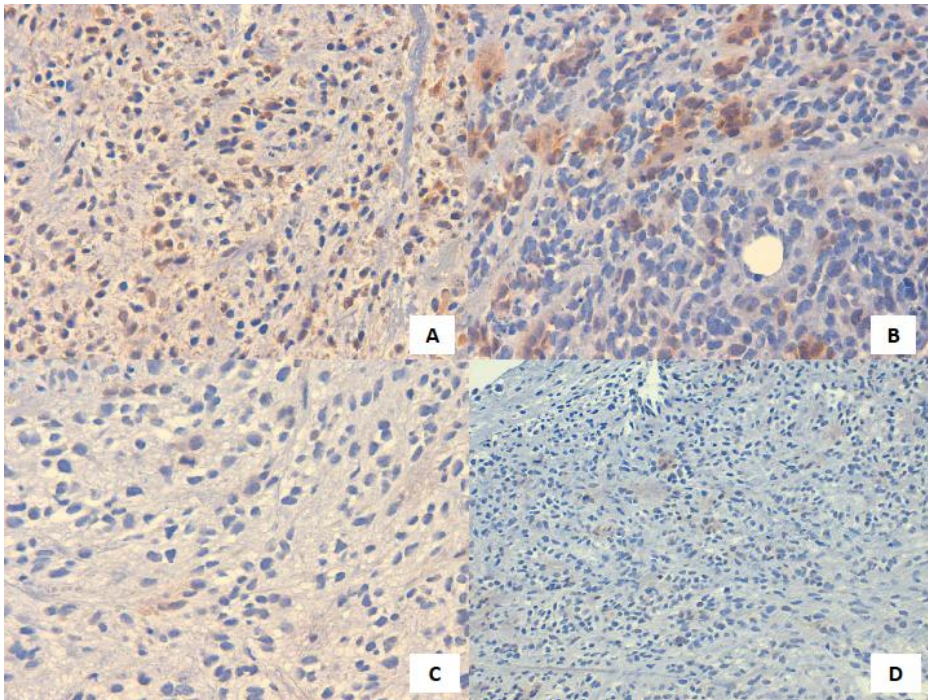


Figura 4.3.2. Expresión de CXCL9 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 3. **A**, expresión leve de CXCL9 en las células tumorales y el estroma en el tumor control (200X). **B**, expresión débil de CXCL9 tumoral y estromal a las 24h (200X). **C**, expresión muy débil de CXCL9 en la 1sem (200X). **D**, expresión muy débil de CXCL9 en la 2sem (100X).

4.3.2.1.2.-CXCL10

La expresión con peroxidasa del ligando CXCL10 es débil y nuclear en general en todos los tiempos siendo nula en las primeras 24h. Se observa ligera expresión en la matriz extracelular. Ver figura 4.3.3A.

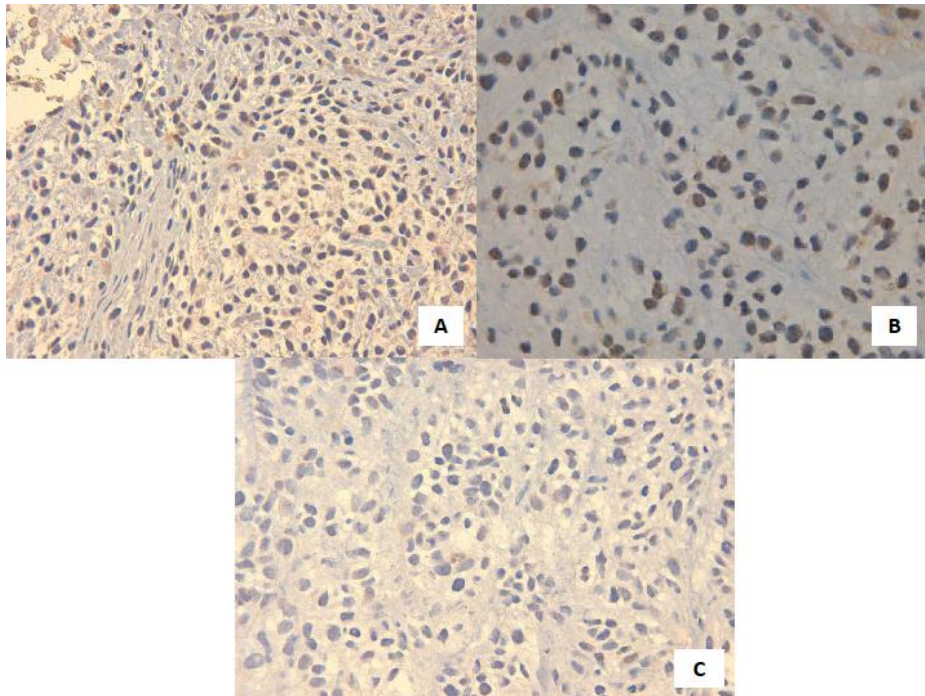


Figura 4.3.3. Expresión de CXCL10 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 3. **A**, expresión moderada y nuclear de CXCL10 en el tumor control y en el estroma (200X). **B**, expresión débil y nuclear de CXCL10 en la 1sem, tinción nuclear (630X). **C**, expresión muy débil de CXCL10 en la 2sem (200X).

4.3.2.1.3.-CXCR3

La expresión del receptor CXCR3 es citoplasmática de características homogéneas en todas las células tumorales y a nivel extracelular. La expresión es más acentuada a las 24h postxenotrasplante disminuyendo ligeramente después de este tiempo. Ver figura 4.3.4B.

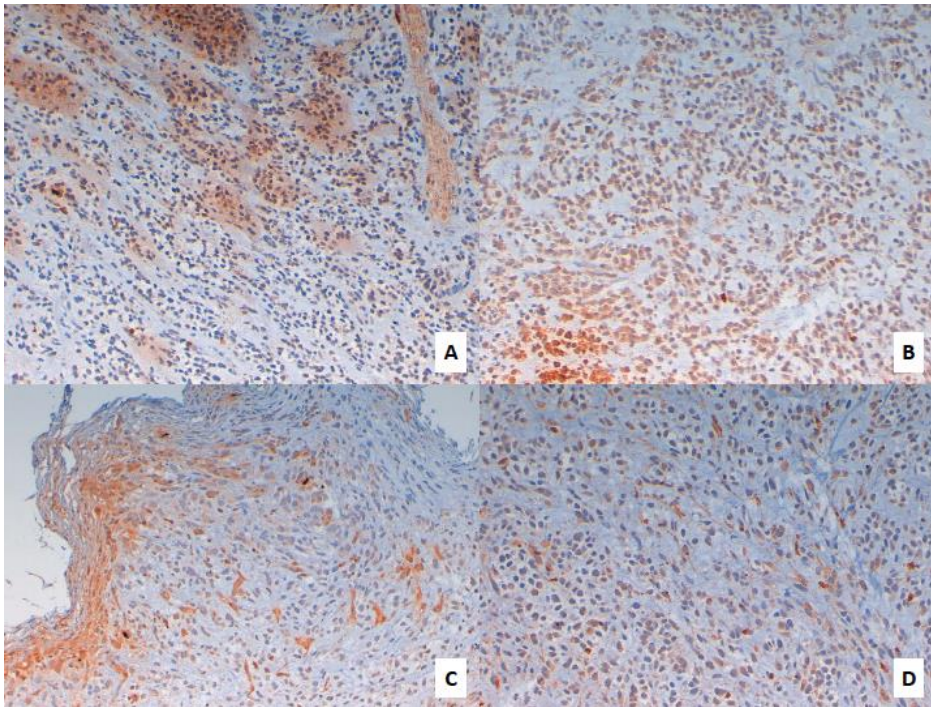


Figura 4.3.4. Expresión de CXCR3 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 3. **A**, expresión débil de CXCR3 en la matriz condral y células tumorales en el tumor control (200X). **B**, expresión intensa de CXCR3 a las 24h en las células neoplásicas y la matriz condral (200X). **C**, expresión moderada de CXCR3 en la 1sem en el tumor y en el estroma peritumoral en la 1sem (100X). **D**, expresión moderada de CXCR3 en la 2sem por las células y matriz tumoral (200X).

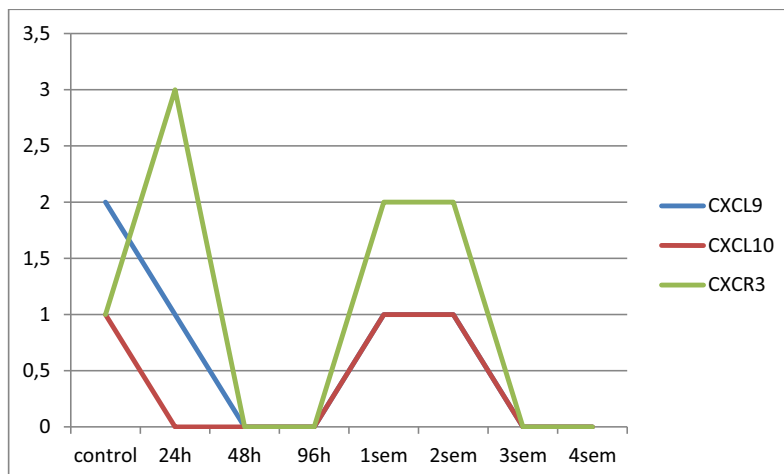


Figura 4.3.5. Gráfica de los niveles de expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 según tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el Ch grado 3. NV: 48h, 96h, 3sem y 4sem.

4.3.2.1.4.-GRO

La expresión de GRO con peroxidasa es muy escasa siendo prácticamente nula en todos los tiempos. Ver figura 4.3.8.

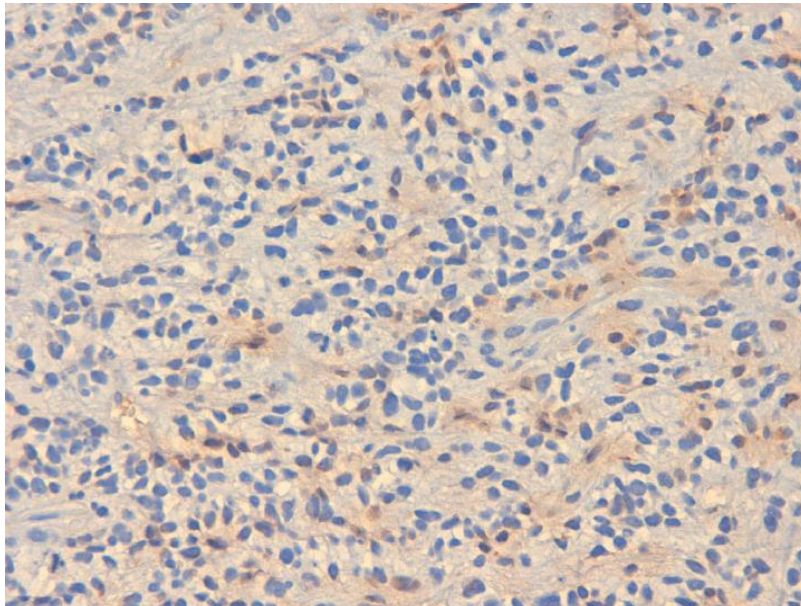


Figura 4.3.6. Expresión débil de GRO en el citoplasma de las células tumorales y en la matriz condral en el tumor control (200X).

4.3.2.1.5.-CXCR2

Expresión citoplasmática, membranosa y de características homogénea en las células tumorales, en todos los tiempos del xenotrasplante (fig. 4.3.7).

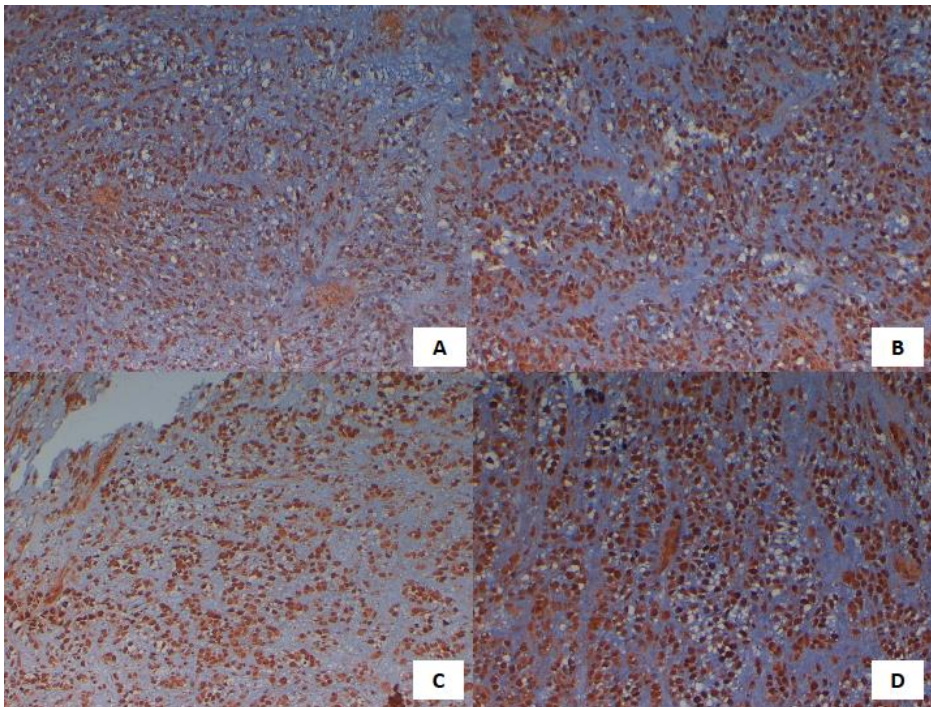


Figura 4.3.7. Expresión de CXCR2 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 3. **A, B, C y D,** expresión intensa de CXCR2 en el tumor control, 24h, 1sem y 2sem respectivamente (200X).

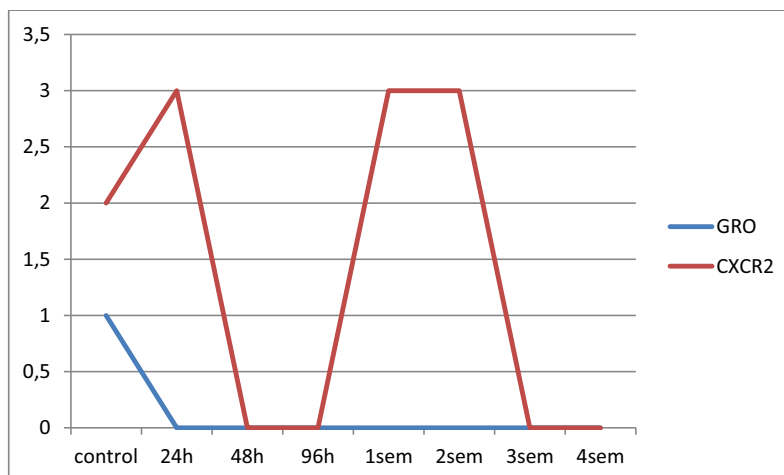


Figura 4.3.8. Gráfica de expresión de GRO y su receptor en los diferentes tiempos del Ch grado 3 con peroxidasa. NV: 48h, 96h, 3sem y 4sem.

En **resumen** podemos destacar que en nuestra experiencia en el Ch grado 3 con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

1. En general la expresión de los ligandos es débil en casi todos los tiempos. No hay picos de expresión a diferencia del resto de casos estudiados.
2. La expresión de los receptores es más intensa y mantenida, al igual que el resto de tumores estudiados.
3. En algunos casos, las quimiocinas y el receptor CXCR3 parecen expresarse en la matriz condral extracelular.
4. El alto número de muestras no valorables dificulta la interpretación de los resultados.

4.3.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.3.2.2.1.-CXCL9-VIMENTINA

La expresión citoplasmática y nuclear del ligando CXCL9 es más intensa en el tumor establecido siendo débil en el resto de tiempos. La positividad se observa en las células tumorales y de manera puntual en el estroma. Ver figura 4.3.9A. La vimentina presenta una positividad homogénea, intensa y citoplasmática, eclipsando en algunos casos la expresión de quimiocina.

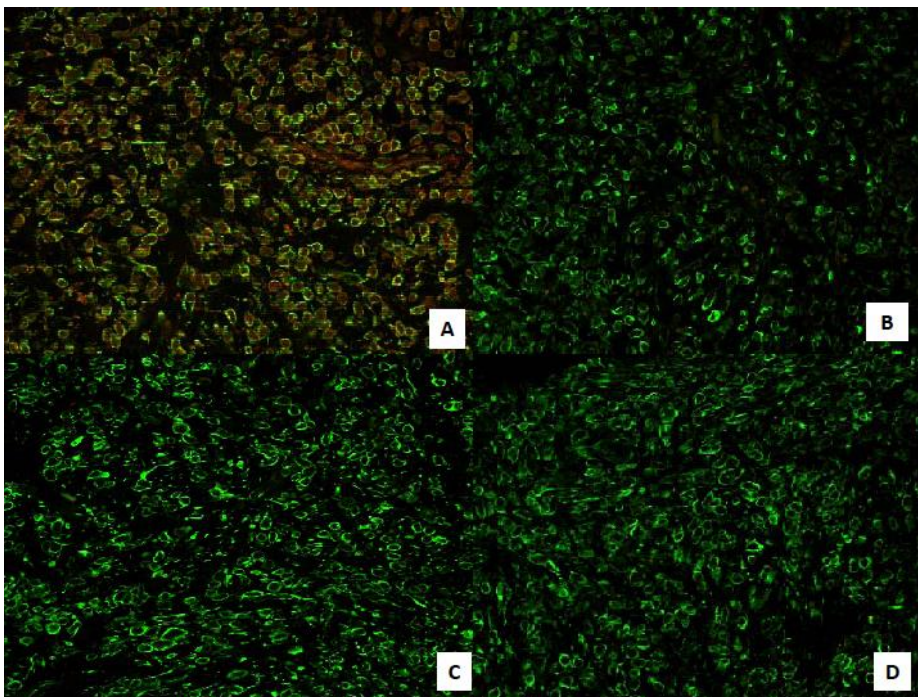


Figura 4.3.9. Expresión de CXCL9 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión intensa de CXCL9 citoplasmática y nuclear en las células tumorales y en el estroma en el tumor control (400X). **B**, expresión débil de CXCL9 a las 24h (400X). **C**, expresión muy débil de CXCL9 en la 1sem (400X). **D**, expresión ausente de CXCL9 en la 2sem (400X).

4.3.2.2.2.-CXCL10-VIMENTINA

La expresión nuclear en las células tumorales es moderada y homogénea de CXCL10 en la mayoría de tiempos. Ver figura 4.3.10. Por otro lado, la vimentina presenta una positividad intensa, citoplasmática y homogénea en todas las células neoplásicas. En algunos casos dicha intensidad eclipsa la expresión de quimiocina.

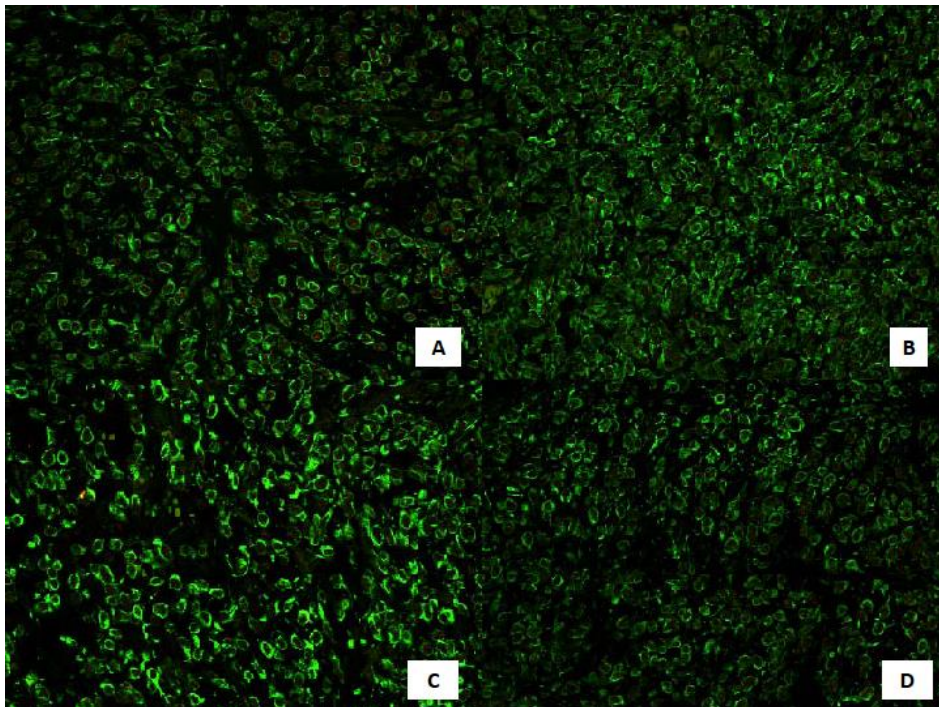


Figura 4.3.10. Expresión de CXCL10 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión intensa nuclear de CXCL10 en el tumor control (400X). **B**, expresión nuclear de CXCL10 en las 24h (400X). **C**, expresión débil y nuclear de CXCL10 en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada y nuclear de CXCL10 en la 2sem (400X).

4.3.2.2.3.-GRO-VIMENTINA

La expresión de GRO por parte de las células tumorales es citoplasmática y nuclear. Ver figura 4.3.11A. Curiosamente en alguno de los tiempos se observa

expresión de la quimiocina en el estroma tumoral (fig. 4.3.11C). La vimentina presenta las mismas características que en los casos anteriores.

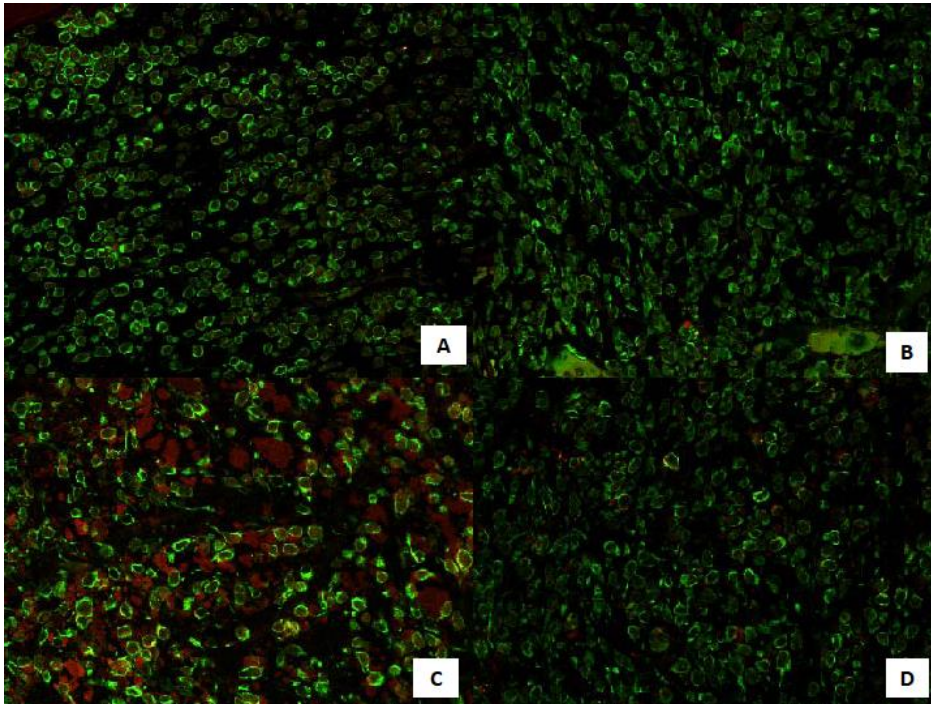


Figura 4.3.11. Expresión de GRO (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión moderada y nuclear de GRO en el tumor control (400X). **B**, expresión muy débil de GRO a las 24h (400X). **C**, expresión intensa de GRO en la 1sem en las células tumorales y el estroma condral (400X). **D**, expresión moderada y nuclear de GRO en la 2sem (400X).

4.3.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

Expresión de ligando citoplasmática y nuclear, es homogénea y moderada en todos los tiempos. Por otra parte, la expresión del receptor CXCR3 muestra una expresividad homogénea en todas las células neoplásicas y variada en intensidad siendo ligeramente más positiva en las primeras 24h del xenotrasplante. La expresión del receptor parece también estromal. Ver figura 4.3.12B.

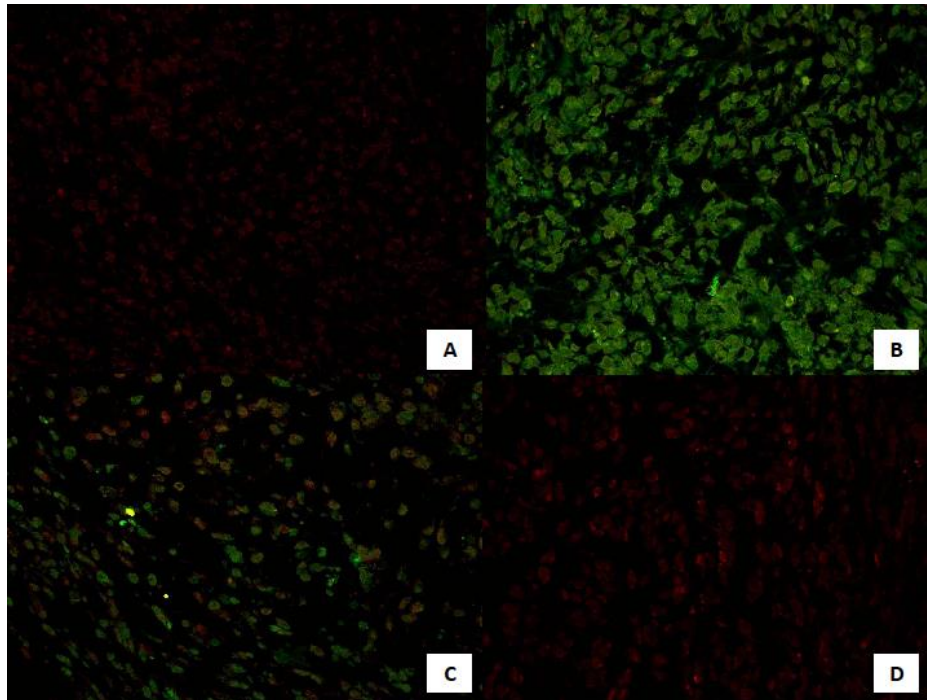


Figura 4.3.12. Expresión de CXCL9 (rojo) y CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión débil-moderada de ligando en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de CXCL9 e intensa del receptor a las 24h (400X). **C**, expresión moderada de ligando y receptor en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada citoplasmática y nuclear de CXCL9 en la 2sem (400X).

4.3.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

La positividad para la quimiocina es nuclear y citoplasmática. La expresión es más intensa del ligando y receptor a las 24h, manteniéndose posteriormente la expresión del receptor y del ligando moderada en el resto de los tiempos en los que pudo valorarse la inmunohistoquímica. Se observa expresión de CXCR3 en el estroma murino peritumoral. Ver figura 4.3.13C.

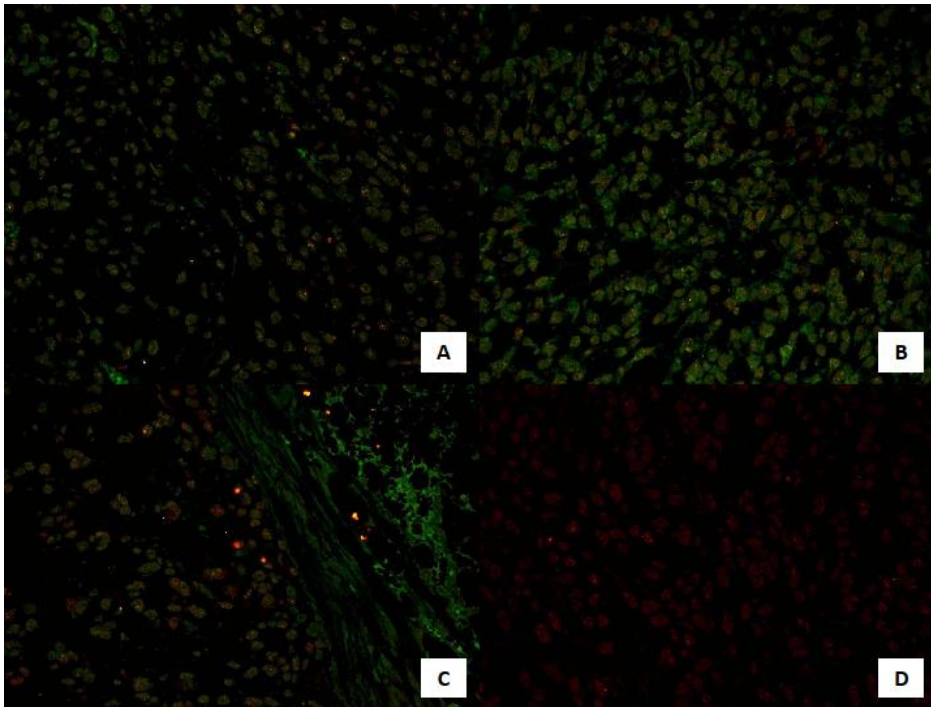


Figura 4.3.13. Expresión de CXCL10 (rojo) y CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión leve de ligando y moderada de receptor en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de ligando (nuclear granular) e intensa de receptor a las 24h, CXCL10 presenta una tinción nuclear y granular (400X). **C**, expresión moderada de ligando (nuclear) y receptor que se expresa también en el estroma murino peritumoral en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada de CXCL10 nuclear en la 2sem (400X).

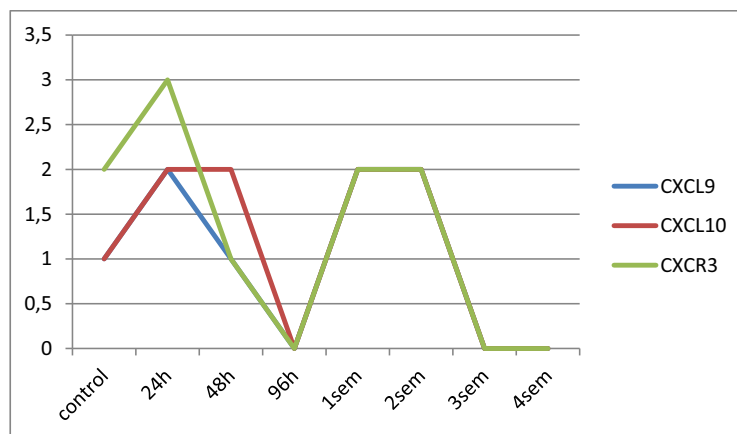


Figura 4.3.14. Gráfica de expresión de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos del Ch grado 3 con IF indirecta. NV: 96h, 3sem y 4sem.

4.3.2.2.6.-GRO-CXCR2

La expresión de GRO es citoplasmática y nuclear de intensidad moderada. En la primera semana se observa una positividad ligeramente mayor en las células que se encuentran en el área periestromal (fig.4.3.15C). La expresión citoplasmática y de membrana del receptor CXCR2 es intensa a las 24h pasando a ser moderada en el resto de casos. Ver figura 4.3.16.

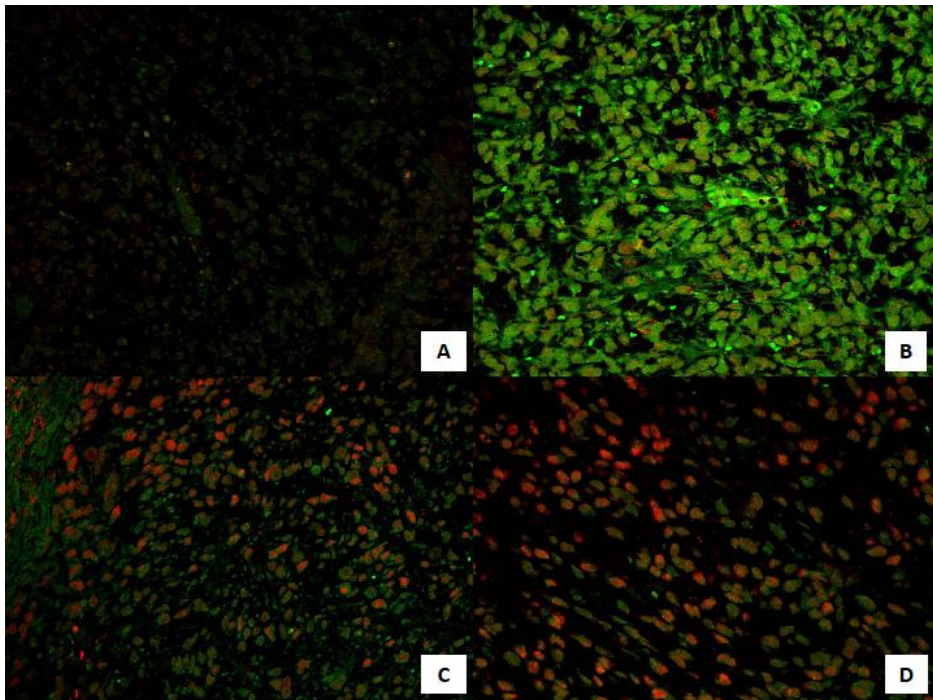


Figura 4.3.15. Expresión de GRO (rojo) y CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta de un Ch grado 3. **A**, expresión débil de GRO y su receptor en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada-intensa de GRO y el receptor a las 24h (400X). **C**, expresión moderada de GRO y CXCR2 en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada-intensa de ligando y moderada de receptor en la 2sem (400X).

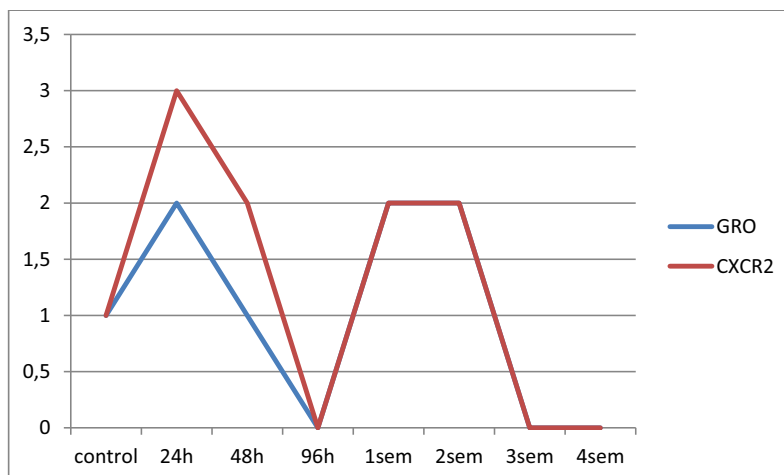


Figura 4.3.16. Gráfica de expresión de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2 en los diferentes tiempos del Ch grado 3 con IF indirecta. NV: 96h, 3sem y 4sem.

La concordancia de las técnicas inmunohistoquímicas con peroxidasa e IF fue de un 30%. En general la señal con IF fue ligeramente superior a la peroxidasa (50% de los casos) excepto en el CXCR2 donde la intensidad con peroxidasa fue ligeramente superior a la IF.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el Ch grado 3 con el estudio inmunohistoquímico:

1. Las células tumorales producen de forma constitutiva quimiocinas y receptores y se encuentran tanto a nivel intracelular como extracelular en algunos casos tanto en IF (fig.4.3.11C) como en peroxidasa (fig. 4.3.6).
2. En algún caso hemos observado expresión de CXCR3 en el estroma peritumoral murino (fig. 4.3.13C).
3. La expresión de CXCL9 y GRO es citoplasmática y nuclear mientras que la de CXCL10 es prácticamente nuclear con una tinción característicamente granular o nucleolar.
4. La expresión de quimiocinas y receptores es moderada y constante en este caso. Se observa dos picos de expresión de los ligandos, uno en las primeras 24h y un segundo menos intenso en las dos primeras semanas,

aunque cabe reconocer que estos datos se encuentran sesgados por el fallo de interpretación de la expresión a las 96h en este caso.

5. Los ligandos y receptores comparten el mismo perfil de expresión (fig. 4.3.14 y 4.3.16).
6. La concordancia de las técnicas inmunohistoquímicas con peroxidasa e IF fue de un 30%. En general la señal con IF fue ligeramente superior a la peroxidasa (50% de los casos) excepto en el CXCR2 donde la intensidad con peroxidasa fue ligeramente superior a la IF.
7. El estudio IHQ estuvo muy limitado por la escasez de tumor en muchos de los tiempos que lo hicieron no valorable (37.5% de los casos).

4.3.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.3.2.3.1. Índice proliferativo.

Como observamos en el epígrafe 4.3.1 el número de mitosis e índice proliferativo decrece en las primeras horas para incrementarse a partir de la primera semana. Este fenómeno ocurre en todos los tumores anteriormente estudiados. La hipoxia a la que se someten las células neoplásicas en las primeras horas disminuye la capacidad proliferativa y regenerativa del tumor.

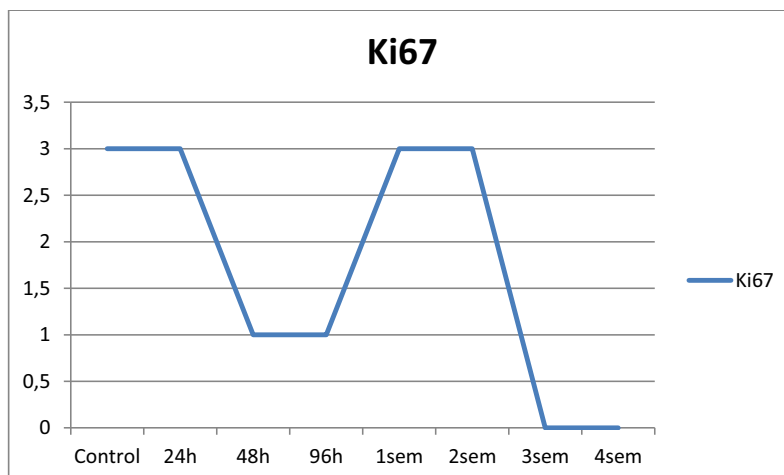


Figura 4.3.17. Gráfica de expresión de Ki67 en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: 4sem.

4.3.2.3.2. Factores angiogénicos.

El HIF1 α muestra dos picos de intensa expresión en las primeras fases del desarrollo, uno en las primeras 48h y otro en la segunda semana tras el xenotrasplante. Ver figura 4.3.18.

Por otro lado el VEGF muestra una alta expresión prácticamente todos los tiempos observándose un ligero bache en la 1sem.

Sus receptores VEGFR2 y VEGFR3 muestran una expresión constitutiva y mantenida en todos los tiempos mientras que VEGFR1 muestra una expresión más irregular. Ver figura 4.3.20.

Finalmente los factores PDGFRA, FGF2 y VE-CAD muestran una expresión mantenida en todos los tiempos, FGF2 y VE-CAD muestran una expresión intensa y PDGFRA más débil y moderada. Ver figura 4.3.21.

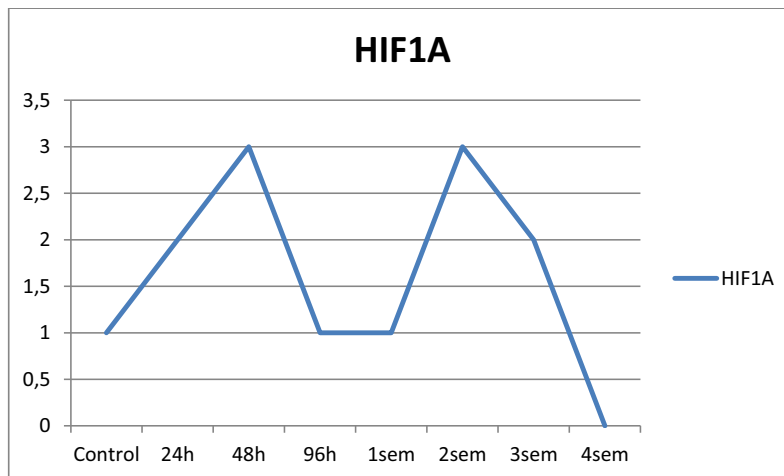


Figura 4.3.18. Gráfica de expresión de HIF1A en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: 4sem.

Seguidamente mostramos una figura con la expresión de VEGF y VEGFR2 en diferentes tiempos tras el xenotrasplante junto con gráficas comparativas de expresión numérica entre VEGF y sus receptores, PDGFRA, FGF2 y VE-CAD.

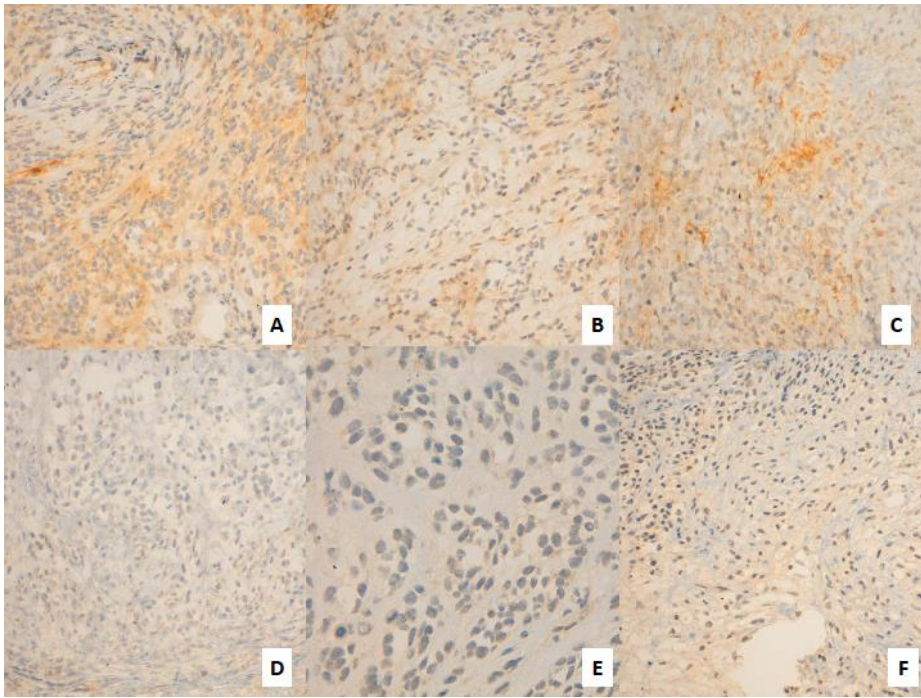


Figura 4.3.19. Expresión citoplasmática de VEGF y VEGFR2 en peroxidasa en los diferentes tiempos del implante tumoral del Ch grado 3. **A**, expresión intensa de VEGF a las 24h (200X). **B y C** expresión de VEGF intensa a las 48h y 96h respectivamente (200X). **D**, expresión nula de VEGF a las 3sem (200X). **E**, expresión débil de VEGFR2 a las 24h (400X). **F**, expresión moderada de VEGFR2 a las 3sem (200X).

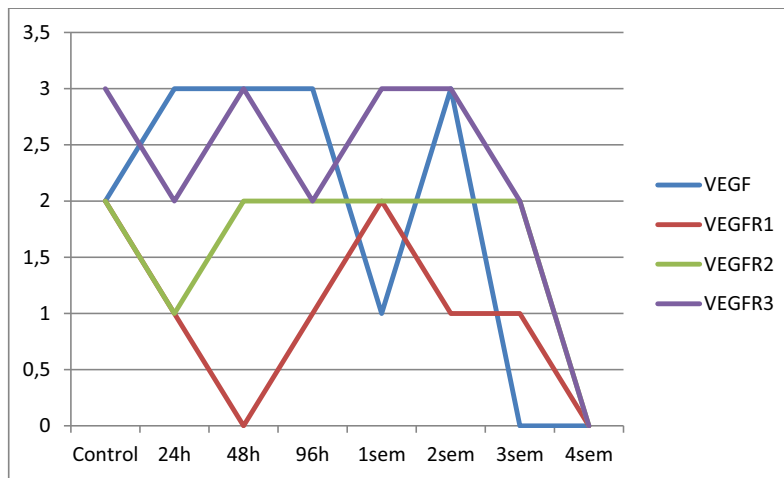


Figura 4.3.20. Gráfica de expresión de VEGF y sus distintos receptores en los diferentes tiempos tras el xenotrasplante. NV: 4sem en todos los marcadores.

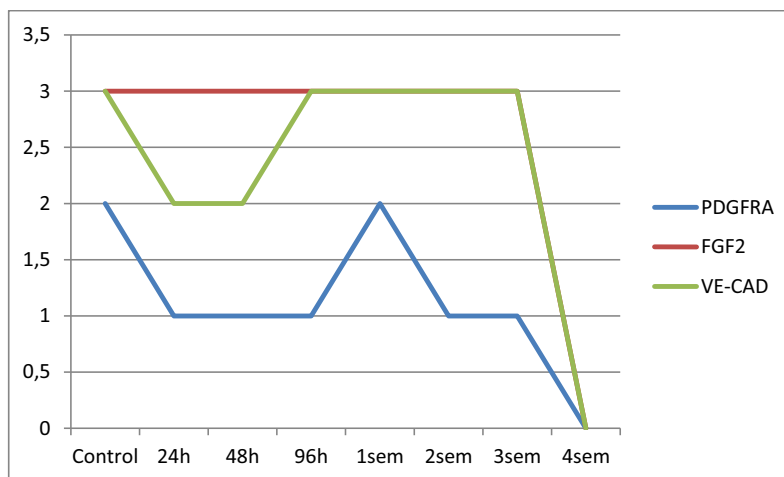


Figura 4.3.21. Gráfica de expresión de los factores PDGFRA, FGF2 y VE-CAD con peroxidasa en los distintos tiempos del xenotrasplante. NV: 4sem en todos los marcadores.

4.3.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.3.3.1. ELISA

Los análisis del enzimoimmunoensayo mostraron que los niveles de VEGF murino en el suero de ratón se eleva a las 96h y a la semana del implante tumoral (fig.4.3.22), estos datos se correlacionan con la expresión que se observa con la tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el tumor humano implantado (fig. 4.3.20) pero de manera ligeramente más tardía en la técnica inmunohistoquímica sobre el tumor humano. No se observó por otro lado, expresión de VEGF humano en el suero del ratón en ningún momento de la experiencia.

Estos resultados sugieren: primero, que el VEGF humano se produce de manera local para estimular las células endoteliales de los capilares alrededor del tumor (que se produce en la primera fase de la experiencia, durante la fase de inducción angiogénica); y segundo, la expresión de VEGF murino se incrementa a las 96h y 1sem de la experiencia probablemente asociado no sólo con el rápido crecimiento del tumor pero también con la movilización de células pluripotenciales angioblásticas de la médula ósea de los ratones que contribuirán a la remodelación angiogénica en el tumor desde la primera semana tras la implantación del xenotrasplante.

Los niveles de VEGF en el suero de ratón se elevan a las 96h y a la semana del implante tumoral (fig.4.3.22). Los resultados son muy similares a los obtenidos en el Ch grado 2 aunque la curva de crecimiento es más pronunciada en este caso que en el caso de Ch grado 2 y esto será posiblemente debido a la mayor agresividad y capacidad proliferativa del Ch grado 3.

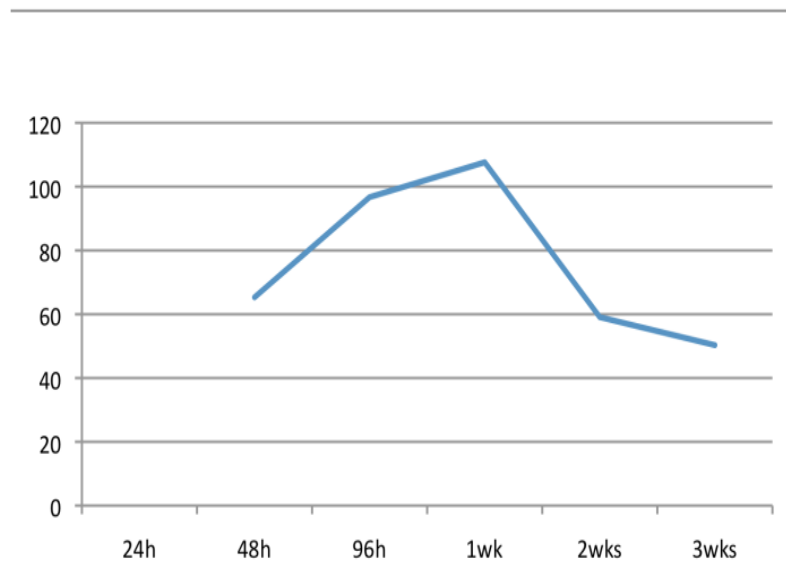


Figura 4.3.22. Perfil de niveles de VEGF murino en sangre de ratón en el Ch grado 3. Unidades eje ordenadas pg/ml.

4.3.3.2. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluidica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación (tumor control).

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite” v3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.3.23 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal. De este conglomerado se obtiene la siguiente información:

- 1- Se observa dos grupos de genes. Un grupo de genes que presentan su pico de expresión a las 24h (fig. 4.3.24) y otro grupo de genes que se sobreexpresan en la primera y segunda semana del xenotrasplante en la fase de remodelación y estabilidad angiogénica(fig.4.3.25).
- 2- El pico de sobreexpresión sanguínea de VEGF murino aparecen de manera más tardía en los estudios por ELISA que con qRT-PCR.
- 3- En el caso del *HIF1A* muestra un pico de expresión a las 24h (fase de inducción) y presenta otro más tardío en la primera y segunda semana (fase de remodelación). Este perfil de expresión se observa en el resto de sarcomas estudiados. Este perfil de expresión además se correlaciona con el estudio IHQ (fig. 4.3.18). Algunos receptores de ligandos pro-angiogénicos muestran un perfil similar como *Flt1*, *PDGFRA* y *FGFR2* (fig.4.3.24).
- 4- Muestra un perfil de expresión muy similar a los sarcomas de alto grado como el ES y el OS y difiere del anterior donde el primer pico de expresión génica no aparece hasta las primeras 48h.
- 5- El factor angiogénico *MDK* se encuentra elevado como en los sarcomas anteriores estudiados, a partir de la primera semana del xenotrasplante.

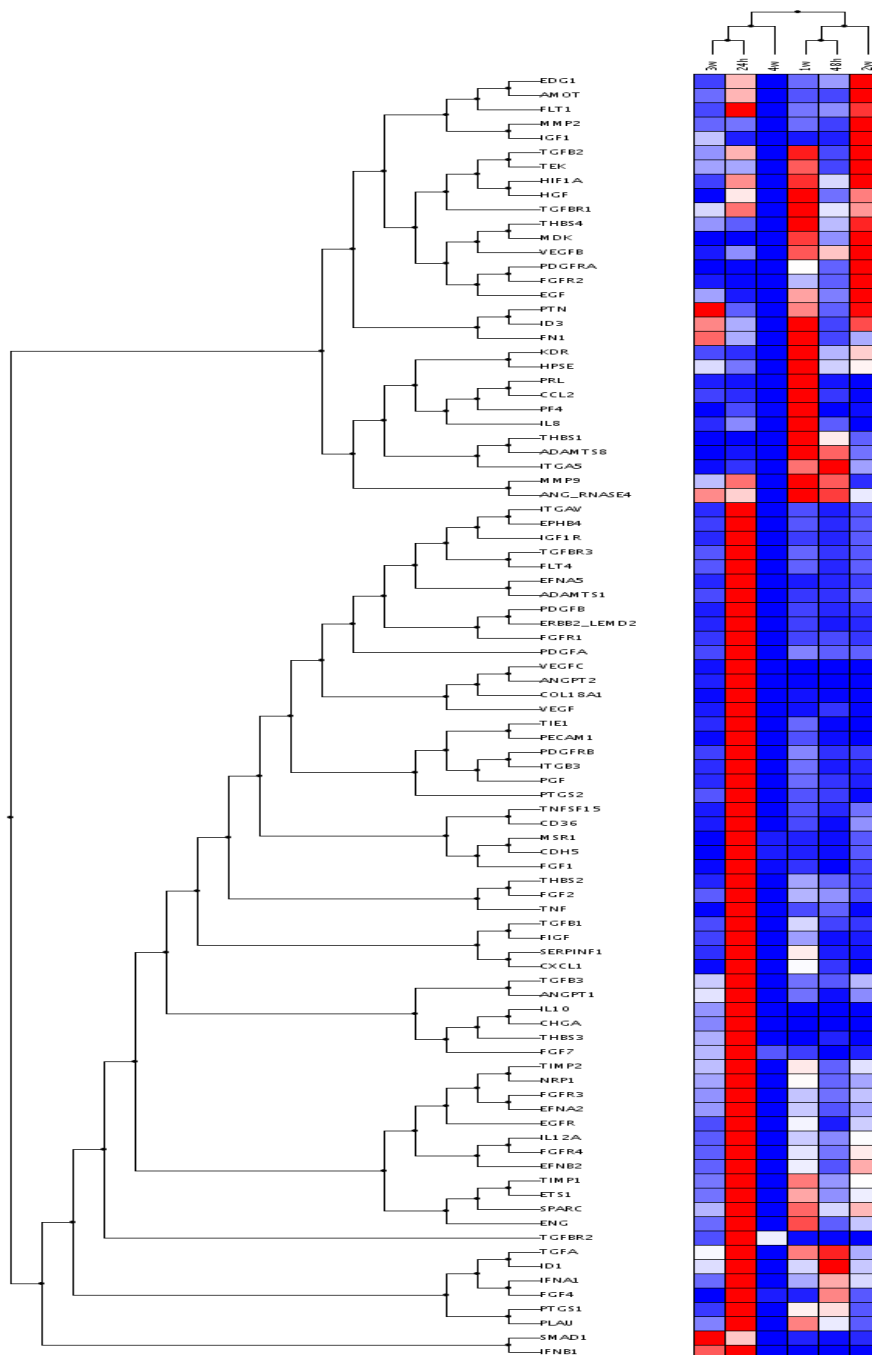
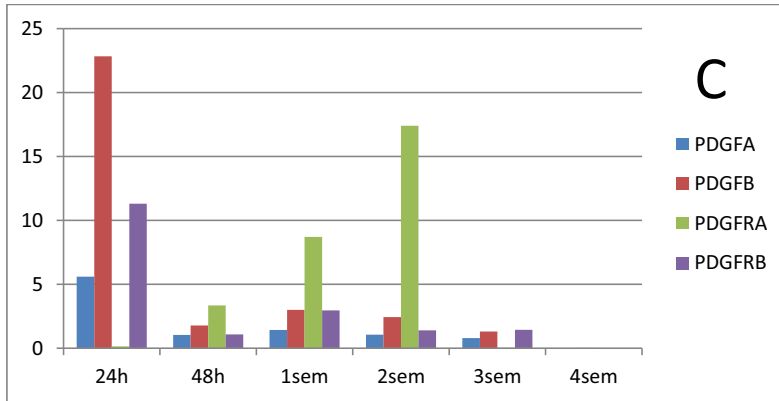
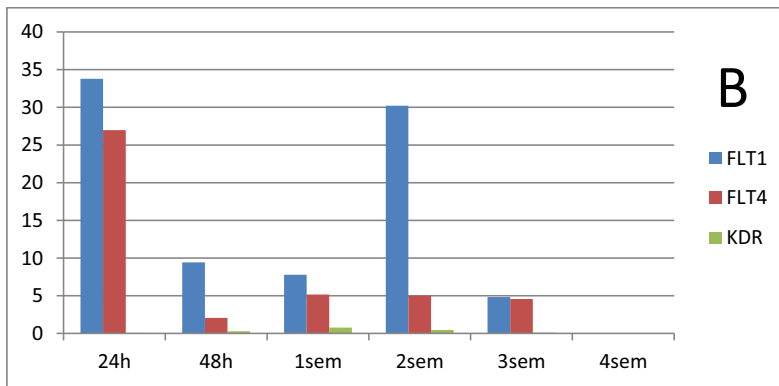
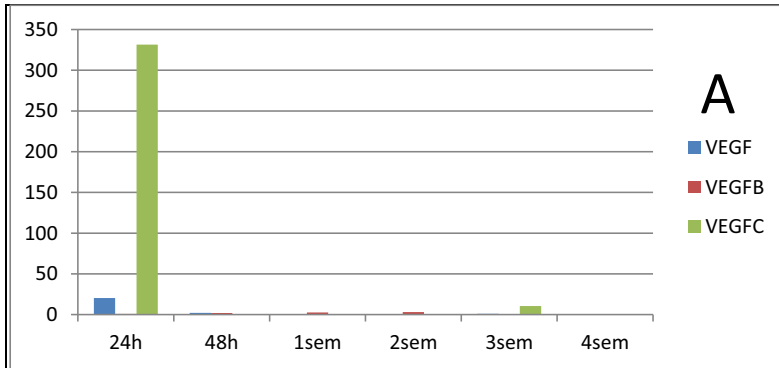


Figura 4.3.23. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis del Ch grado 3. 1, 24h; 2, 48h; 3, 1sem; 4, 2sem; 5, 3sem; 6, 4sem. No se pudo evaluar las 96h por mala calidad del ARN de las muestras obtenidas.



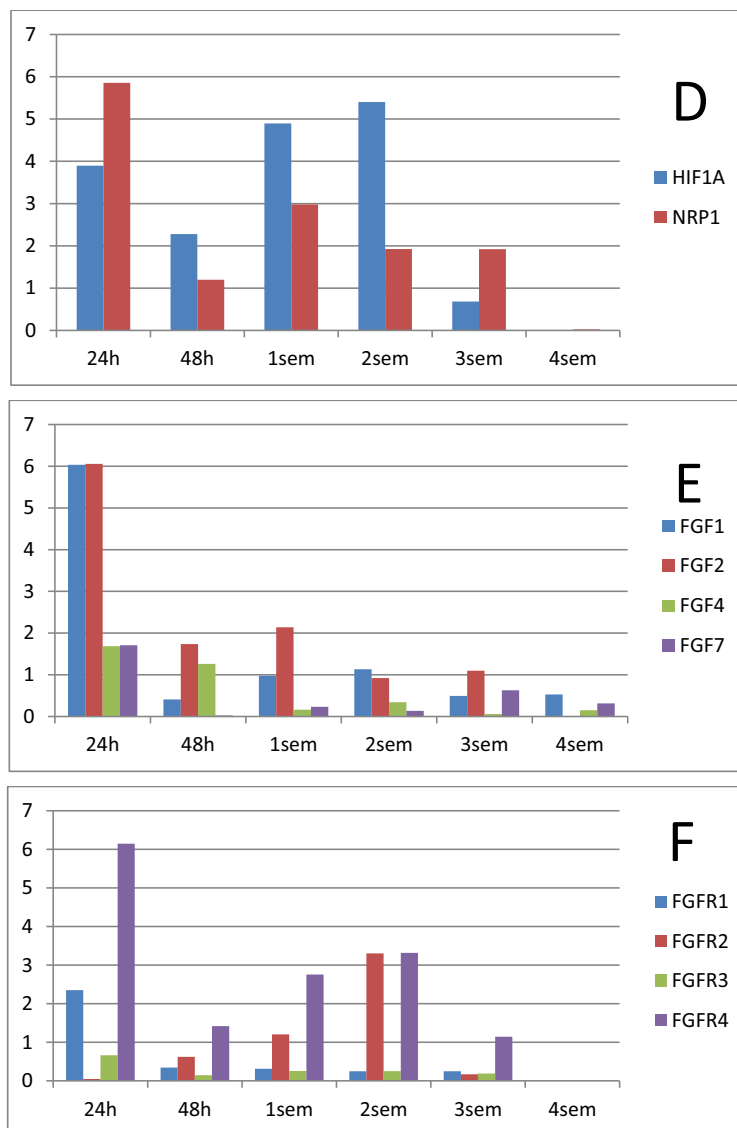


Figura 4.3.24. Histogramas de representación de los genes relacionados con la angiogénesis expresados de manera más evidente en las primeras 24h (fase de inducción angiogénica) con sus receptores en el Ch grado 3. **A.** Perfil de expresión de *VEGF*, con pico a las 24h; **B.** Perfil de los receptores de *VEGF* con pico de expresión a las 24h y a las 2sem; **C.** Perfil de expresión de los importantes factores angiogénicos de la familia *PDGF* y sus receptores; **D.** Expresión de *HIF1A* y *NRP1* en las primeras fases del desarrollo tumoral; **E** y **F.** Perfil de expresión de la familia *FGF* y sus receptores, sobreexpresión en las primeras 24h.

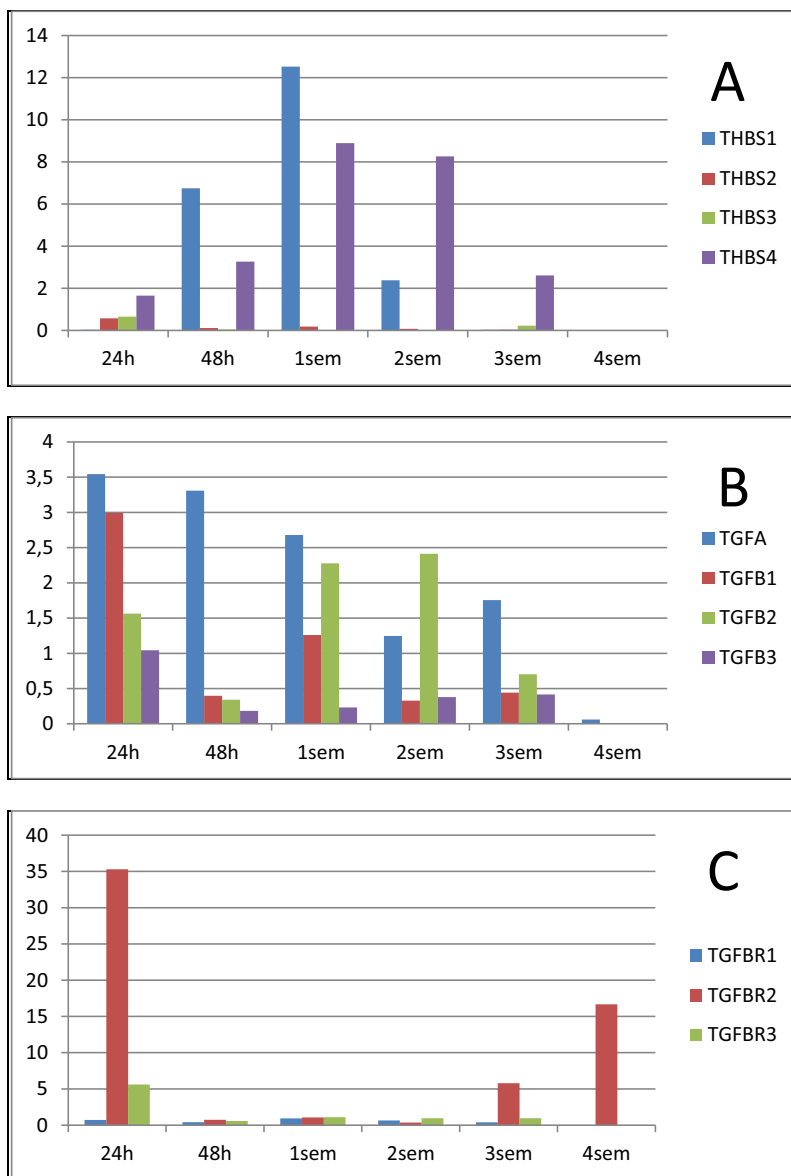


Figura 4.3.25. Histogramas de representación de los genes relacionados con la angiogénesis expresados de forma más mantenida o más evidente a partir de la primera semana (fase de remodelación y estabilidad angiogénica) con sus receptores en el Ch grado 3. **A.** Expresión de la familia antiangiogénica *THBS* de forma más evidente a partir de la 1sem; **B** y **C.** Expresión de la familia *TGF* y sus receptores, que juega un papel relevante en la estabilidad vascular, sobreexpresados a las 24h.

4.4. CONDROSARCOMA GRADO 2

El tumor procede de un varón de 32 años localizado en pala ilíaca derecha. Se implantó un pequeño fragmento tumoral en un ratón nude y el primero de los pases se utilizó en esta experiencia.

El tumor básicamente está constituido por una proliferación de células fusiformes y ovaladas inmersas en abundante matriz condral de aspecto mixoide y/o fibrilar hiperbasófila e inmadura. Focos más maduros con centros isogénicos atípicos. Áreas celulares más sólidas y con escaso estroma. Restos óseos en forma de espículas incluidos en la matriz condroide. No se encuentran mitosis. Diagnóstico: Condrosarcoma central grado 2 con abundante estroma mixoide.

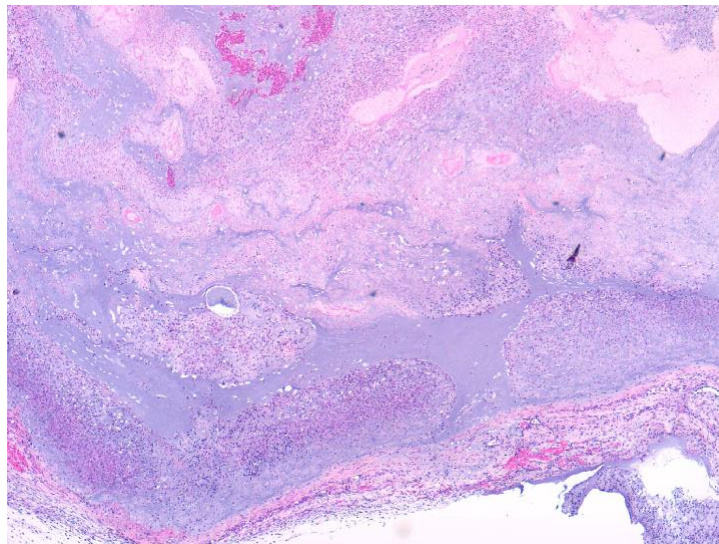


Figura 4.4.1. Muestra del tumor control del Ch grado 2 con H&E (40X).

4.4.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

En el tejido peritumoral del implante se observa de manera constante, en prácticamente todos los tiempos postxenotrasplante, presencia de linfocitos, acompañándose de pequeños capilares sanguíneos con células mesenquimales angioblásticas y no angioblásticas entre las células tumorales y en el estroma peritumoral. Se observa, además una pseudocápsula tumoral y no hay una clara delimitación entre la interfase del tejido tumoral y el estroma del huésped.

El tumor por razones técnicas no fue valorable a las 24h con H&E tras el xenotrasplante.

En las primeras 48-96h se observa una proliferación de células mesenquimales envueltas en escasa matriz condroide de tipo mixoide con presencia de elementos blásticos inmaduros con moderadas atipias y aisladas mitosis. Llama la atención la presencia de un prominente infiltrado inflamatorio polimorfonuclear intra y peritumoral así como abundantes áreas de necrosis pero parcheada y focal. Al mismo tiempo se observan abundantes figuras de cariorrexis celular (fig.4.4.2A). Además se acompaña de zonas microhemorrágicas circundantes. En este tumor no se observa el core de necrobiosis central y el anillo de tumor viable que se observa en otros tumores como en el ES y el OS.

A partir de la primera semana, el crecimiento tumoral persiste con análogas características apreciándose además aumento de la matriz intercelular con aspecto hiperbasófilo mixoide poco denso. El infiltrado inflamatorio empieza a descender y aumenta el número de mitosis en las células tumorales. En este periodo de tiempo aparece focos de necrosis más extensa, es decir que aparece más tardía la necrosis franca si se compara con otros tumores mesenquimales más agresivos como son ES y el OS (fig.4.4.2B y C).

En la cuarta semana desciende la necrosis tumoral llegando a ser prácticamente nula en esta fase de desarrollo tumoral (fig.4.4.2D). El tumor se encuentra totalmente remodelado y estabilizado adquiriendo las características vistas en el tumor original con presencia de mitosis mientras el ratón desarrolla una cápsula con células mesenquimales y una red de vasos capilares que se introducen en el

tumor. La angiogénesis tumoral se asocia a un incremento de la vascularización intratumoral parecida a la existente en el tumor control.

Como en el resto de casos el recuento de mitosis fue de menos a más en los diferentes tiempos como se corrobora con el Ki67 (ver epígrafe 4.4.2.4.1).

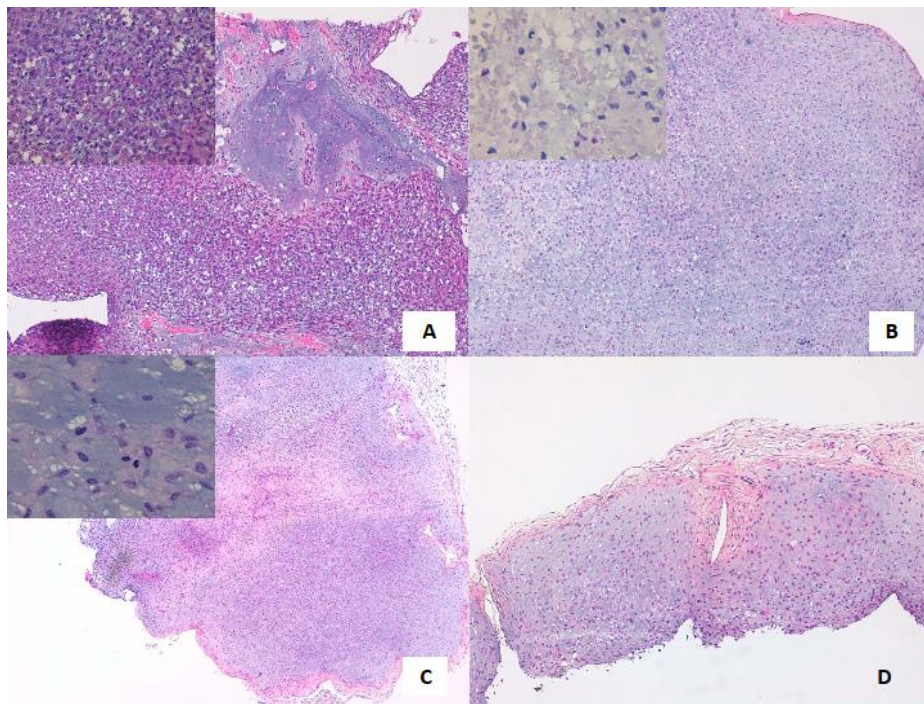


Figura 4.4.2. Imágenes del Ch grado 2 en los diferentes tiempos (H&E). **A**, muestra de Ch grado 2 a las 48h (40X), infiltrado inflamatorio polimorfonuclear con cariorrexis (detalle 200X). **B**, tumor a la 1sem (40X), con abundante necrosis tumoral (detalle 400X). **C**, Ch grado 2 a las 2sem (40X), con abundante necrosis y algunas mitosis (detalle 630X). **D**, Ch grado 2 a las 4sem con escasa necrosis tumoral (40X).

4.4.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

A continuación se describen los resultados de la expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO junto a sus respectivos receptores CXCR3 y CXCR2. En primer lugar se expondrán los resultados con peroxidasa para a continuación destacar los resultados con inmunofluorescencia indirecta.

4.4.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.4.2.1.1.-CXCL9

Muestra una expresión citoplasmática y de membrana intensa en el control, sin embargo en las primeras fases del desarrollo la expresión es leve-moderada sin alcanzar la intensidad del tumor establecido (control). Ver figura 4.4.6. La expresión se observa tanto en las células tumorales como en el estroma tumoral.

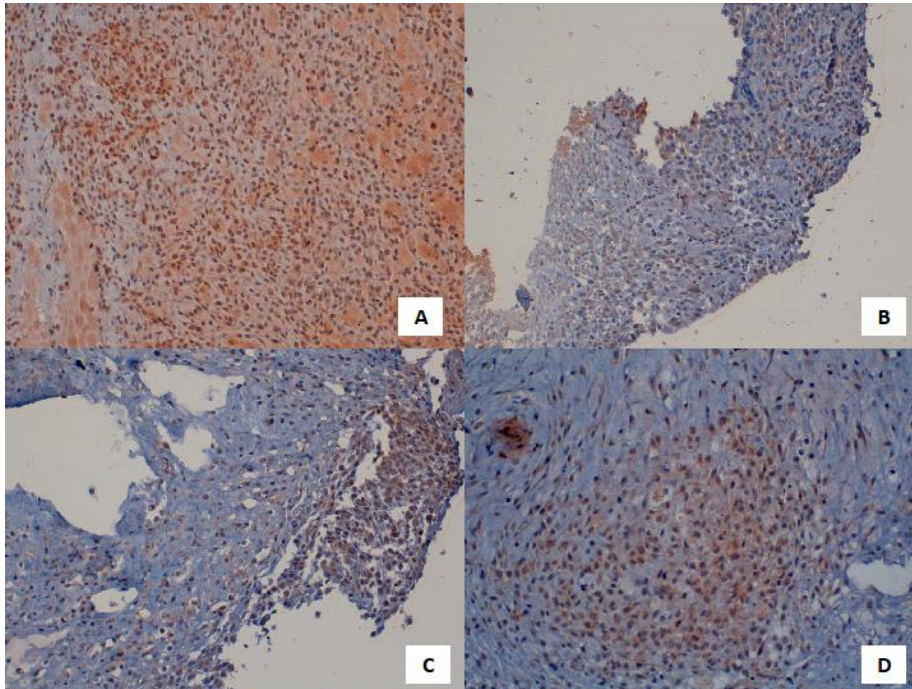


Figura 4.4.3. Expresión de CXCL9 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 2. **A**, expresión intensa de CXCL9 en el tumor control y del estroma tumoral (100X). **B**, expresión leve de CXCL9 a las 48h en el tumor y estroma tumoral (100X). **C**, expresión moderada de CXCL9 a las 96h en el tumor y en el estroma tumoral (100X). **D**, expresión moderada de CXCL9 a la 2sem en el tumor y en el estroma (100X).

4.4.2.1.2.-CXCL10

La expresión citoplasmática de CXCL10 es más intensa en las primeras fases de crecimiento tras el implante, disminuyendo de forma progresiva posteriormente. En el tumor establecido (control) la positividad es moderada (fig.4.4.4A).

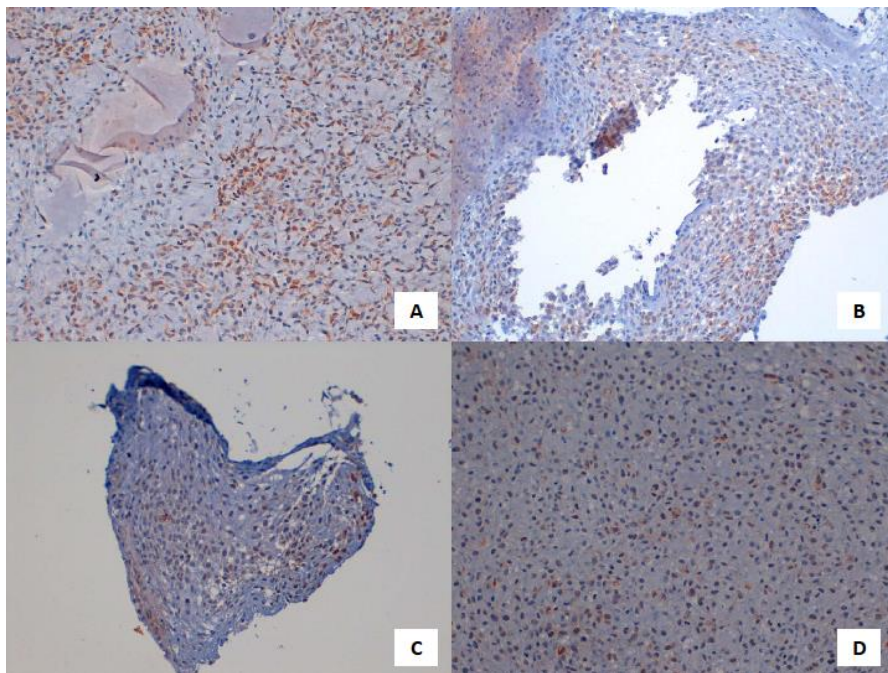


Figura 4.4.4. Expresión de CXCL10 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 2. **A**, expresión moderada de CXCL10 en las células tumorales en el tumor control (100X). **B**, expresión moderada de CXCL10 en el tumor a las 48h (100X). **C**, expresión leve de CXCL10 a las 96h (100X). **D**, expresión leve de CXCL10 en la 1sem (100X).

4.4.2.1.3.-CXCR3

Expresión citoplasmática del receptor débil en las primeras fases de crecimiento tumoral aumentando ligeramente de intensidad a partir de la primera semana tras el xenotrasplante. Ver figura 4.4.6.

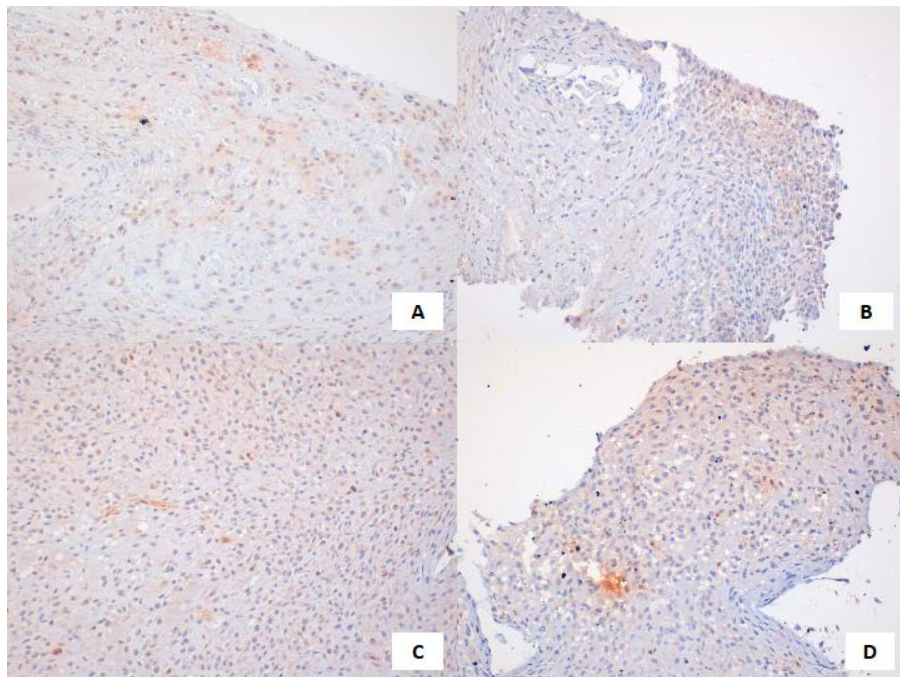


Figura 4.4.5. Expresión de CXCR3 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 2. **A**, expresión moderada de CXCR3 en células tumorales y estroma tumoral en el tumor control (100X). **B**, expresión leve de CXCR3 en el tumor y estroma a las 48h (100X). **C**, expresión moderada de CXCR3 en células tumorales y estroma tumoral en la 1sem (100X). **D**, expresión moderada de CXCR3 en células tumorales y estroma tumoral en la 4sem (100X).

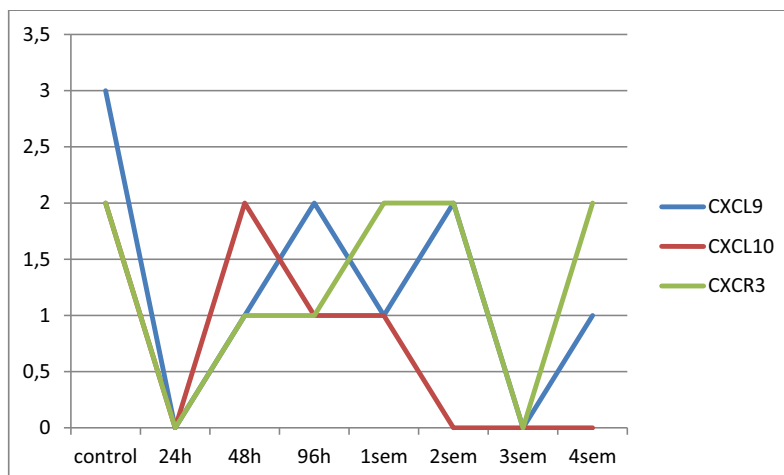


Figura 4.4.6. Gráfica de los niveles de expresión observados de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 según tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el Ch grado 2. NV: a las 24h ni 3sem en los tres marcadores inmunohistoquímicos.

4.4.2.1.4.-GRO

Esta citoquina sólo muestra cierta positividad en las 48 horas tras el implante siendo prácticamente ausente la expresión en el resto de tiempos (fig.4.3.8).

4.4.2.1.5.-CXCR2

Expresión intensa citoplasmática y de membrana del receptor en las células tumorales en prácticamente todos los tiempos incluido en el tumor establecido. Ver figura 4.4.7 y 4.4.8.

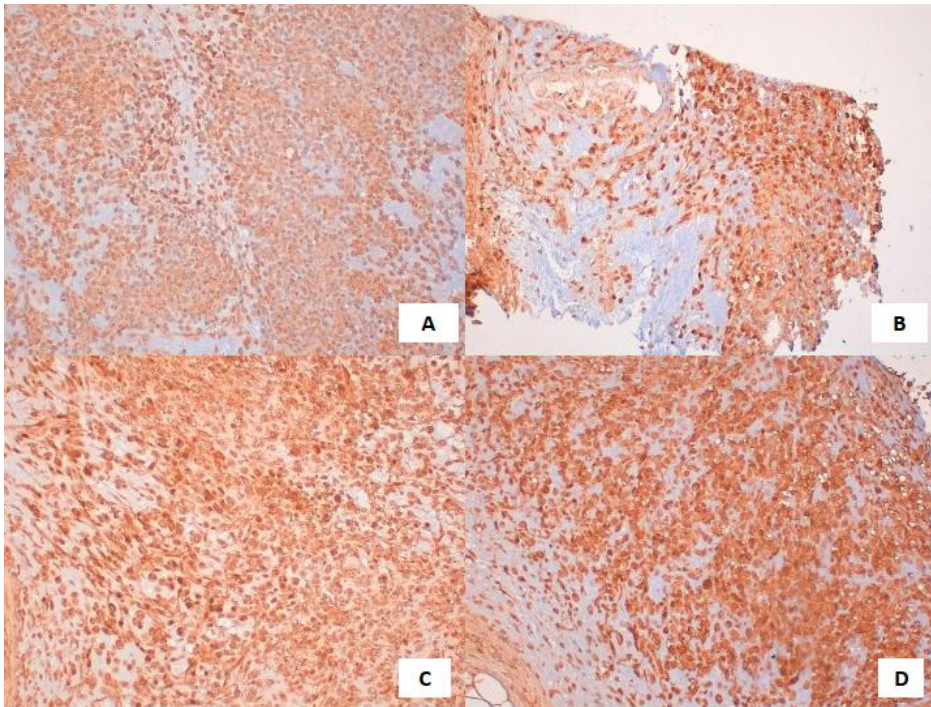


Figura 4.4.7. Expresión de CXCR2 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en el Ch grado 2. **A.** expresión intensa de CXCR2 en el tumor control (100X). **B.** expresión intensa de CXCR2 en el tumor y en el estroma tumoral a las 48h (40X). **C.** expresión intensa de CXCR2 en el tumor y estroma tumoral a las 2sem (200X). **D.** expresión intensa de CXCR2 en el tumor y estroma peritumoral en la 4sem (200X).

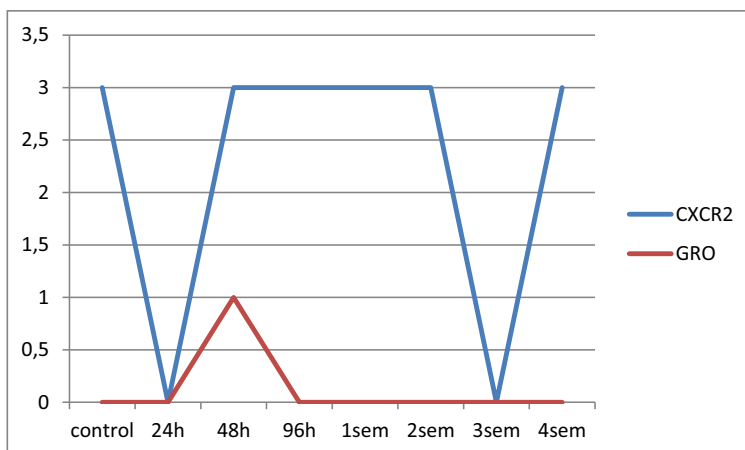


Figura 4.4.8. Gráfica de expresión de GRO y CXCR2 en los diferentes tiempos del Ch grado 2 con peroxidasa. NV: a las 24h ni 3sem tanto para GRO como para CXCR2.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el Ch grado 2 con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

1. La expresión de ligandos es más fluctuante que la de sus receptores que se mantiene más constante en los diferentes tiempos.
2. CXCL9 presenta dos picos de intensa expresión a las 96h y en la segunda semana tras el xenoinjerto.
3. CXCL10 y GRO presentan un aumento de la expresión a las 48h, mientras que en el resto de la experiencia es muy leve o ausente.
4. La intensidad de la expresión de CXCL9, CXCL10 y su receptor es muy similar sin embargo CXCR2 predomina en la intensidad sobre GRO claramente.
5. Los ligandos y los receptores se observan tanto en las células tumorales condrales como en el estroma extracelular mixoide tumoral.

4.4.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.4.2.2.1.-CXCL9-VIMENTINA

La expresión de CXCL9 es heterogénea, citoplasmática y nuclear en las células neoplásicas y ligeramente en el estroma tumoral. Ver figura 4.4.9A. Por otro lado la expresión de vimentina es intensa, homogénea y citoplasmática en todas las células tumorales.

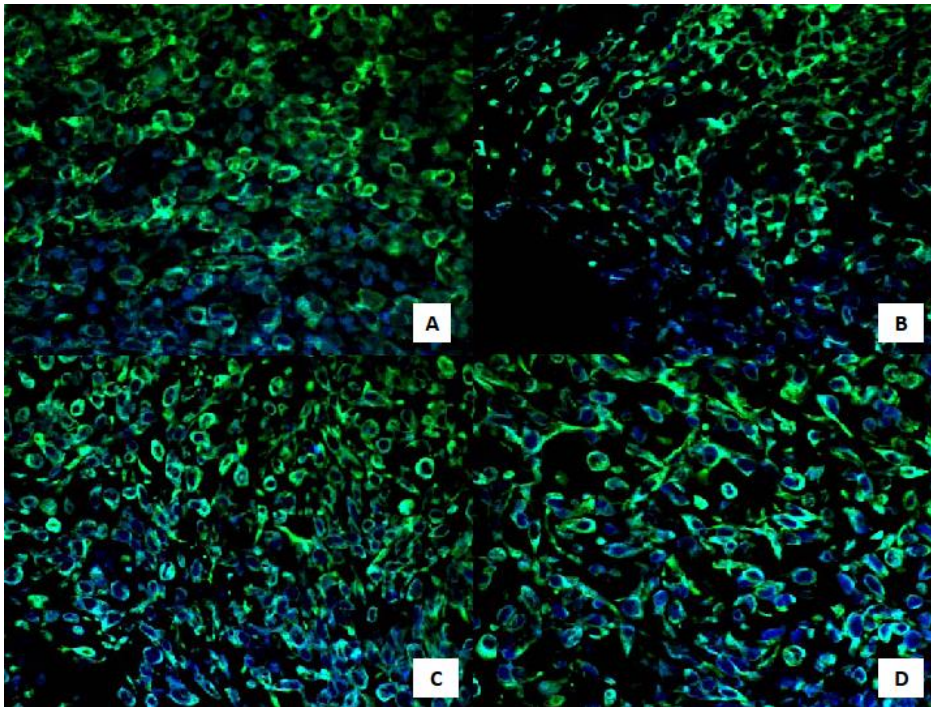


Figura 4.4.9. Expresión de CXCL9 (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión moderada y heterogénea de CXCL9 a las 48h en las células tumorales (400X). **B**, expresión moderada y heterogénea de CXCL9 a las 96h en las células tumorales (400X). **C**, expresión moderada-intensa y heterogénea de CXCL9 en la 1sem en las células tumorales (400X). **D**, expresión intensa de CXCL9 en la 4sem en las células tumorales (400X).

4.4.2.2.2.-CXCL10-VIMENTINA

La expresión de CXCL10 citoplasmática y nuclear, es moderada en las primeras horas del trasplante. Ver figura 4.4.10. Por otro lado la expresión de vimentina es intensa, homogénea y citoplasmática en todas las células tumorales.

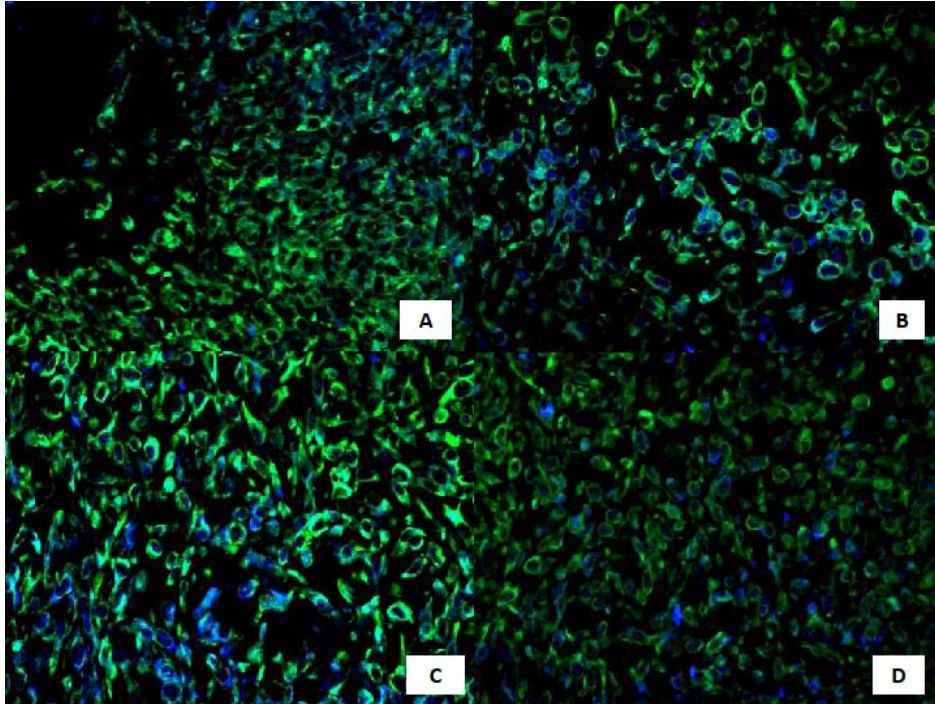


Figura 4.4.10. Expresión de CXCL10 (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión moderada y heterogénea de CXCL10 a las 48h por las células tumorales (400X). **B**, expresión intensa y nuclear de CXCL10 en la 1sem (400X). **C**, expresión intensa y nuclear de CXCL10 en la 2sem (400X). **D**, expresión intensa y heterogénea de CXCL10 en el tumor control (400X).

4.4.2.2.3.-GRO-VIMENTINA

La expresión de GRO es citoplasmática e intensa en todos los tiempos. Ver figura 4.4.11. Por otro lado la expresión de vimentina es intensa, homogénea y citoplasmática en todas las células tumorales.

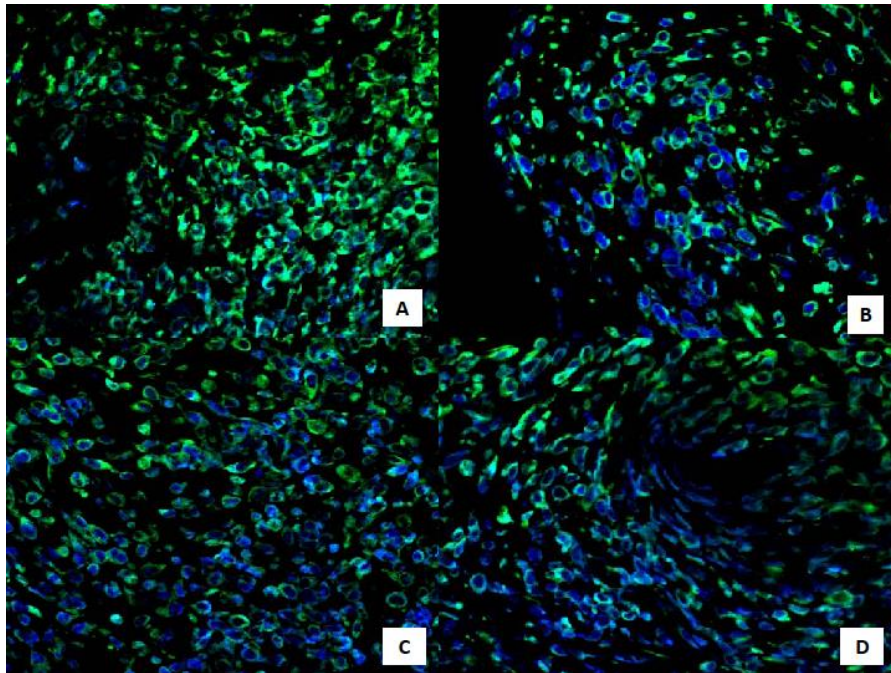


Figura 4.4.11. Expresión de GRO (azul) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión intensa y heterogénea de GRO a las 48h (400X). **B**, expresión intensa de GRO por las células neoplásicas a las 96h (400X). **C**, expresión intensa de GRO por las células neoplásicas en la 1sem (400X). **D**, expresión intensa de GRO en las 2sem en las células tumorales y el estroma tumoral (400X).

En resumen podemos decir que las células neoplásicas positivas para la vimentina expresan tanto a nivel citoplasmático como nuclear las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO. En algunos casos CXCL9 y CXCL10 parece expresarse a nivel extracelular también (fig.4.4.9A y 4.4.10A).

4.4.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

La expresión de CXCL9 combinado con su receptor CXCR3 presenta una intensidad menor en general comparada con la combinación con vimentina. La expresión es intensa en las primeras horas disminuyendo su expresión entre las 96h y la cuarta semana, donde vuelve a ser intensa. Por otro lado la expresión

citoplasmática del receptor se mantiene constante, homogénea e intensa en todos los tiempos. Ver figura 4.4.12. NV: a las 24h y en la tercera semana postrasplante.

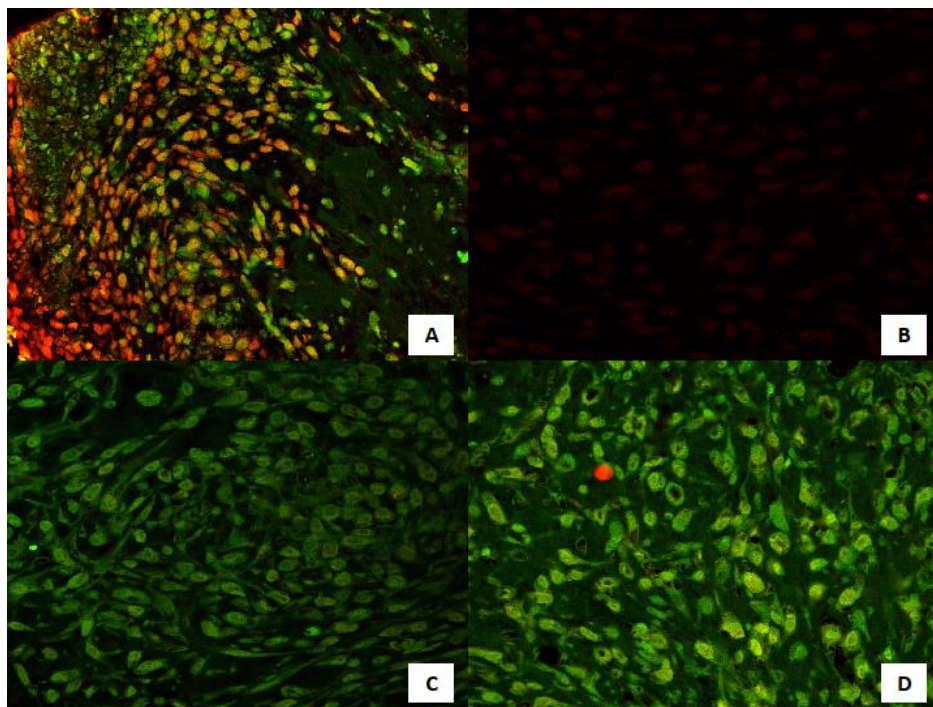


Figura 4.4.12. Expresión de CXCL9 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión intensa y heterogénea de CXCL9 e intensa y más homogénea de CXCR3 a las 48h, positividad de las células tumorales y del estroma tumoral (400X). **B**, expresión leve y homogénea de CXCL9 con tinción nuclear (400X). **C**, expresión tenue de CXCL9 e intensa de CXCR3 en las 2sem (400X). **D**, expresión moderada de ligando e intensa de receptor a las 4sem en las células tumorales y el estroma (400X).

4.4.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

La expresión citoplasmática y principalmente nuclear de CXCL10 tiene unas características granulares en las células neoplásicas. La expresión de ligando es intensa en las primeras horas disminuyendo a partir de la primera semana y aumentando nuevamente en la cuarta semana tras el implante. La expresión de CXCL10 se observa también en el estroma tumoral a las 96h (fig.4.4.13A). El receptor mostró una positividad intensa, citoplasmática y homogénea en todos

sus tiempos. Ver figura 4.4.13. NV: a las 24h y en la tercera semana postrasplante.

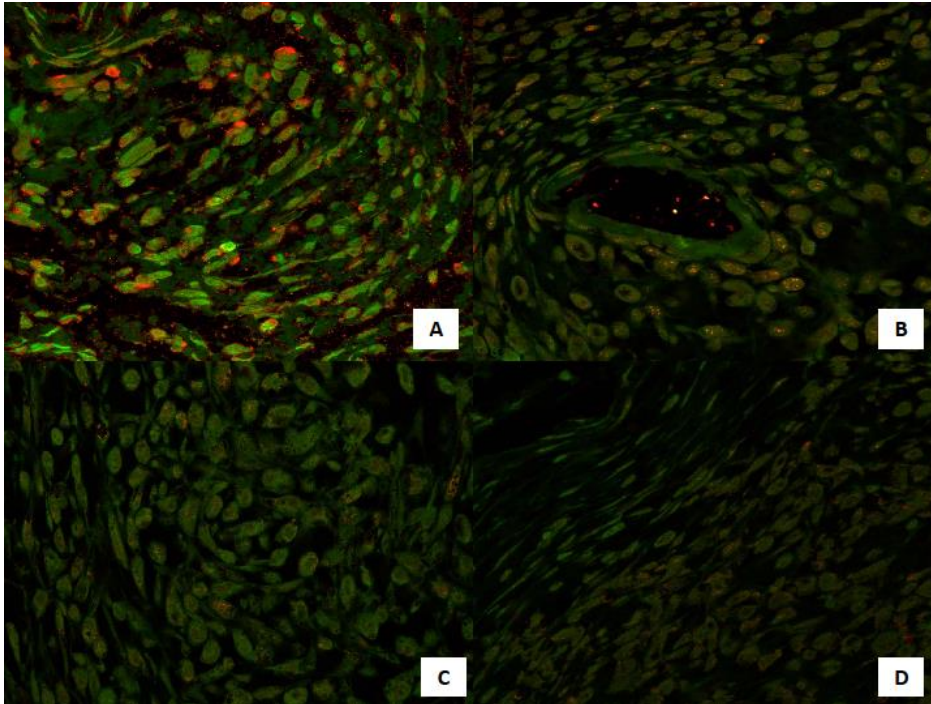


Figura 4.4.13. Expresión de CXCL10 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión intensa y estromal de ligando y receptor a las 96h. La expresión de CXCL10 es granular y nuclear (400X). **B**, expresión moderada y nuclear de CXCL10 e intensa de receptor en la 1sem (400X). **C**, expresión de ligando moderada e intensa de receptor en las 2sem (400X). **D**, expresión débil y nuclear de CXCL10 en las 4sem (400X).

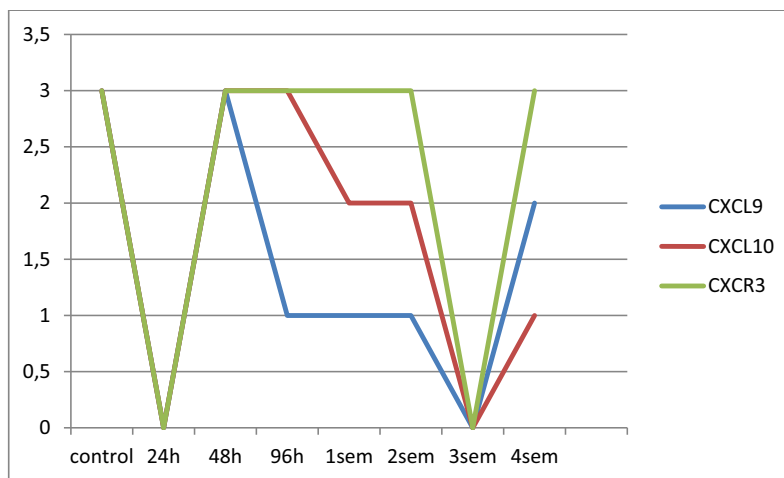


Figura 4.4.14. Gráfica de expresión de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos del Ch grado 2 con IF indirecta. NV: a las 24h y en la tercera semana en todos los marcadores inmunohistoquímicos.

4.4.2.2.6.-GRO-CXCR2

La expresión citoplasmática de GRO en las células tumorales se incrementa desde el inicio alcanzando a la primera semana su máxima expresión. Por otro lado el receptor como veíamos en la peroxidasa presenta una fuerte intensidad citoplasmática en todos los tiempos del xenotrasplante. Ver figura 4.4.15 y 4.4.16. NV: a las 24h y en la tercera semana postrasplante.

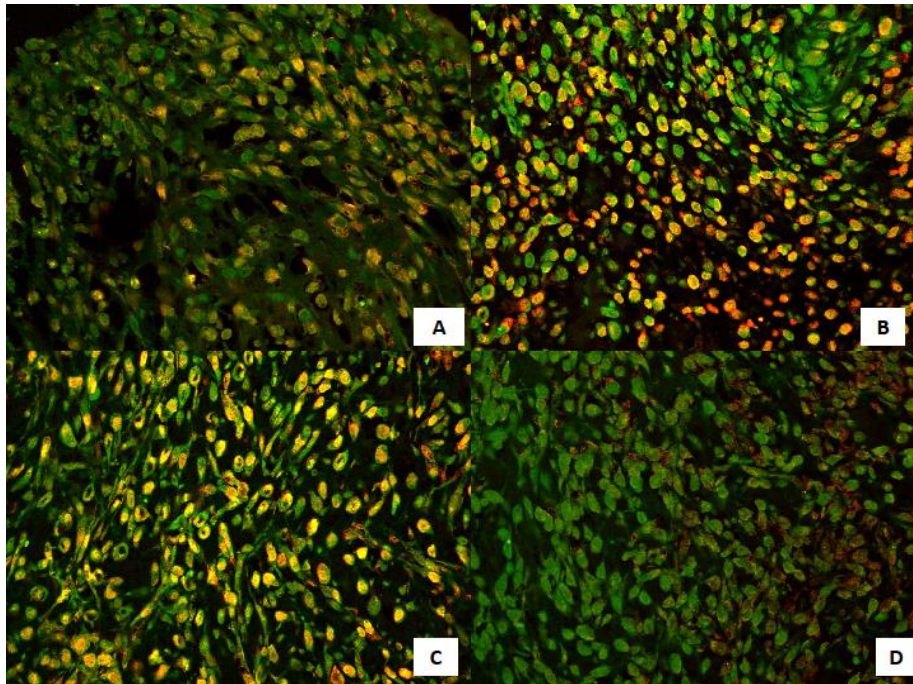


Figura 4.4.15. Expresión de GRO (rojo) y el receptor CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el Ch grado 2. **A**, expresión moderada y heterogénea de ligando e intensa de receptor a las 96h (400X). **B**, expresión intensa de ligando y receptor en la 1sem (400X). **C**, expresión intensa de ligando y receptor en la 2sem (400X). **D**, expresión moderada y heterogénea de ligando e intensa de receptor en la 4sem (400X).

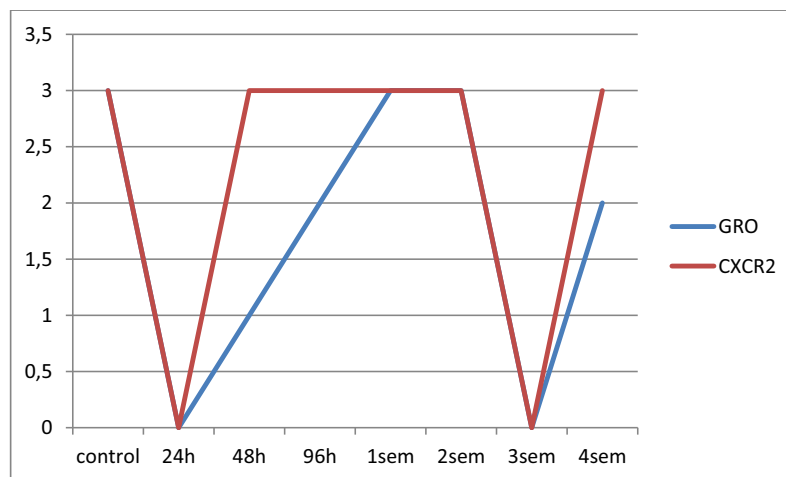


Figura 4.4.16. Gráfica de expresión de la quimiocina GRO y su receptor CXCR2 en los diferentes tiempos del Ch grado 2 con IF indirecta. NV: a las 24h y en la tercera semana en los dos marcadores inmunohistoquímicos.

La tinción con IF es más intensa en el 60% de los casos. La concordancia entre la peroxidasa y la IF en intensidad es del 30%. CXCR2 es el marcador que presenta mejor correlación entre peroxidasa e IF indirecta. En CXCL9 sólo se observó en dos casos que la peroxidasa fuese más intensa que la IF.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el Ch grado 2 con el estudio inmunohistoquímico :

1. La expresión de los receptores se mantiene intensa y constante en todos los tiempos, mientras que los ligandos presentan una expresión más fluctuante.
2. GRO muestra un pico de expresión en la primera semana y a partir de la segunda comienza a descender.
3. CXCL9 y CXCL10 presentan un pico de expresión intensa en las primeras 96h para descender posteriormente de manera lenta, negativizándose por completo en el caso de CXCL10.
4. La tinción con IF es más intensa en el 60% de los casos. La concordancia entre la peroxidasa y la IF en intensidad es del 30%. CXCR2 es el marcador que presenta mejor correlación entre peroxidasa e IF indirecta. En CXCL9 sólo se observó en dos casos que la peroxidasa fuese más intensa que la IF.
5. El CXCR3 es mucho más débil con peroxidasa que con IF, no ocurre lo mismo con CXCR2 que presenta una alta intensidad tanto en peroxidasa como en IF.
6. El perfil de expresión de las quimiocinas y receptores se correlaciona bien entre los dos tipos de inmunohistoquímica aunque no tanto la intensidad de expresión.

4.4.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.4.2.3.1. Índice proliferativo.

El índice proliferativo estudiado con la expresión de Ki67 en las células neoplásicas muestra una menor positividad del número de células en las primeras horas del desarrollo tumoral, aumentando su número a partir de la primera semana del injerto tumoral (fig.4.4.17). Este dato se correlaciona con lo que observamos en el estudio morfológico, epígrafe 4.4.1.

Mostramos a continuación una figura gráfica de la expresión del Ki67.

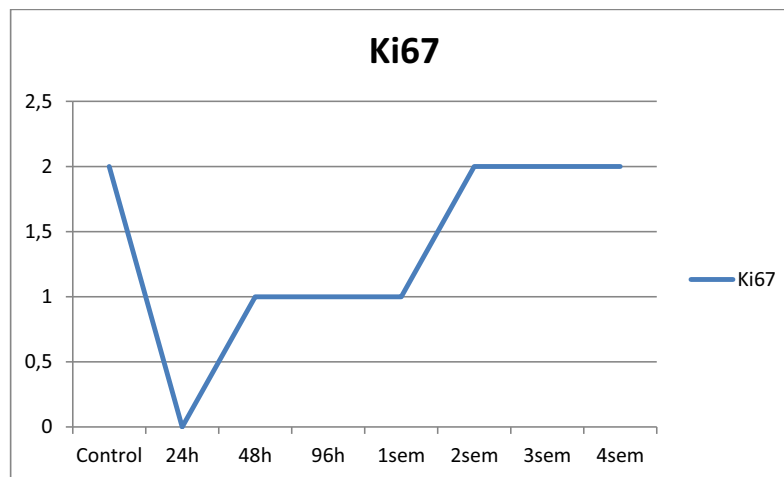


Figura 4.4.17. Gráfica de expresión de Ki67 en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: a las 24h.

4.4.2.3.2. Factores angiogénicos.

El HIF1A presenta una positividad intensa en las primeras 48h y luego va disminuyendo a partir de la segunda semana postrasplante. HIF1A se muestra como el inductor de la expresión de VEGF y muestra de manera interesante una correlación invertida respecto al Ki67 que vimos anteriormente (epígrafe 4.4.2.3.1).

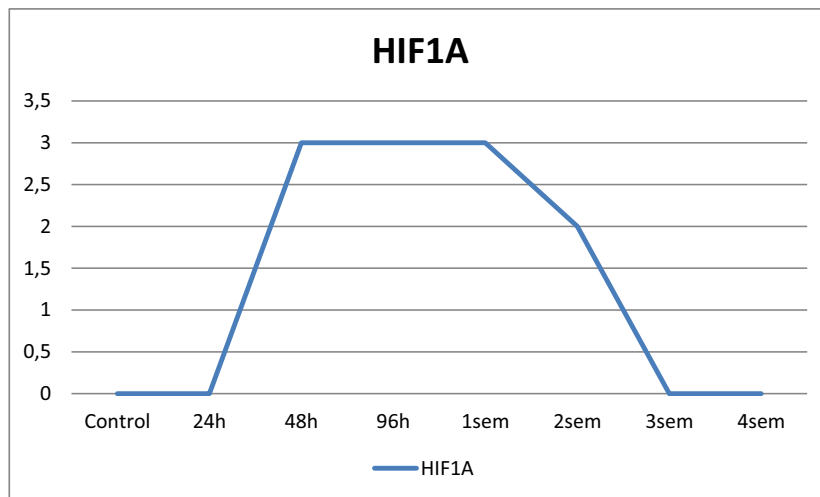


Figura 4.4.18. Gráfica de expresión de HIF1A en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: 24h.

La expresión de VEGF en el tumor humano aumenta significativamente en las primeras 96h para disminuir posteriormente y su receptor VEGFR1 comparte el mismo perfil de expresión inmunohistoquímica (fig.4.4.20). Por otro lado, VEGFR2, VEGFR3, PDGFRA y FGF2 presentan una expresión constitutiva en todos los tiempos. Por otra parte, la expresión de VE-CAD fue negativa en todos los tiempos. Ver figura 4.4.20 y 4.4.21.

Seguidamente mostramos el resultado inmunohistoquímico de la expresión de VEGF y VEGFR1 en diferentes tiempos tras el xenotrasplante junto con gráficas comparativas de expresión numérica entre VEGF y sus receptores, PDGFRA, FGF2 y VE-CAD.

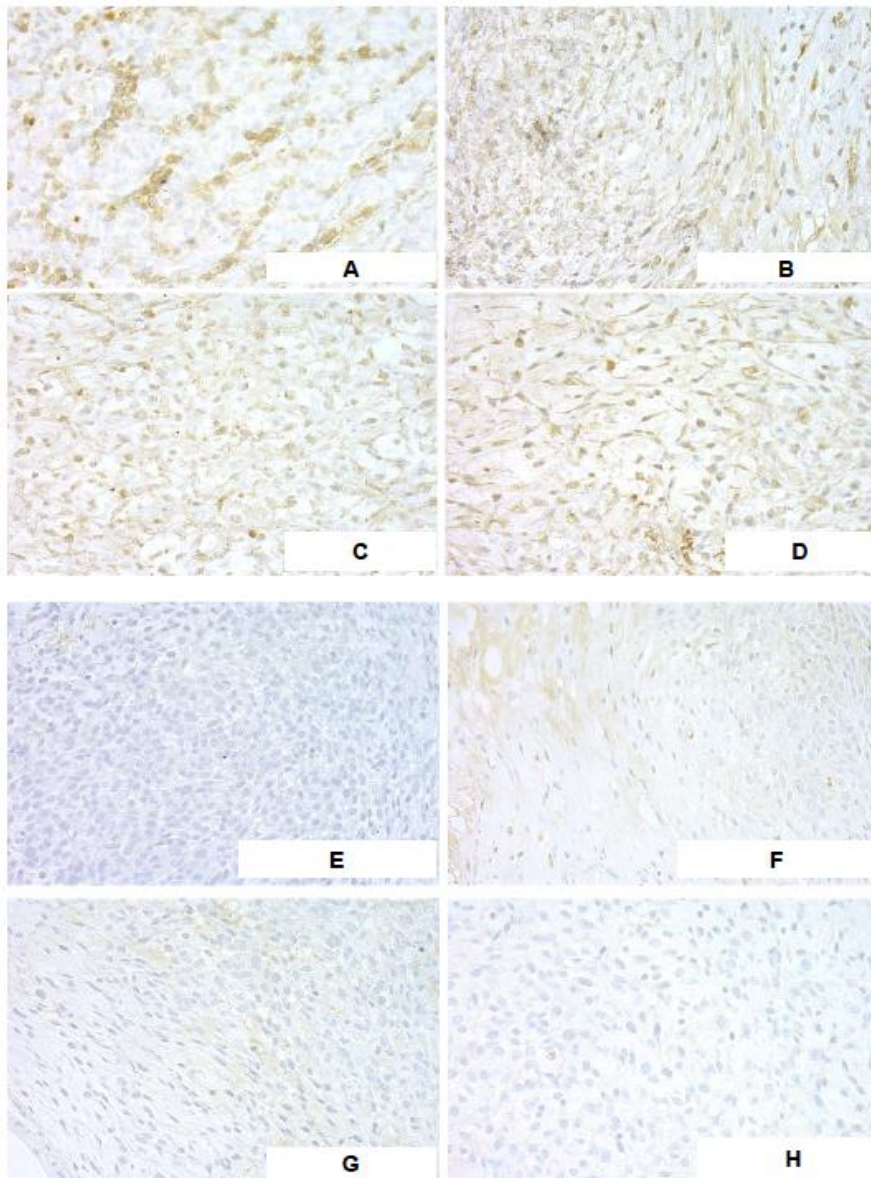


Figura 4.4.19. Expresión con peroxidasa de VEGF y el receptor VEGFR1 en los diferentes tiempos del xenotrasplante en Ch grado 2. **A**, expresión de VEGF leve del tumor a las 48h (400X).

B, expresión de VEGF moderada a las 96h en el tumor y en el estroma del ratón (400X). **C**, expresión moderada de VEGF en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada de VEGF en la 2sem (400X). **E**, expresión ausente de VEGFR1 en el tumor a las 48h (200X). **F**, expresión moderada de VEGFR1 en el tumor y estroma a las 96h (200X). **G**, expresión leve de VEGFR1 en el tumor y el estroma en la 1sem (200X). **H**, expresión ausente de VEGFR1 en el tumor en la 2sem (400X).

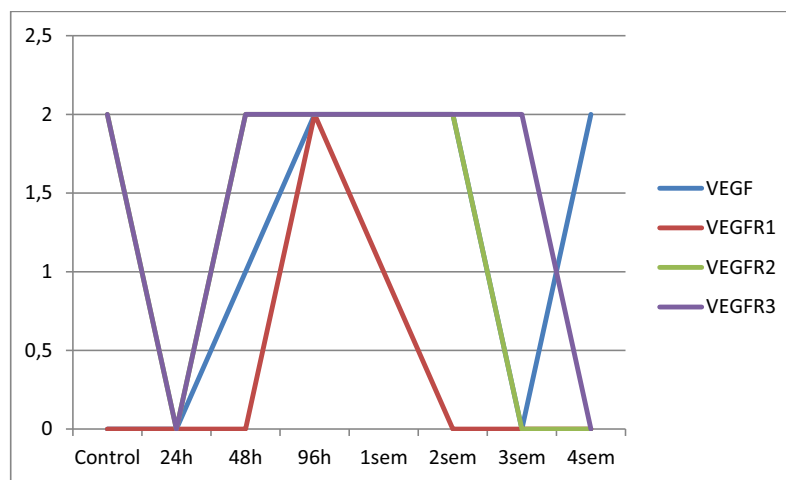


Figura 4.4.20. Gráfica de expresión numérica de los diferentes factores de crecimiento vascular y sus receptores en los diferentes tiempos del Ch grado 2 en peroxidasa. NV: 24h en todos los marcadores y 3sem en VEGF y VEGFR2 .

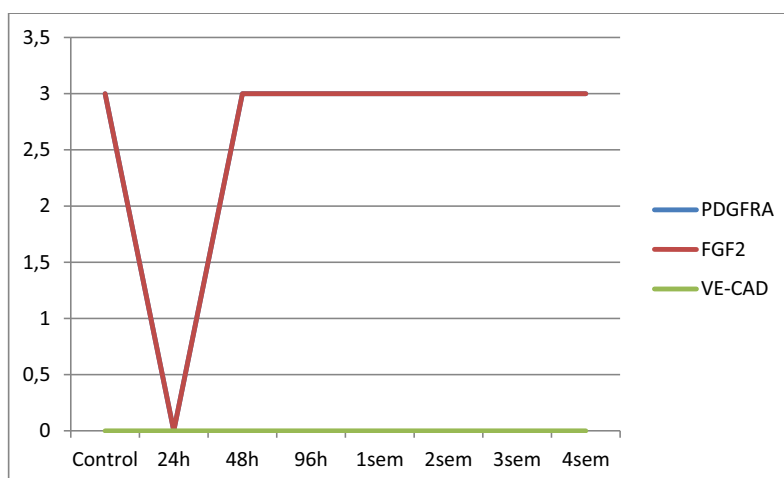


Figura 4.4.21. Gráfica de expresión numérica de los diferentes factores de crecimiento vascular en los diferentes tiempos del Ch grado 2 en peroxidasa. NV: 24h en los tres marcadores.

4.4.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.4.3.1. ELISA

Los análisis del ensayo de inmunoenzima mostraron que los niveles de VEGF murino en el suero de ratón se eleva a las 96h y a la semana del implante tumoral (fig.4.4.22), estos datos se correlacionan con la expresión que se observa con la tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el tumor humano implantado (fig. 4.4.20). No se observó por otro lado, expresión de VEGF humano en el suero del ratón en ningún momento de la experiencia.

Estos resultados sugieren: primero, que el VEGF humano se produce de manera local para estimular las células endoteliales de los capilares alrededor del tumor (que se produce en la primera fase de la experiencia, durante la fase de inducción angiogénica); y segundo, la expresión de VEGF murino se incrementa a las 96h y 1sem de la experiencia probablemente asociado no sólo con el rápido crecimiento del tumor pero también con la movilización de células pluripotenciales angioblásticas de la médula ósea de los ratones que contribuirán a la

remodelación angiogénica en el tumor desde la primera semana tras la implantación del xenotrasplante.

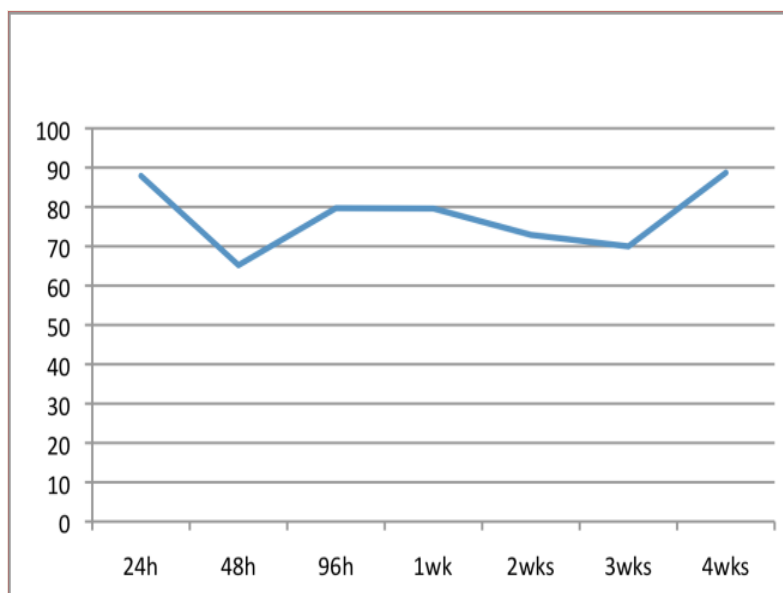


Figura 4.4.22. Perfil de los niveles de VEGF murino en suero de ratón en el Ch grado 2. Unidades eje ordenadas pg/ml.

4.4.3.2. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluidica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación (tumor control).

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite v3.1” (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.4.23 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal. De este conglomerado se obtiene la siguiente información:

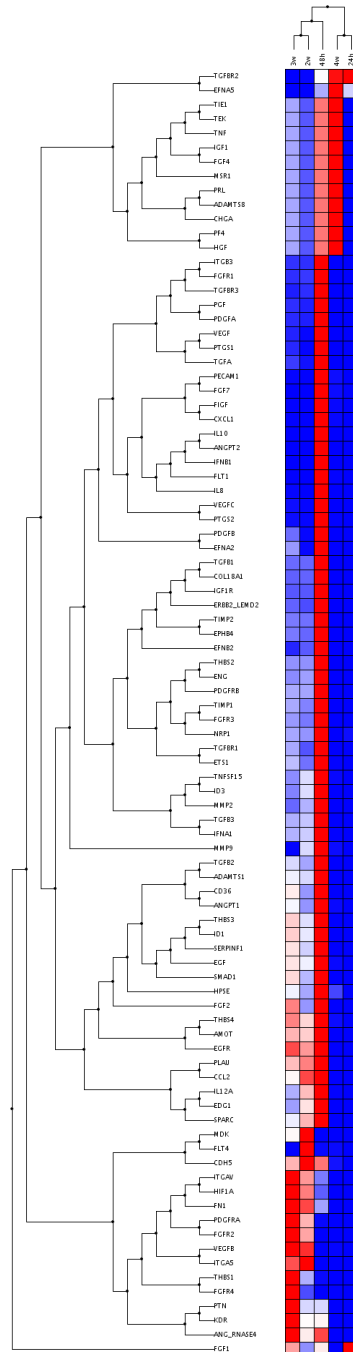
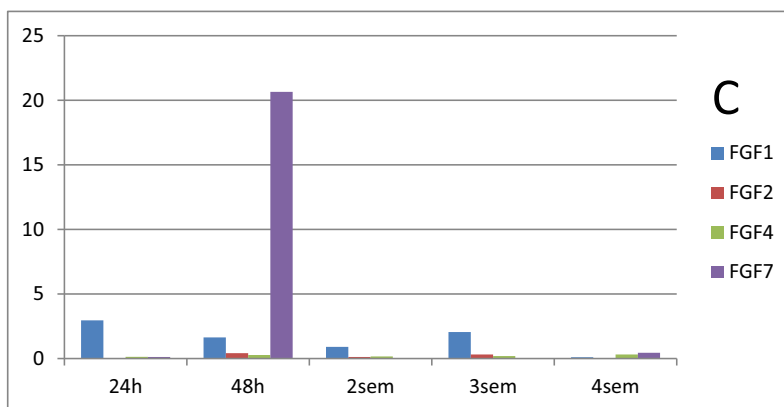
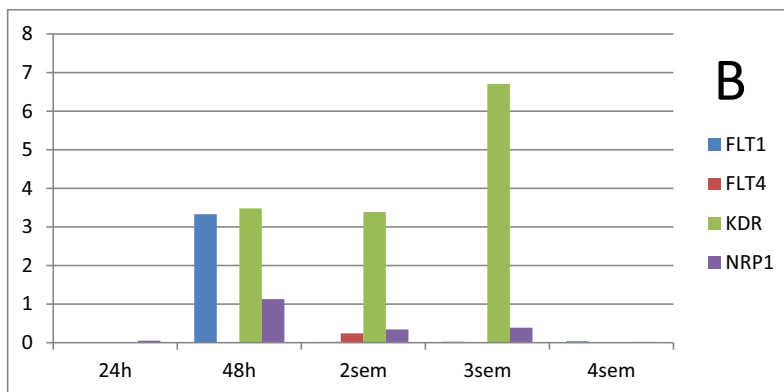
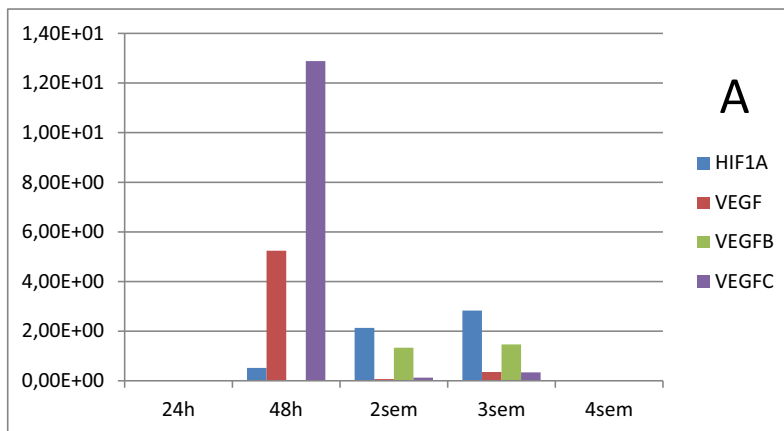


Figura 4.4.23. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis del Ch grado 2. No se pudieron evaluar las muestras correspondientes a las 96h ni la 1sem por mala calidad del ARN de las muestras obtenidas.

- 1- Los perfiles de expresión genética de los genes relacionados con la angiogénesis es similar a las 24h y a las 4sem del xenotrasplante tumoral en la gran mayoría de los genes estudiados (fig.4.4.23).
- 2- En el Ch grado 2, la fase de inducción angiogénica suele ocurrir a las 48h tras el implante tumoral, un poco más tarde que en los dos tumores anteriores estudiados (ES y OS) donde la sobreexpresión de los genes implicados en la fase de inducción ocurre en las primeras 24h. En esta fase participan sobre todo factores pro-angiogénicos como *VEGF*, *VEGFC* y el receptor *Flt1*, *PDGFA*, *PDGFB*, *FGF7* y el receptor *FGFR1* (fig. 4.4.24).
- 3- Se distinguen claramente dos perfiles genómicos, uno correspondiente a la inducción de angiogénesis durante las primeras 48h que se caracteriza por la sobreexpresión de *VEGF*, así como de otros factores pro-angiogénicos y sus receptores; y una segunda fase caracterizada por la expresión de quimiocinas y elementos de la matriz involucrados en la consolidación de estructuras vasculares en el tumor.
- 4- Así mismo se observa a partir de las 48h un aumento de los factores inhibidores de angiogénesis y algunos estabilizadores vasculares con sus receptores involucrados en ese proceso de remodelación y consolidación de las estructuras vasculares (fig. 4.4.25).



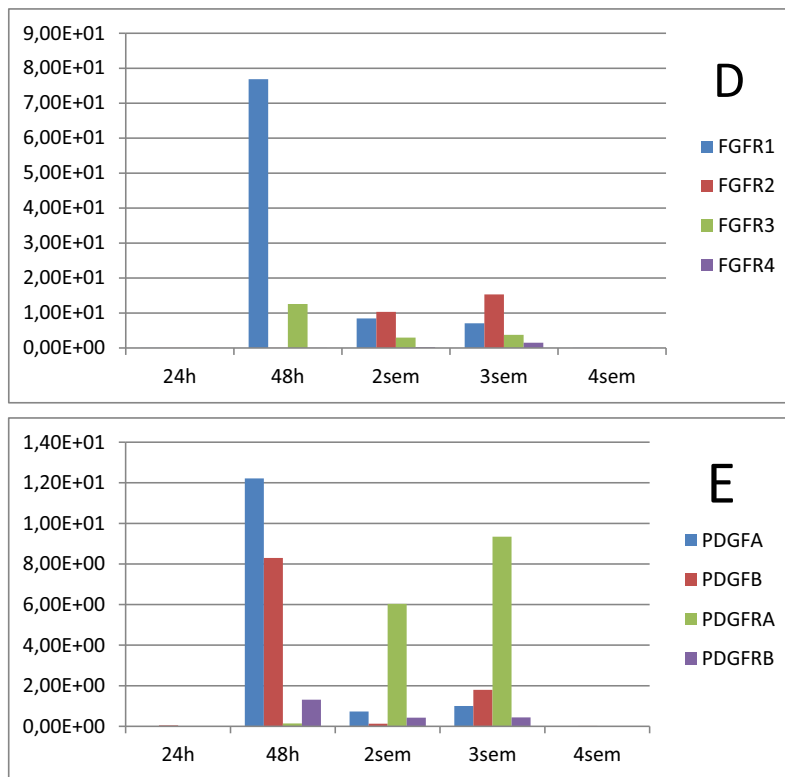
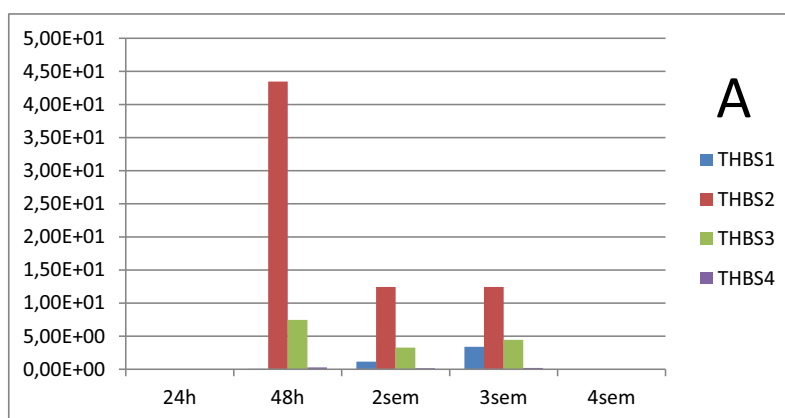


Figura 4.4.24. Histogramas de representación de los principales factores pro-angiogénicos y sus receptores en los diferentes tiempos en el Ch grado 2. **A.** Expresión de *VEGFC* a las 48h y tardía de *HIF1A*; **B.** Expresión de receptores de *VEGF* y *NRP1*; **C.** Expresión de *FGF7* a las 48h; **D.** Expresión prominente de *FGFR7* a las 48h; **E.** Perfil de expresión de *PDGF* y sus receptores.



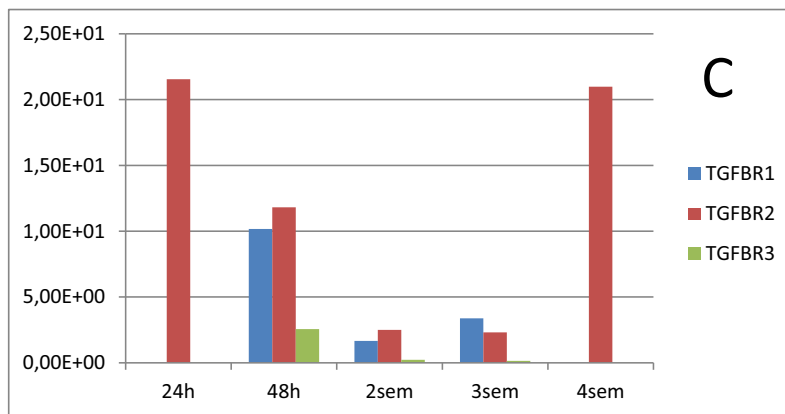
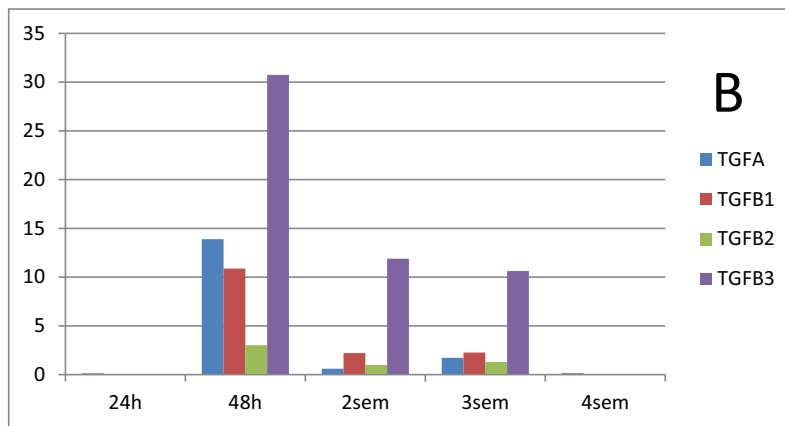


Figura 4.4.26. Histogramas de representación de los principales factores antiangiogénicos, estabilizadores vasculares y sus receptores en los diferentes tiempos en el Ch grado 2. **A.** Representación de la expresión del factor anti-angiogénico *THBS*; **B.** Expresión de los factores estabilizadores vasculares *TGF*, expresión intensa a las 48h ; **C.** Expresión de los receptores de los factores estabilizadores *TGFR*, sobre todo en las primeras horas y a la 4sem.

4.5. SARCOMA SINOVIAL MONOFÁSICO FUSOCELULAR

El tumor primario humano pertenece a un varón de 31 años de edad que presentaba una masa en miembro inferior, en proximidad a la rodilla derecha.

El tumor primario se implantó en un ratón nude y se realizaron sucesivos pases en el pase número 11 se utilizó el tumor xenotransplantado para esta experiencia.

El tumor está constituido por células fusiformes que crecen en un patrón estoriforme y fasciculado con escaso componente estromal. Las células presentaron positividad intensa para vimentina y de manera focal y parcheada para citoqueratina (AE1/AE3) y EMA. Los estudios de biología molecular mostraron la presencia de la traslocación SYT/SSX.

4.5.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

A las 24h, el tumor de manera característica crece infiltrando el tejido adiposo y fibras de músculo esquelético peritumorales del ratón. Se observa presencia de cariorrexis y necrosis aislada y puntiforme acompañado de microhemorragias en el estroma peritumoral murino. El número de mitosis se conserva elevado aunque es difícil diferenciar las figuras de mitosis de las de cariorrexis abundantes en este momento. La preservación tumoral con células fusiformes en fascículos sólidos se mantiene como en el tumor humano.

En las 48h, Las células tumorales persisten en fascículos sólidos y en masas más compactas densas con escaso estroma. Como se observa también en los Chs está presente un infiltrado polimorfonuclear y linfoplasmacitario intra y peritumoral. En este momento se continúan observando abundante figuras de cariorrexis. La necrosis continúa siendo puntual y parcheada. El número de mitosis es ligeramente menor que en el tumor control y en las 24h. El tumor de manera característica crece infiltrando el tejido adiposo y fibras de músculo esquelético peritumorales del ratón sin evidenciarse pseudocápsula tumoral.

A partir de las 96h, persiste el tejido tumoral vivaz pero se observa un incremento paulatino de la necrosis hasta la tercera semana, así como una

disminución del infiltrado inflamatorio intratumoral y peritumoral pero sobre todo de la inflamación intratumoral. La actividad divisional se mantiene.

En la tercera semana, la necrosis alcanza su máximo nivel donde se vuelve central y extensa aunque no llega a ser igual que en ES o el OS. En este momento precisamente el número de mitosis es el más escaso de todos los tiempos. El tejido estromal peritumoral presenta linfocitos, células plasmáticas y capilares sanguíneos con células mesenquimales angioblásticas y no angioblásticas.

El tumor de manera característica crece infiltrando el tejido adiposo y fibras de músculo esquelético peritumorales del ratón sin evidenciarse la pseudocápsula que se observa en otros tumores.

La cuarta semana no se pudo valorar por ausencia de tumor.

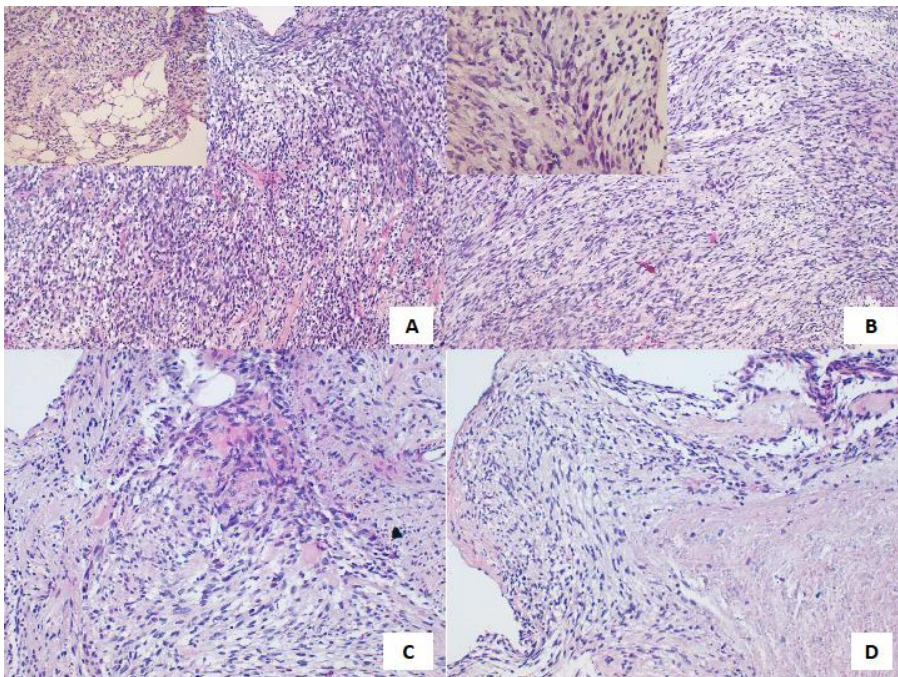


Figura 4.5.1. Imágenes del SS en los diferentes tiempos con H&E. **A**, muestra de SS a las 24h (100X), con infiltrado polimorfonuclear con infiltración del tejido adiposo murino (detalle 200X). **B**, muestra de SS a las 48h (100X), con aisladas mitosis (detalle 400X). **C**, muestra de SS a la 1sem (100X). **D**, muestra de SS a las 3sem con abundante necrosis (40X).

4.5.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

4.5.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.5.2.1.1.-CXCL9

Expresión moderada, citoplasmática y homogénea a las 24h disminuyendo la intensidad de la expresión posteriormente. La expresión en las primeras semanas es débil o nula. Ver figura 4.5.2B y 4.5.5.

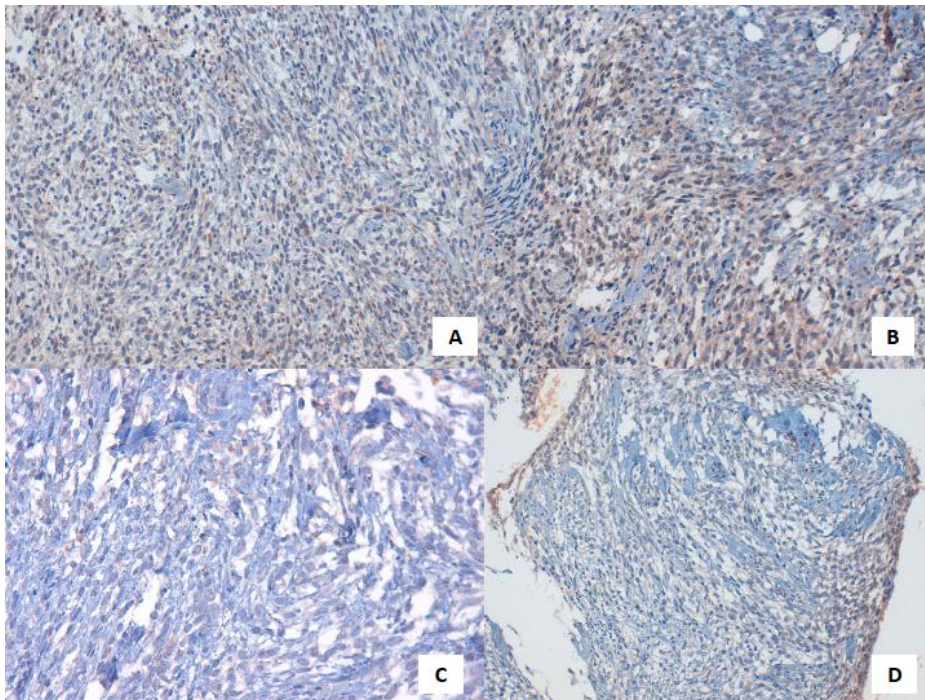


Figura 4.5.2. Expresión de CXCL9 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en un SS. **A**, expresión moderada de CXCL9 en el tumor control (40X). **B**, expresión moderada de CXCL9 a las 24h con expresión celular y extracelular (40X). **C**, expresión débil de CXCL9 a las 48h (100X). **D**, expresión débil de CXCL9 a la 1sem (40X).

4.5.2.1.2.-CXCL10

La expresión del marcador es citoplasmática y nuclear de células tumorales y estroma (fig.4.5.3C). Se observa un pico elevado de expresión en la segunda semana postrasplante. En el resto de tiempos la expresión es débil en aisladas células neoplásicas. Ver figura 4.5.3D.

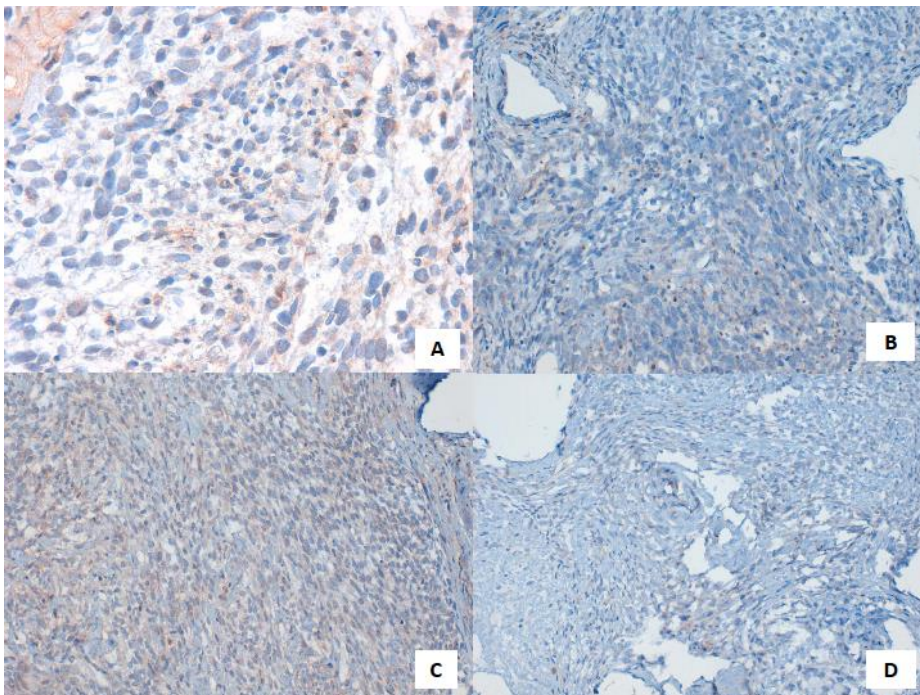


Figura 4.5.3. Expresión de CXCL10 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en un SS. **A**, expresión leve de CXCL10 en el tumor control, expresión citoplasmática y nuclear (200X). **B**, expresión débil de CXCL10 a las 24h (100X). **C**, expresión moderada de CXCL10 tumoral y estromal a las 2sem (40X). **D**, expresión muy débil de CXCL10 a las 3sem (40X).

4.5.2.1.3.-CXCR3

Expresión muy leve de este receptor de quimiocinas, prácticamente nula la expresión en las primeras horas de desarrollo. Ver figura 4.5.5. En la tercera semana se observa una expresión estromal del receptor (fig. 4.5.4D).

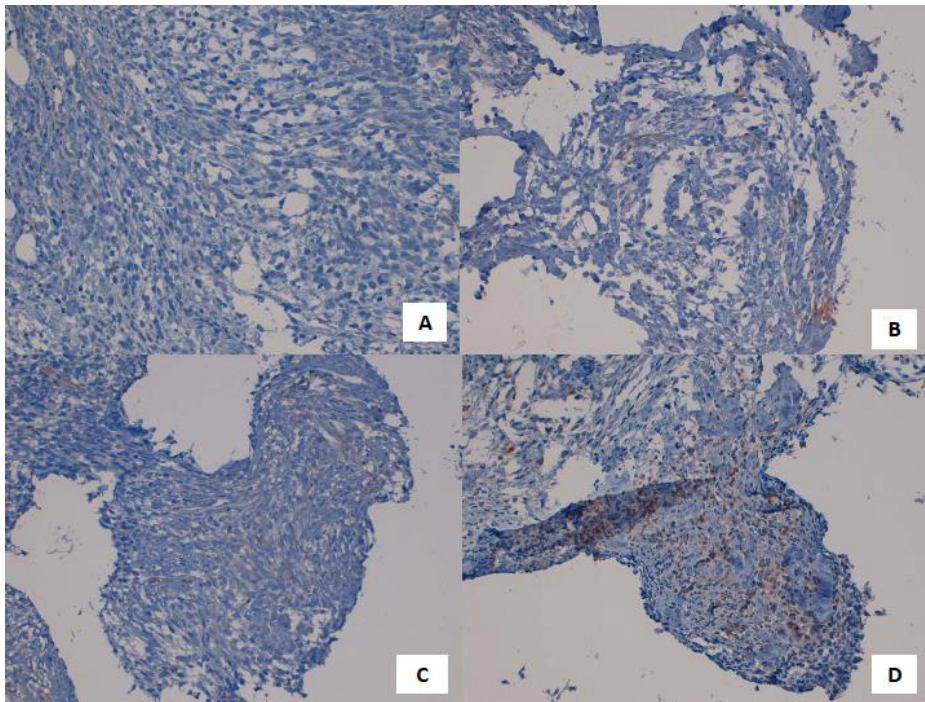


Figura 4.5.4. Expresión de CXCR3 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en un SS. **A**, expresión nula de CXCR3 a las 24h (100X). **B**, expresión muy débil de CXCR3 a la 1sem (100X). **C**, expresión muy débil de CXCR3 a las 2sem (40X). **D**, expresión débil estromal y celular de CXCR3 a las 3sem (40X).

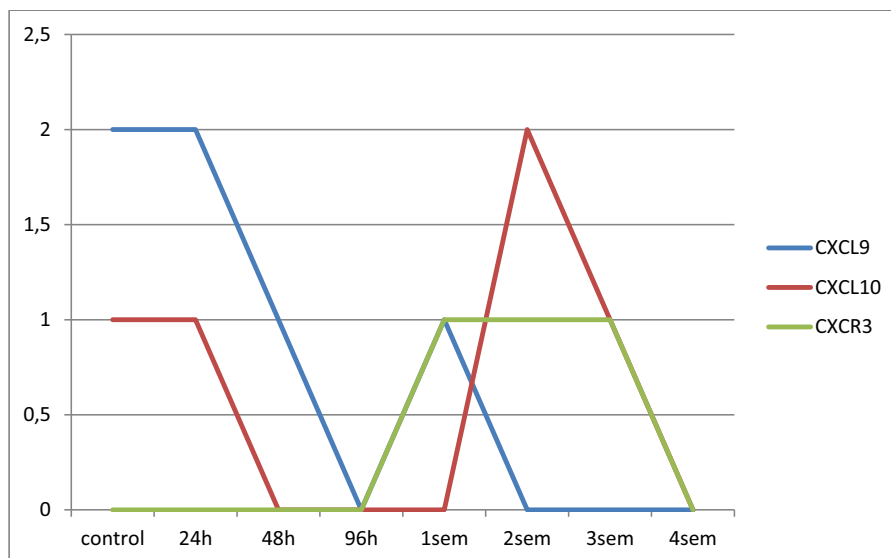


Figura 4.5.5. Gráfica de los niveles de expresión observado de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 según tinción inmunohistoquímica con peroxidasa en el SS. NV: 4sem todos.

4.5.2.1.4.-GRO

La expresión de GRO es débil y citoplasmática en general siendo más intensa con un pico de expresión en la primera semana tras el xenotrasplante decreciendo posteriormente. Ver figura 4.5.8. Se observa expresión extracelular también. Ver figura 4.5.6C.

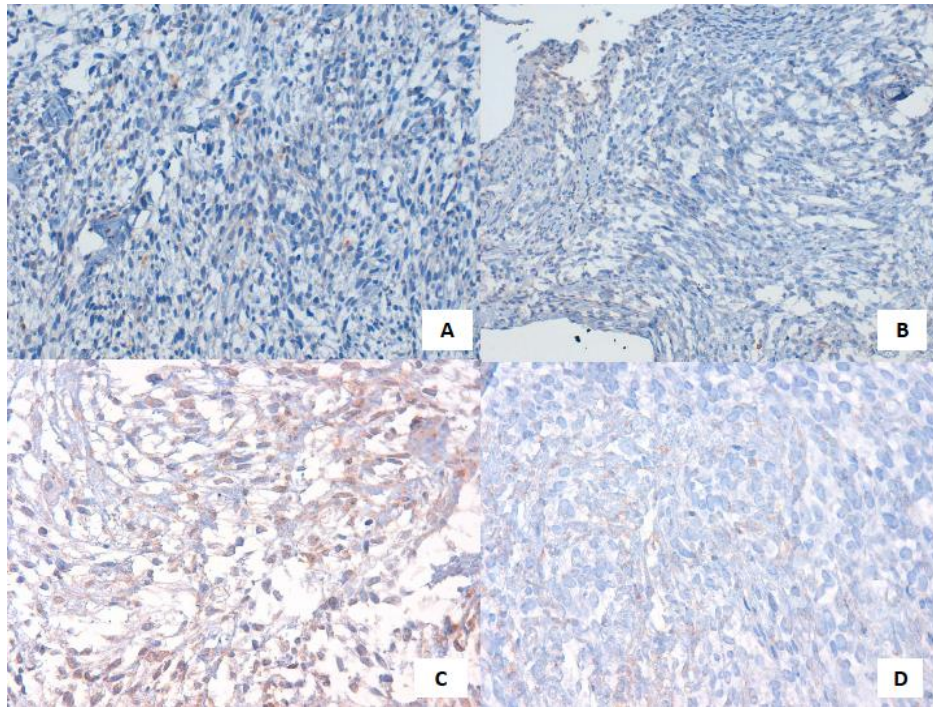


Figura 4.5.6. Expresión de GRO en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en un SS. **A**, expresión muy débil de GRO en el tumor control (40X). **B**, expresión muy débil de GRO a las 48h (40X). **C**, expresión moderada de GRO tumoral y estromal en la 1sem (200X). **D**, expresión moderada estromal de GRO a las 2sem (200X).

4.5.2.1.5.-CXCR2

La expresión es intensa, citoplasmática y nuclear por las células tumorales y el estroma neoplásico en todos los casos. Ver figura 4.5.7 y 4.5.8.

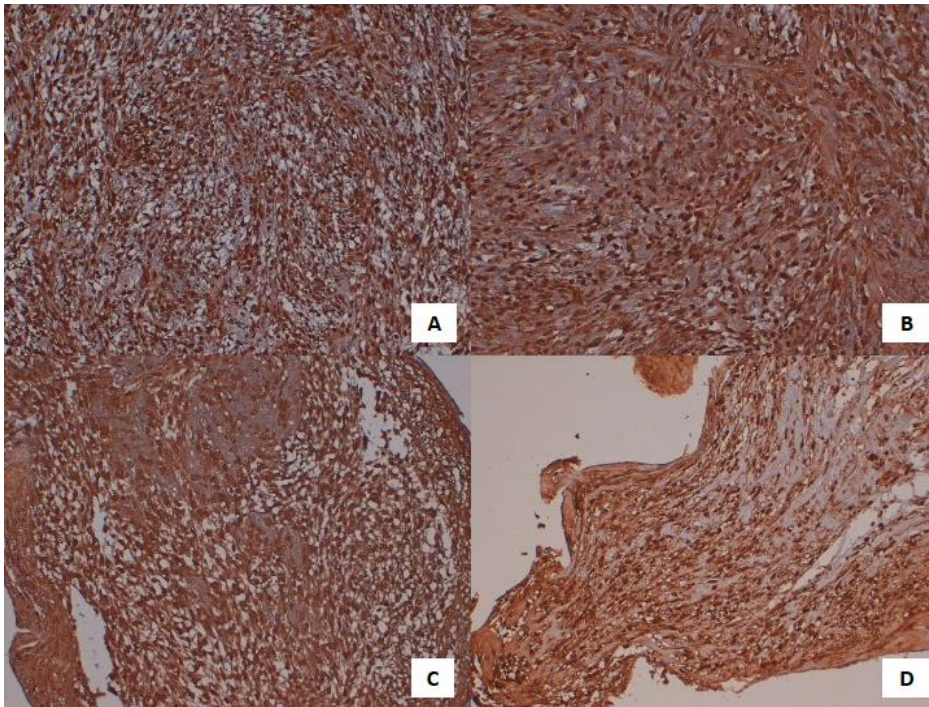


Figura 4.5.7. Expresión de CXCR2 en los diferentes tiempos con inmunotinción con peroxidasa en SS. **A, B, C y D** expresión intensa tumoral y estromal de CXCR2 en el tumor control, a las 48h, 2sem y 3sem respectivamente (40X).

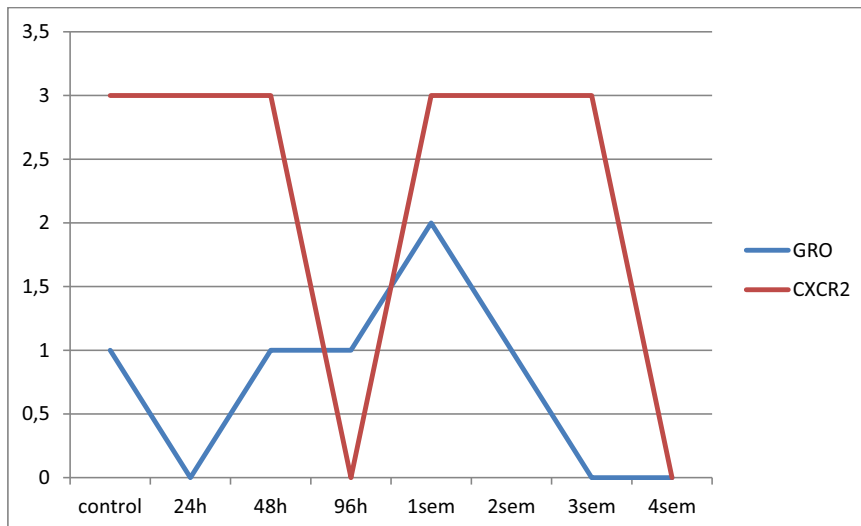


Figura 4.5.8. Gráfica de expresión de GRO y CXCR2 en diferentes tiempos del SS con peroxidasa. NV: 4sem en ambos y 96h en CXCR2.

En **resumen** podemos destacar que en nuestra experiencia en el SS con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

1. La expresión de quimiocinas y CXCR3 es débil en general en el SS respecto a los otros sarcomas estudiados. Sólo el CXCR2 presenta una expresión más intensa en todos los tiempos.
2. La expresión de quimiocinas y receptores no sólo parece intracelular sino que se encuentra también presente en el estroma tumoral intercelular sobre todo de CXCR2.
3. La expresión de los receptores es constitutiva mientras que la de los ligandos es más irregular. CXCL10 y GRO presentan un pico de expresión a partir de la primera semana, mientras que CXCL9 muestra un pico de expresión más precoz en las primeras horas del xenotrasplante. Ver figuras 4.5.5 y 4.5.8.

4.5.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.5.2.2.1.-CXCL9-VIMENTINA

Expresión citoplasmática y levemente heterogénea de CXCL9 por las células tumorales teñidas de manera intensa con vimentina. En ocasiones el marcaje parece también extracelular (fig. 4.5.9C).

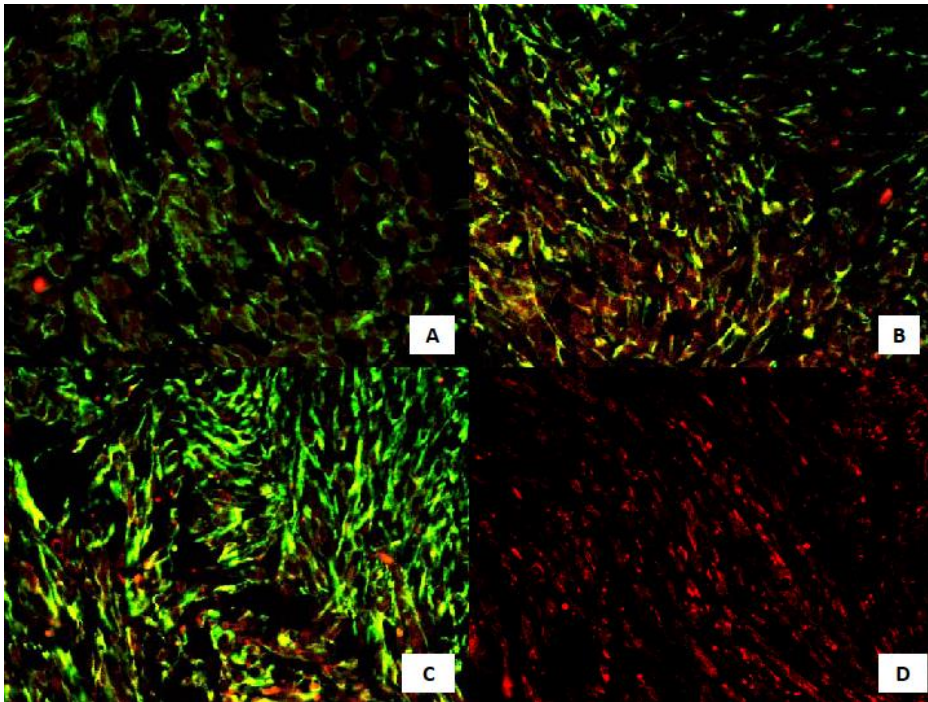


Figura 4.5.9. Expresión de CXCL9 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión débil de CXCL9 a las 24h (400X). **B**, expresión intensa de CXCL9 a las 96h citoplasmática (400X). **C**, expresión intensa de CXCL9 intra y extracelular a las 2sem (400X). **D**, expresión moderada de CXCL9 a las 3sem (400X).

4.5.2.2.2.-CXCL10-VIMENTINA

Expresión del ligando moderada-intensa y homogénea en general intracelular. El marcaje resulta ser claramente nuclear. Expresión intensa y homogénea de vimentina.

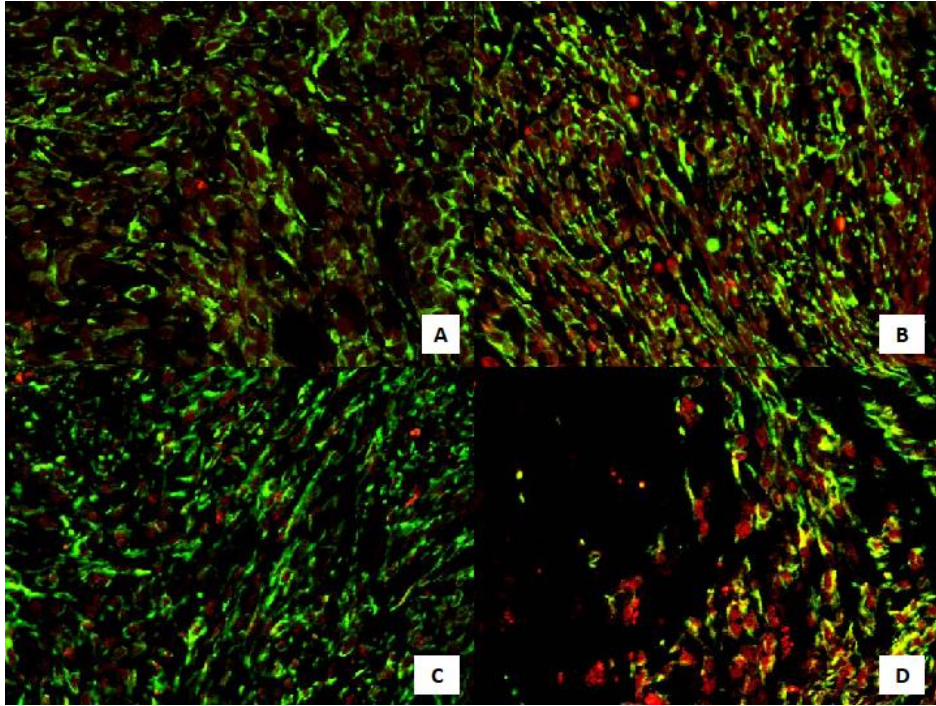


Figura 4.5.10. Expresión de CXCL10 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión moderada de CXCL10 a las 24h con tinción nuclear (400X). **B**, expresión intensa de CXCL10 a las 48h con tinción homogénea y nuclear (400X). **C**, expresión moderada de CXCL10 a la 1sem (400X). **D**, expresión intensa de CXCL10 a las 3sem, tinción citoplasmática y nuclear (400X).

4.5.2.2.3.-GRO-VIMENTINA

Expresión de ligando homogénea, citoplasmática y nuclear, débil en las primeras horas, haciéndose intensa y extracelular a partir de las 96h (fig.4.5.11D). Expresión intensa y homogénea de vimentina.

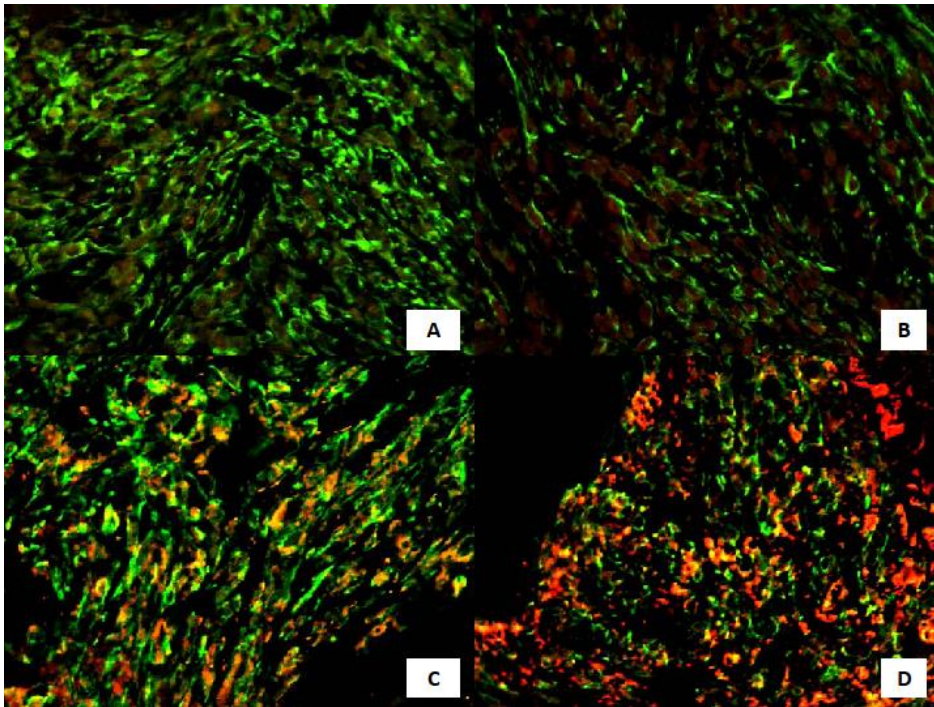


Figura 4.5.11. Expresión de GRO (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión débil de GRO a las 24h (400X). **B**, expresión débil de GRO a las 48h, tinción nuclear y citoplasmática (400X). **C**, expresión intensa de GRO a la 1sem, con expresión intra y extracelular (400X). **D**, expresión intensa intra y extracelular a las 3sem de GRO (400X).

4.5.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

Expresión débil y aislada del ligando. La intensidad del receptor es más prominente, siendo ligeramente más positivo a las 48h. Ver figura 4.5.12C.

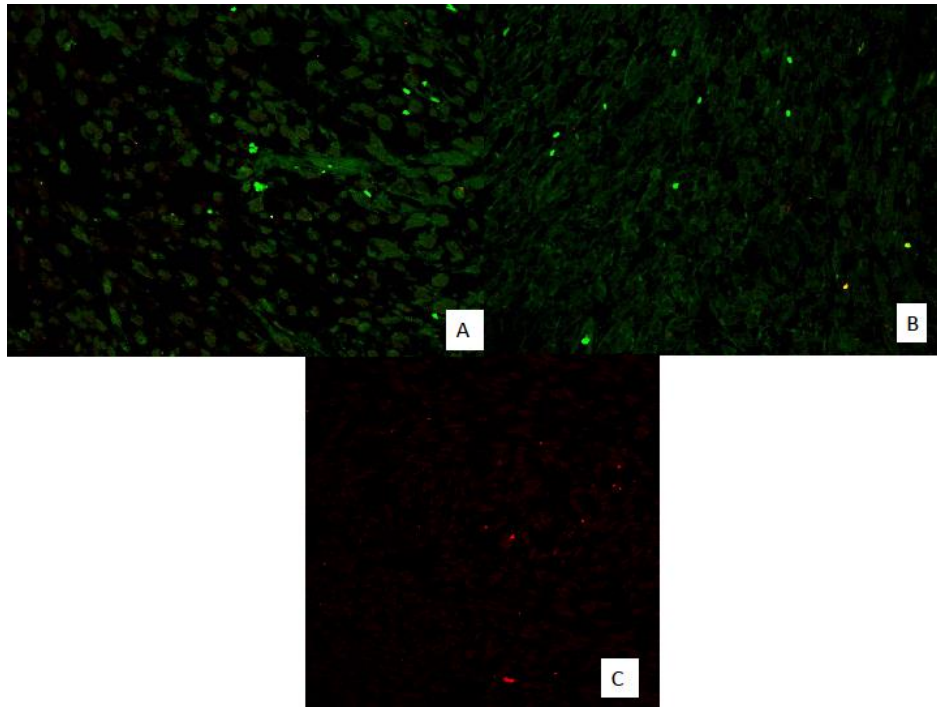


Figura 4.5.12. Expresión de CXCL9 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión débil de ligando e intensa de receptor a las 48h (400X). **B**, expresión nula de CXCL9 y moderada de receptor a las 2sem (400X). **C**, expresión débil de CXCL9 en el tumor control (400X).

4.5.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

Expresión del ligando leve e intratumoral en las primeras 24h, haciéndose moderada a partir de las 48h, la tinción del ligando es granular y nuclear. Por otra parte, la expresión del receptor es moderada, siendo más intensa a las 48h. Ver figura 4.5.14.

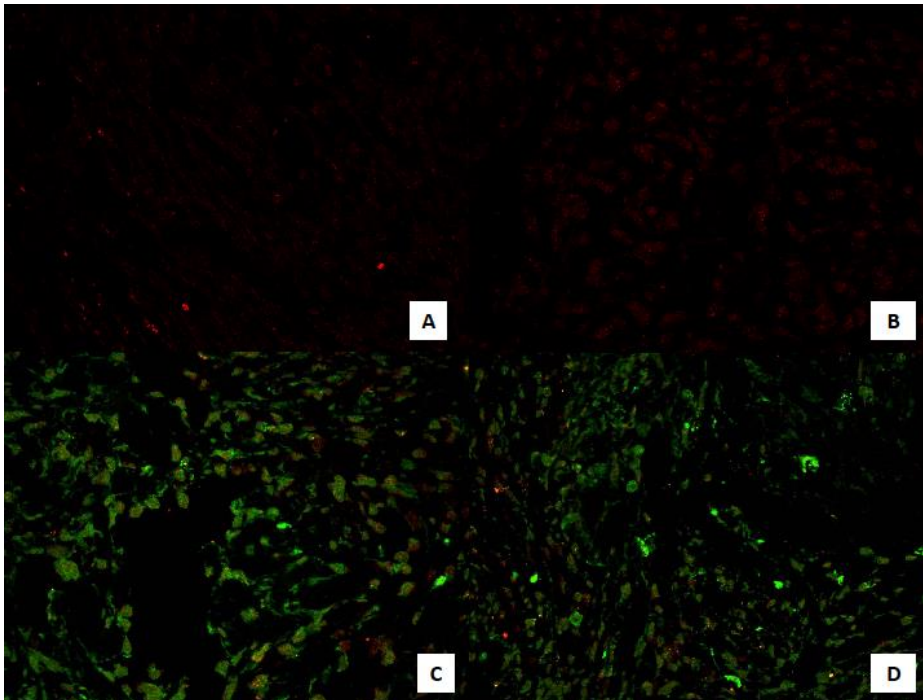


Figura 4.5.13. Expresión de CXCL10 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión débil de CXCL10 a las 24h, tinción nuclear (400X). **B**, expresión moderada de CXCL10 a las 48h (400X). **C**, expresión moderada de CXCL10 y del receptor en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada de ligando y receptor en las 3sem (400X).

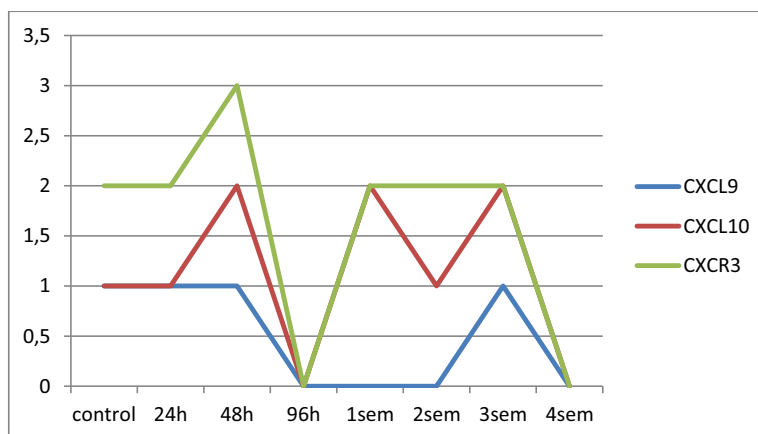


Figura 4.5.14. Gráfica de expresión de CXCL9 y CXCL10 con su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos de SS en IF indirecta. NV: 96h y 4sem en ambos.

4.5.2.2.6.-GRO-CXCR2

Expresión intensa de ligando y receptor sobre todo hasta la segunda semana. La tinción del ligando es nuclear y citoplasmática, mientras que la del receptor es citoplasmática. CXCR2 aparece expresado a nivel estromal. Ver figura 4.5.15B.

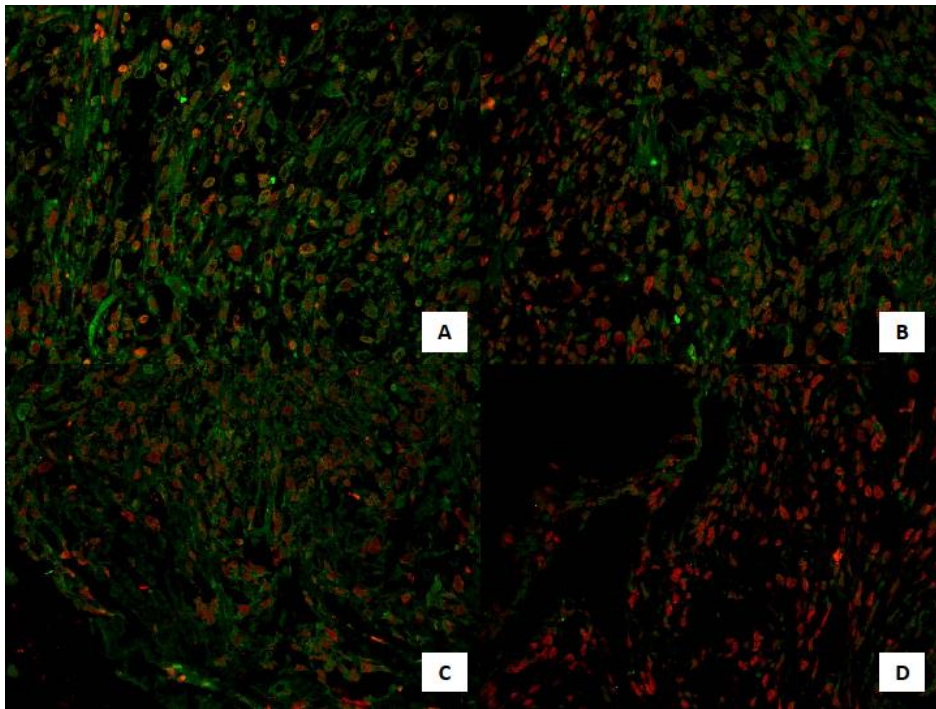


Figura 4.5.15. Expresión de GRO (rojo) y el receptor CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en un SS. **A**, expresión intensa de GRO y del receptor a las 24h, ligera expresión del receptor en el estroma tumoral (400X). **B**, expresión intensa y homogénea de ligando y receptor con positividad estromal en la 1sem (400X). **C**, expresión intensa de GRO a la 2sem con tinción nuclear y citoplasmática, con expresión intensa de receptor (400X). **D**, expresión intensa de GRO y débil de CXCR2 a las 3sem (400X).

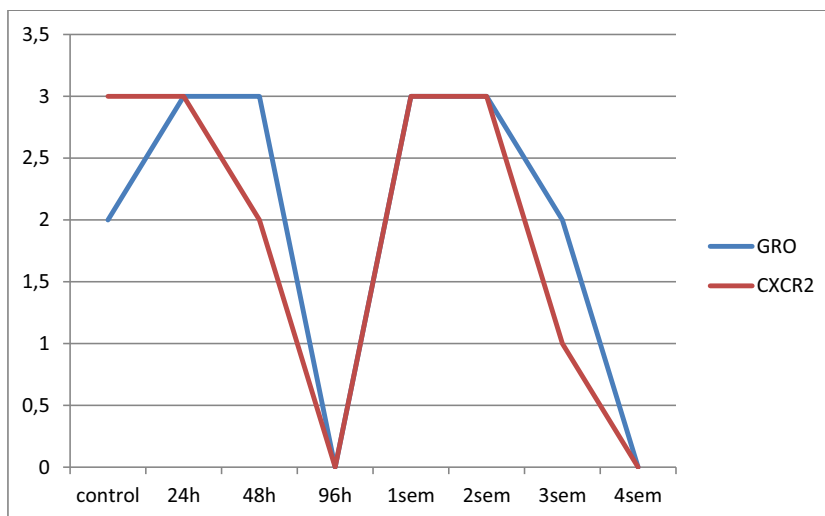


Figura 4.5.16. Gráfica de expresión de GRO y su receptor CXCR2 en los diferentes tiempos de SS en IF indirecta. NV: 96h y 4sem en ambos.

La concordancia entre peroxidasa e IF es de 23.3% de todos los casos, siendo el CXCR2 el que mayor concordancia muestra de todos los marcadores.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el SS con el estudio inmunohistoquímico :

1. En IF se observa una expresión mantenida tanto de ligandos como de receptores, sin presentarse claramente picos de expresión en las primeras fases del desarrollo tumoral.
2. En peroxidasa parecen mostrarse un pico de expresión de CXCL9 en las primeras 24h y de CXCL10 y GRO a partir de la primera semana.
3. En el 53.3% de los casos la IF presenta una intensidad mayor que la técnica de peroxidasa sobre todo GRO y CXCR3 que muestran una positividad mucho más intensa en IF que en peroxidasa, el resto de quimiocinas y CXCR2 es parecido a la peroxidasa.
4. Las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 tuvieron una expresión mucho menor en combinación con el receptor que con la vimentina.

5. Las células tumorales expresan tanto quimiocinas CXCL9, CXCL10 y GRO como sus receptores. Sólo en algunos casos se intuye una expresión de las quimiocinas y del receptor en el estroma tumoral pero no es tan evidente como en los casos anteriores.
6. La concordancia entre peroxidasa e IF es de 23.3% de todos los casos, siendo el CXCR2 el que mayor concordancia muestra de todos los marcadores.
7. En IF el GRO es la única quimiocina que iguala la intensidad de su receptor CXCR2, ya que CXCL9 y CXCL10 muestran una intensidad en la expresión menor con respecto a su receptor.

4.5.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.5.2.3.1. Índice proliferativo.

El índice proliferativo disminuye a partir de las primeras 48h y se mantiene bajo hasta las primeras 3 semanas tras el xenoinjerto. Estos datos se correlacionan con los vistos en el epígrafe 4.5.1 de estudio morfológico. Ver figura 4.5.17.

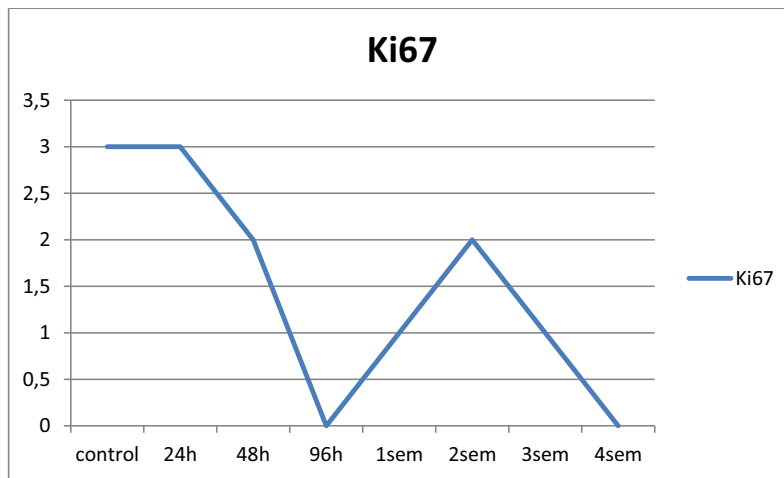


Figura 4.5.17. Gráfica de expresión de Ki67 en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: 96h y 4sem.

4.5.2.3.2. Factores angiogénicos.

La expresión de HIF1A es intensa en todos los tiempos estudiados, sólo a partir de la tercera semana se observa un ligero descenso. En el tumor establecido (control) la positividad es leve. Ver figura 4.5.18.

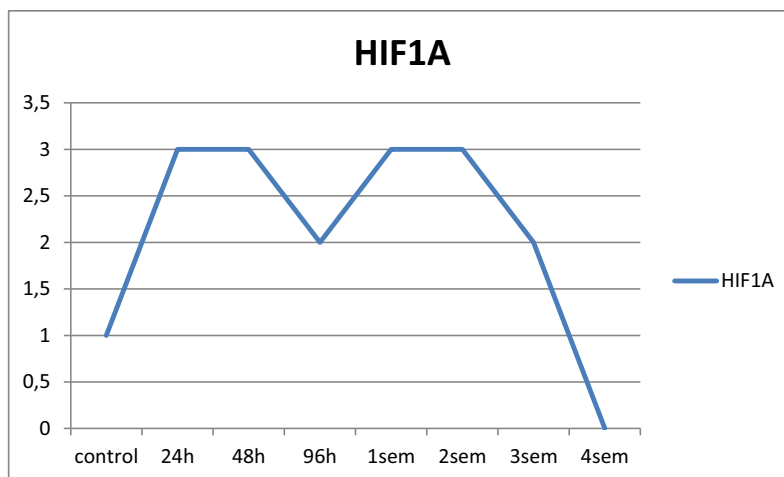


Figura 4.5.18. Gráfica de expresión de HIF1A en los diferentes tiempos de las primeras fases del desarrollo tumoral con peroxidasa. NV: 4sem.

La expresión de VEGF es más intensa en el tumor a las 24h y el receptor VEGFR3 es el más positivo ya que los otros dos VEGFR1 y VEGFR2 son negativos. Ver figura 4.5.19.

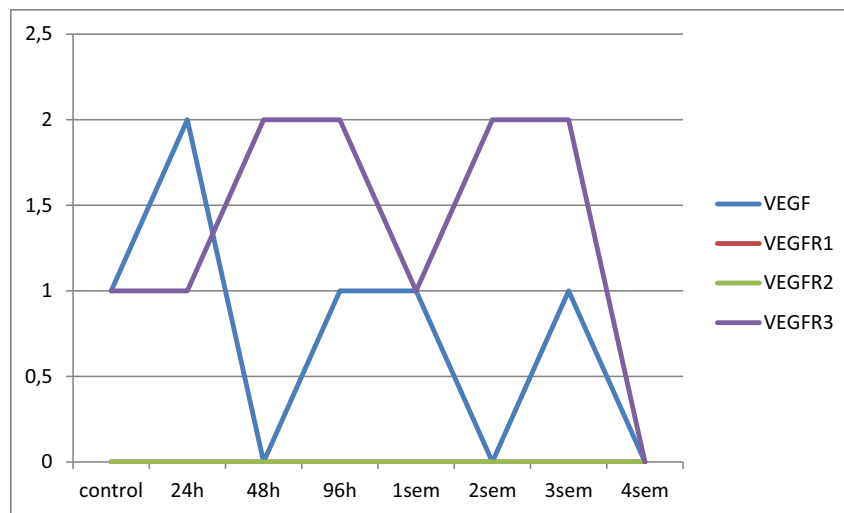


Figura 4.5.19. Gráfica de expresión de VEGF y sus distintos receptores en los diferentes tiempos tras el xenotrasplante en SS. NV: 4sem en todos.

Los otros factores angiogénicos muestran una PDGFRA fluctuante en las primeras fases del desarrollo.

FGF2 muestra un claro pico de expresión en la segunda semana y VE-CAD está ausente en todos los tiempos. Ver figura 4.5.20.

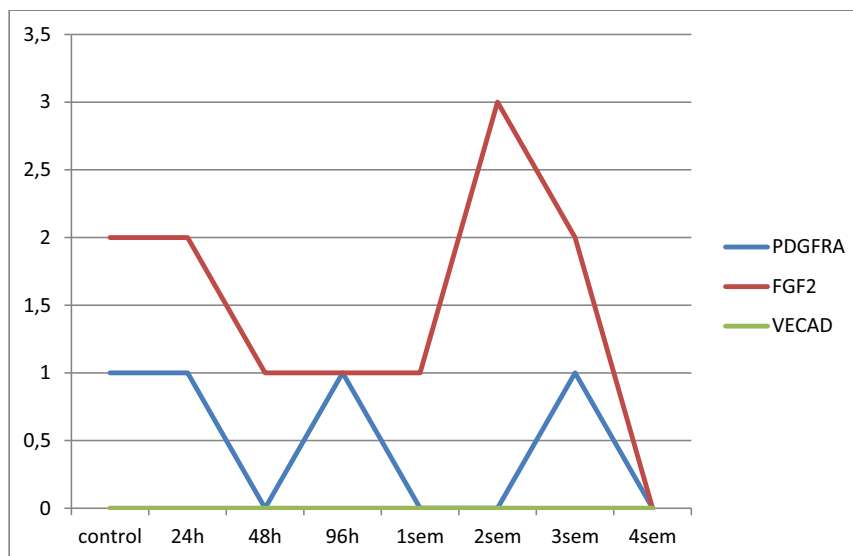


Figura 4.5.20. Gráfica de expresión de PDGFRA, FGF2 y VE-CAD en los diferentes tiempos tras el xenotrasplante en SS. NV: 4sem en todos.

4.5.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.5.3.1. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluídica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación (tumor control).

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite” v3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.5.21 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal. De este conglomerado se obtiene la siguiente información:

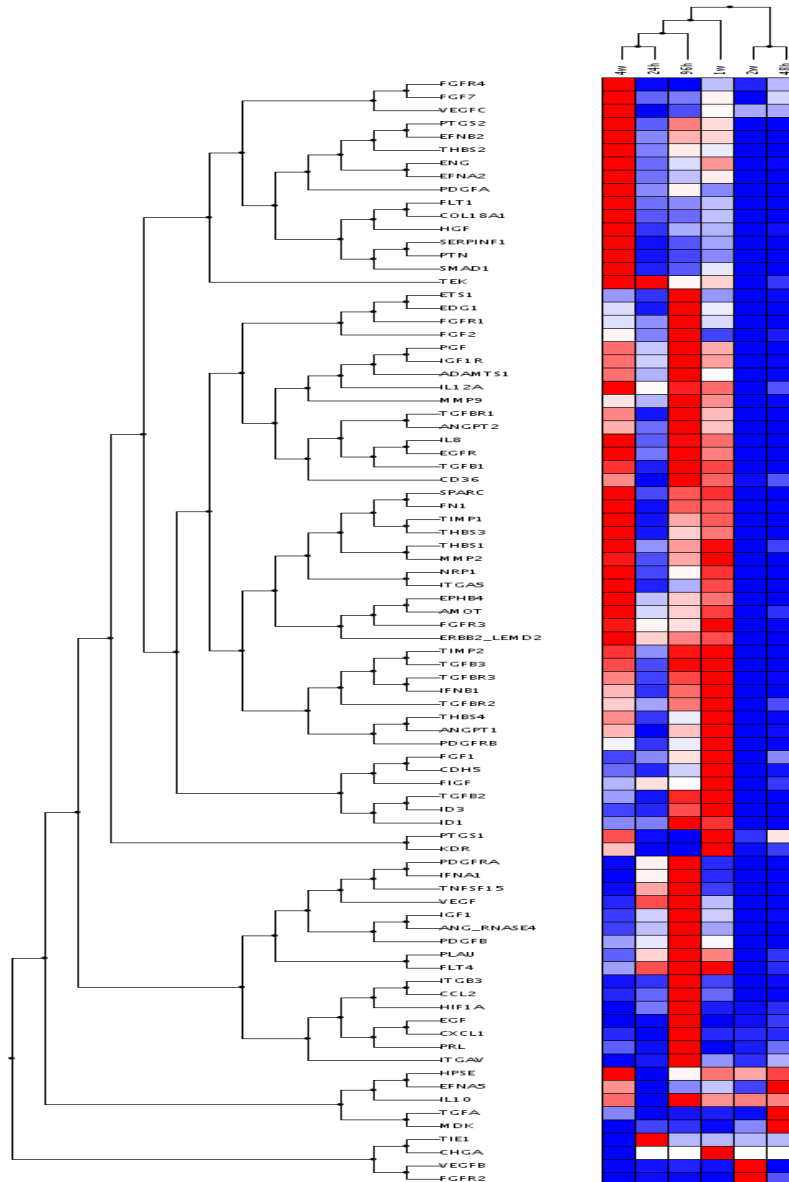
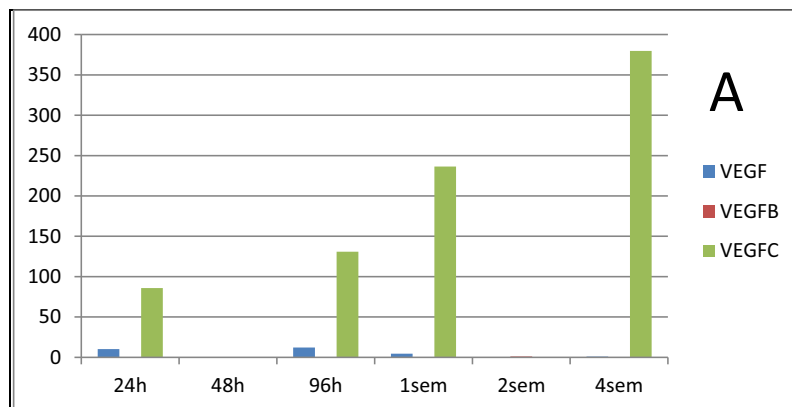
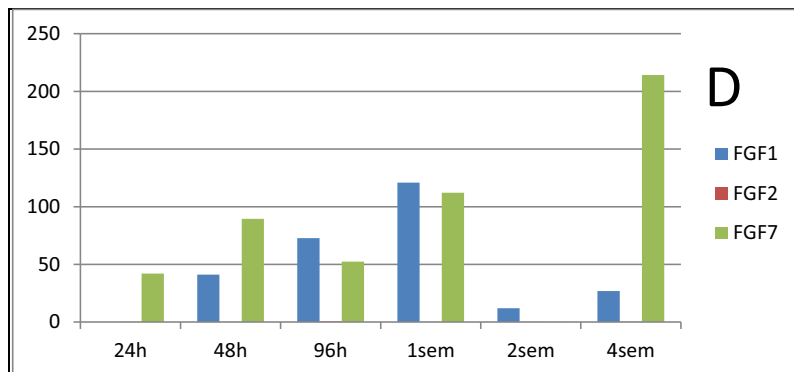
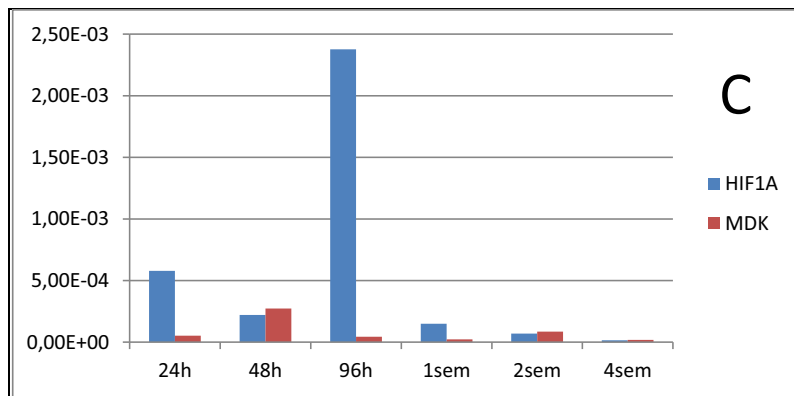
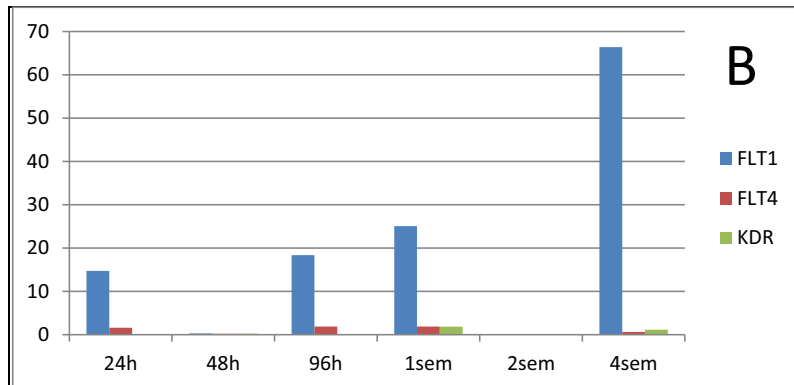


Figura 4.5.21. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis del SS. 1, 24h; 2, 48h; 3, 96h; 4, 1sem; 5, 2sem; 6, 4sem. No se pudo evaluar las 3sem por mala calidad del ARN de las muestras obtenidas.

- 1- Los perfiles de expresión génica son similares a las 24h y la cuarta semana, al igual que en el Ch grado 2. También es similar la expresión entre las 48h y la segunda semana postxenotrasplante (fig. 4.5.21).
- 2- En el SS, la expresión de factores relacionados con la angiogénesis se expresan de manera mucho más tardía que en el resto de sarcomas estudiados. La mayoría de estos genes se sobreexpresan a la cuarta y a las 96h (fig. 4.5.22 y 4.5.23).
- 3- No hay una buena correlación en este caso en la expresión IHQ de *HIF1A* y en qRT-PCR. En biología molecular no se aprecia la fuerte expresión que se observa en técnicas IHQ (fig. 4.5.23).
- 4- En general, el perfil de expresión génica se comporta más como un sarcoma de bajo que de alto grado en xenotrasplante en ratones nude. El perfil de expresión de quimiocinas y genes es más similar al Ch grado 2.





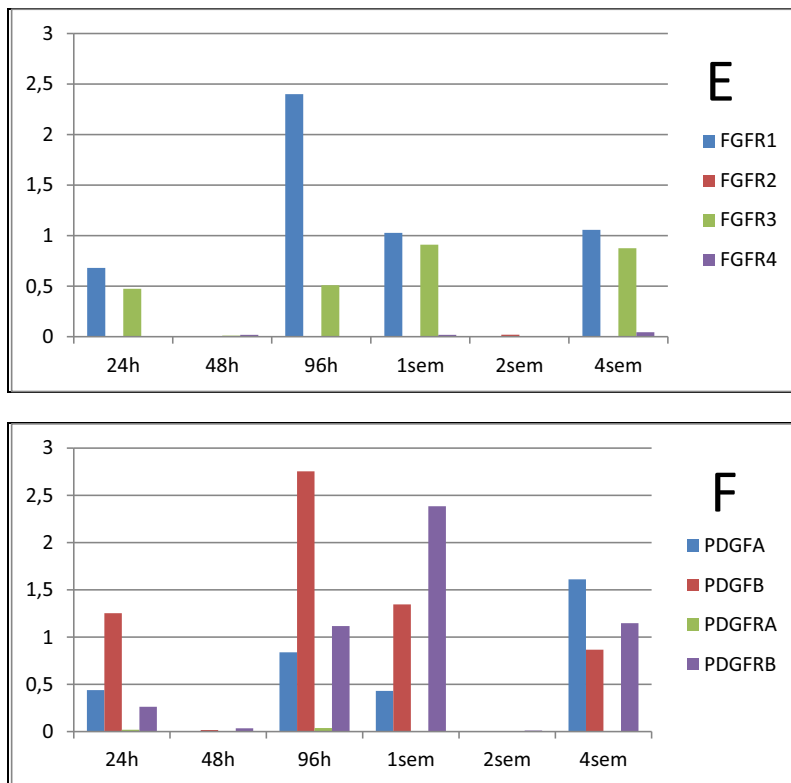


Figura 4.5.22. Histogramas de representación de los genes relacionados con la angiogénesis expresados de manera más evidente en la cuarta semana con sus receptores en el SS. **A.** Expresión de la importante familia *VEGF* más intensa en las últimas semanas; **B.** Perfil de expresión de los receptores de *VEGF* con un perfil similar; **C.** Expresión a las 96h de los importantes factores pro-angiogénicos *HIF1A* y *MDK*; **D y E.** Perfil de expresión de la familia *FGF* y sus receptores, con sobreexpresión a partir de las 96h; **F.** Expresión de la familia *PDGF* y sus receptores más prominente a las 96h.

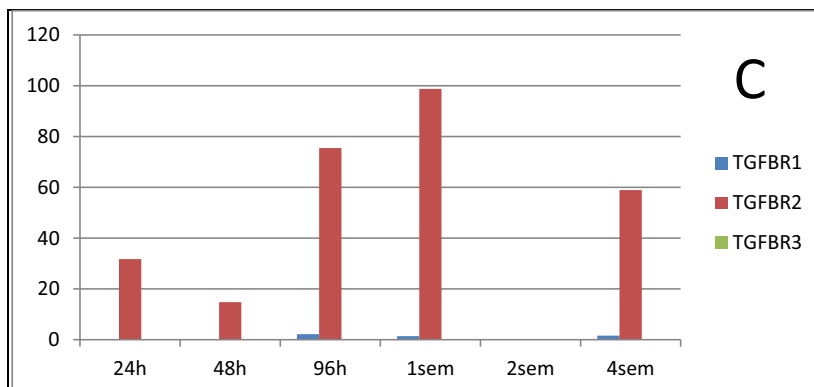
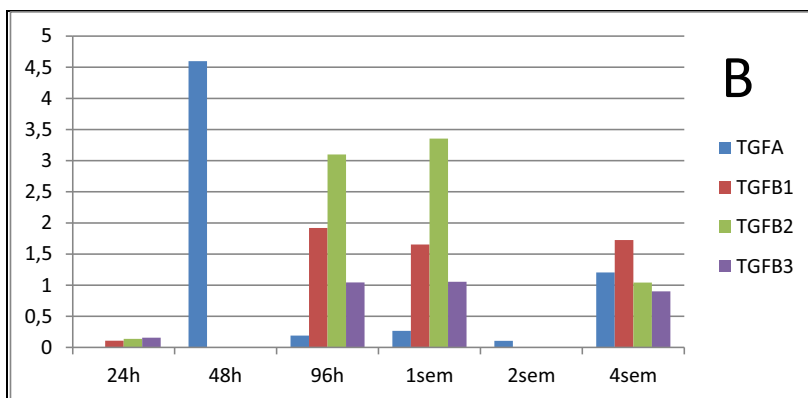
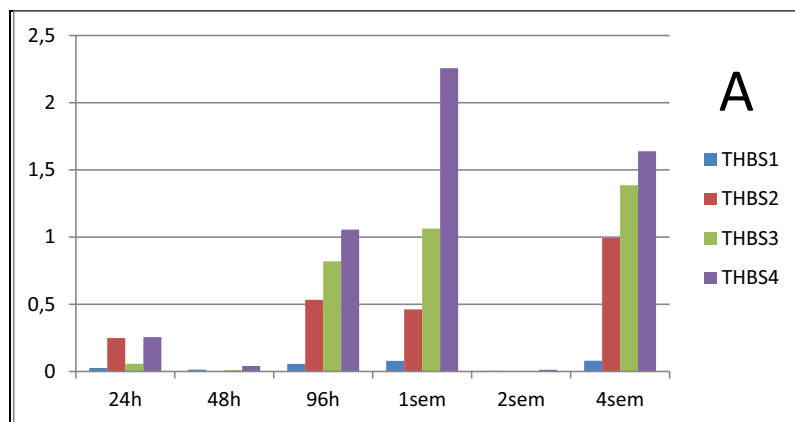


Figura 4.5.23. Histogramas de representación de los genes antiangiogénicos y estabilizadores vasculares con sus receptores en el SS. **A.** Perfil de expresión de la familia angiostática *THBS*, con sobreexpresión en la última mitad del xenotrasplante; **B** y **C.** Perfil de expresión génica de la familia *TGF* estabilizadora de vasos neoformados.

4.6. GIST

El tumor primario apareció en un varón de 63 años de edad en la pared gástrica, dicho tumor se transplantó a un ratón nude y se generaron varios pasajes, en el pase número 2 se sacrificó el animal y se escogió tumor para realizar esta experiencia.

El tumor crece en un patrón estoriforme y fasciculado constituido por células fusiformes que crecen rodeadas de un estroma fibroso. Se observan aisladas figuras mitóticas.

Las células neoplásicas mostraron positividad intensa para la expresión inmunohistoquímica de CD117, DOG-1, bcl-2, CD34 y vimentina. Por otra parte fueron negativas para la expresión de pancitoqueratina (AE1/AE3), actina y desmina.

Los estudios de biología molecular detectaron la presencia de la mutación del exón 11 en *KIT*.

4.6.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

En las primeras 24h, el tumor mantiene su textura histológica semejante a la del tumor primario si bien las células aparecen edematizadas y con picnosis el tumor muestra microhemorragias periféricas e intersticiales con presencia de aisladas células inflamatorias. Presencia escasa de figuras mitóticas junto a abundantes figuras de cariorrexis.

Entre las 48h y 96h, persiste la estructura fusocelular sólida de la tumoración dispuesta en fascículos entremezclados con focos de necrosis parcheada además muestra un infiltrado de polimorfonucleares intratumorales prominente que disminuye gradualmente en los tiempos posteriores. En las primeras 48 horas predominan las figuras de cariorrexis. El número de mitosis en estas fases continua bajo y aumenta a partir de la segunda semana.

La necrosis en la primera fase es parcheada y central.

En el tejido peritumoral se observan linfocitos, células plasmáticas y capilares sanguíneos con presencia de células mesenquimales angioblásticas y no

angioblásticas en un estroma mixoide denso. A diferencia del anterior caso (SS) no se observa ese patrón infiltrativo con el estroma murino y se genera una pseudocápsula peritumoral que delimita el tumor del estroma murino peritumoral.

A partir de la primera semana presenta una necrosis extensa al igual que sucedía con el SS y el Ch grado 2, la necrosis aparece en fases más tardías que en ES y OS. En esta fase aparecen áreas de microhemorragias en el estroma murino (fig.4.6.1C). En este tiempo el número de mitosis continua estando disminuido.

En el tejido peritumoral se observan linfocitos, células plasmáticas y capilares sanguíneos con presencia de células mesenquimales angioblásticas y no angioblásticas en un estroma mixoide denso.

En la segunda semana el número de mitosis comienza a aumentar (fig.4.6.17), justo cuando la necrosis comienza a remitir discretamente. El infiltrado inflamatorio es leve tanto intra como peritumoral.

A partir de la cuarta semana, la imagen histológica se re-establece con imágenes semejantes a las del tumor humano también se restablece el número de mitosis y empieza a remitir la necrosis que vuelve a ser parcheada en este momento.

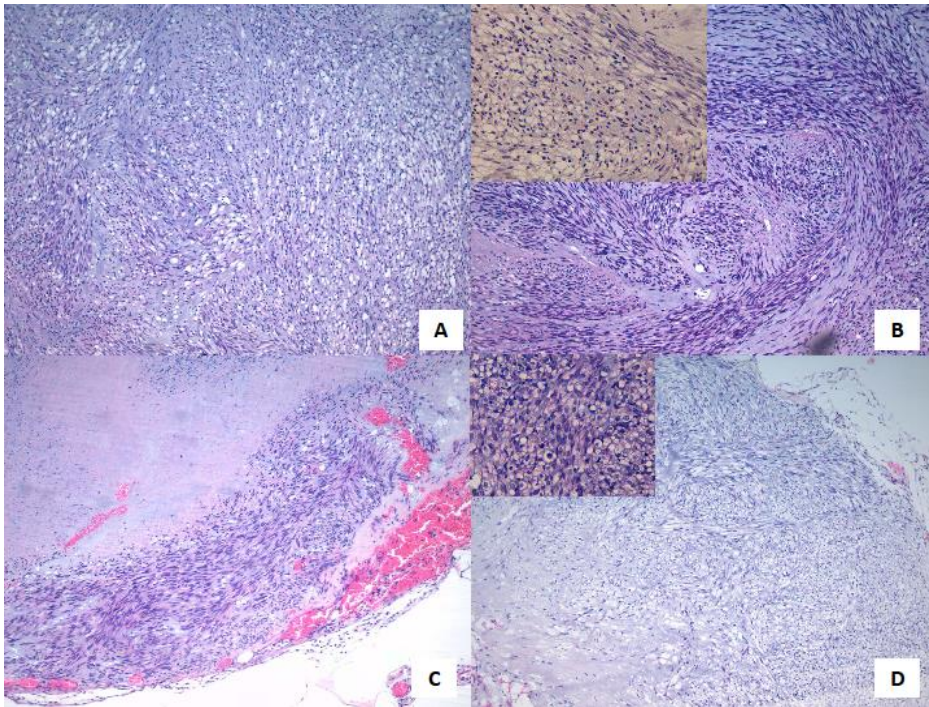


Figura 4.6.1. Imágenes del GIST en los diferentes tiempos con H&E. **A**, imagen de GIST a las 24h con infiltrado inflamatorio polimorfonuclear (100X). **B**, imagen de GIST a las 96h (100X) con infiltrado inflamatorio polimorfonuclear prominente (detalle 400X). **C**, imagen de GIST a la 1sem con abundante necrosis y hemorragia peritumoral (100X). **D**, imagen de GIST en las 4sem con escasa necrosis tumoral (100X) y presencia de mitosis (detalle 400X).

4.6.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

4.6.2.1. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS (LIGANDOS Y RECEPTORES) CON PEROXIDASA.

4.6.2.1.1.-CXCL9

La expresión es leve y parcheada, de características citoplasmáticas y en ocasiones parece que es extracelular (fig.4.6.2B). Aparece de manera un poco más intensa a las 24h y en el tejido control. Ver figura 4.6.2A y B).

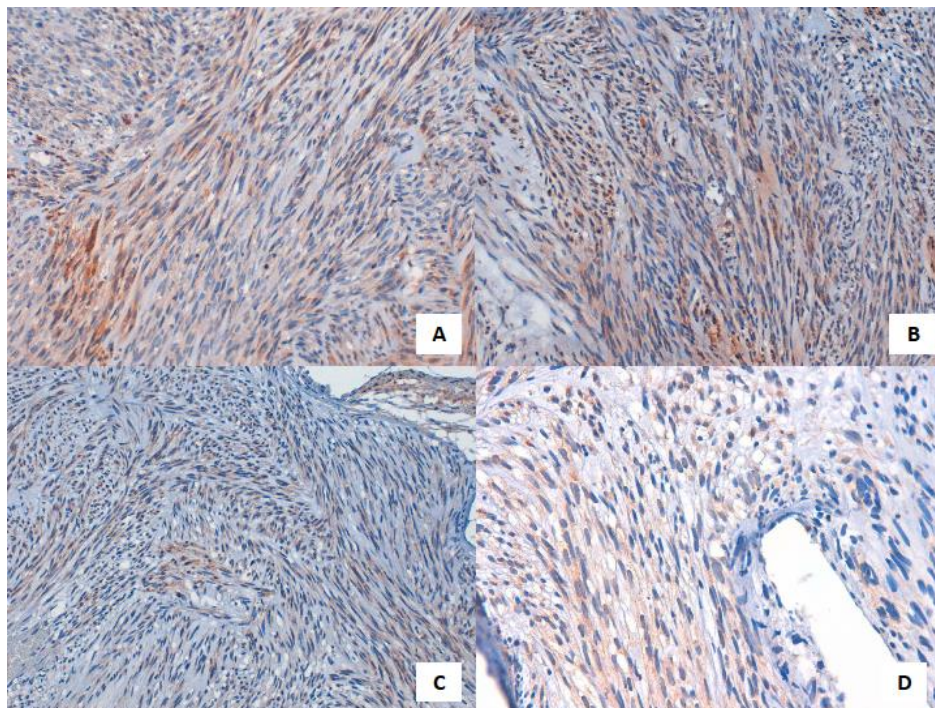


Figura 4.6.2. Expresión de CXCL9 en los diferentes tiempos con inmunotinción de peroxidasa en el GIST. **A**, expresión moderada de CXCL9 en el tumor control, tinción citoplasmática (200X). **B**, expresión moderada de CXCL9 a las 24h con expresión en el estroma tumoral (200X). **C**, expresión débil-moderada de CXCL9 en la 1sem (100X). **D**, expresión débil-moderada de CXCL9 a las 3sem (200X).

4.6.2.1.2.-CXCL10

De expresión citoplasmática, presenta una positividad moderada-intensa en las primeras 96h, decreciendo su expresión a partir de la primera semana. Ver figura 4.6.5.

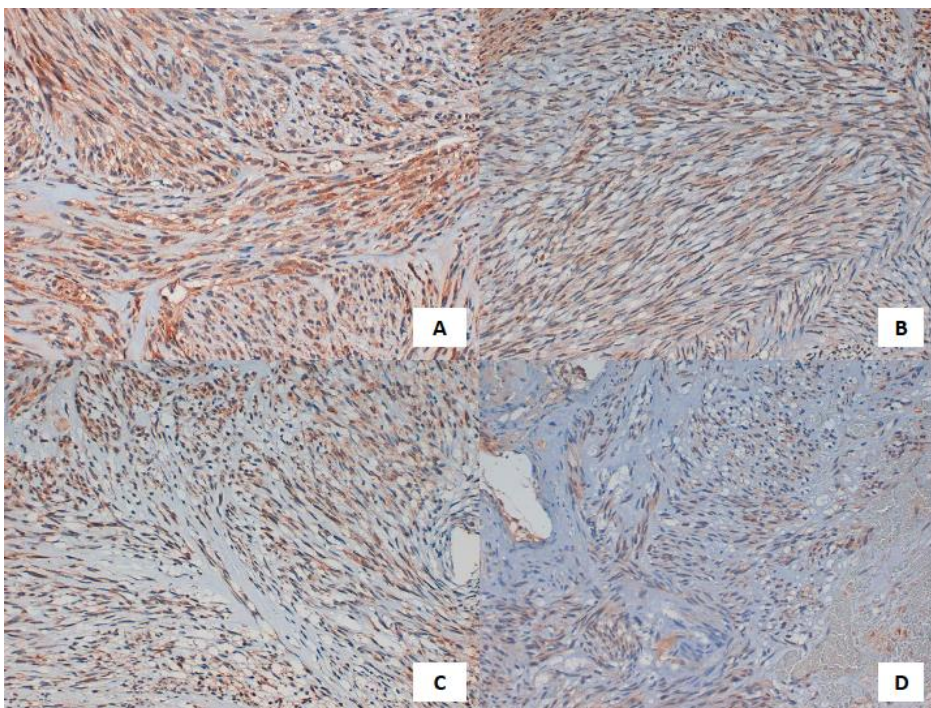


Figura 4.6.3. Expresión de CXCL10 en los diferentes tiempos con inmunotinción de peroxidasa en el GIST. **A**, expresión intensa y homogénea de CXCL10 en el tumor control (200X). **B**, expresión intensa de CXCL10 a las 48h (200X). **C**, expresión moderada-intensa de CXCL10 a las 96h (200X). **D**, expresión débil-moderada de CXCL10 en la 1sem (200X).

4.6.2.1.3.-CXCR3

Expresión leve, heterogénea y parcheada en casi todos los tiempos salvo a las 24h y en el control donde la expresión es moderada-intensa. La expresión es fundamentalmente citoplasmática. Ver figura 4.6.4A.

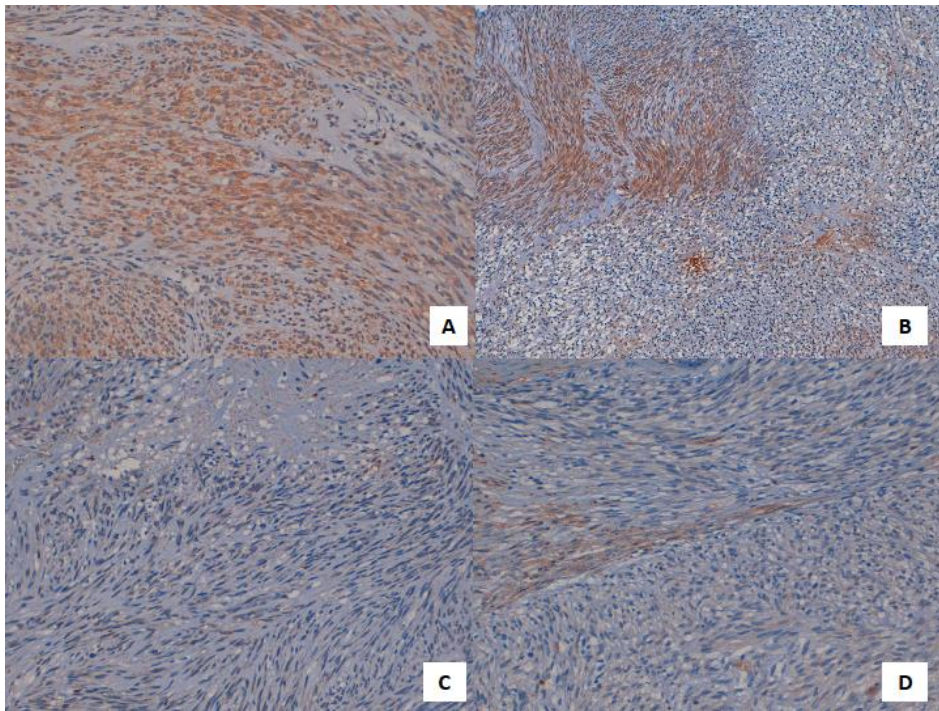


Figura 4.6.4. Expresión citoplasmática de CXCR3 en los diferentes tiempos con inmunotinción de peroxidasa en el GIST. **A**, expresión intensa de CXCR3 en el tumor control (200X). **B**, expresión moderada de CXCR3 a las 24h, expresión heterogénea (100X). **C**, expresión muy débil de CXCR3 a la 1sem (200X). **D**, expresión débil parcheada de CXCR3 en la 2sem (200X).

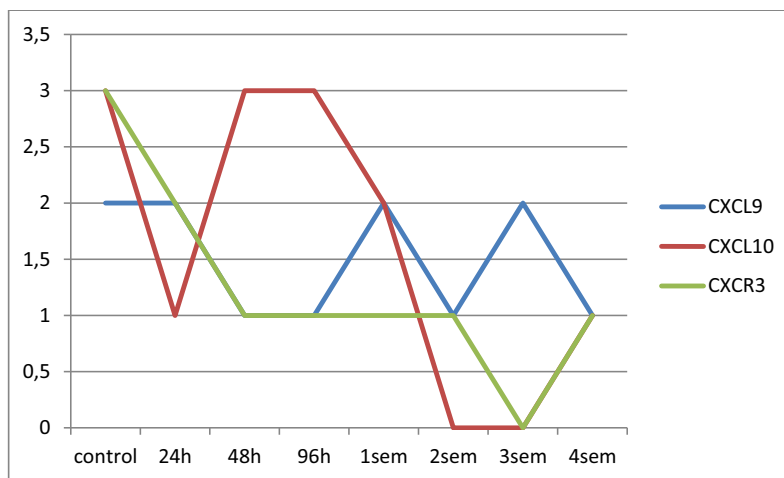


Figura 4.6.5. Gráfica de expresión de receptores de CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos de GIST con peroxidasa. NV: CXCR3 a las 3sem.

4.6.2.1.4.-GRO

La expresión de GRO es más fuerte a las 48h siendo leve y parcheada la positividad en el resto de casos, con marcaje citoplasmático en todos ellos. Ver figura 4.6.8.

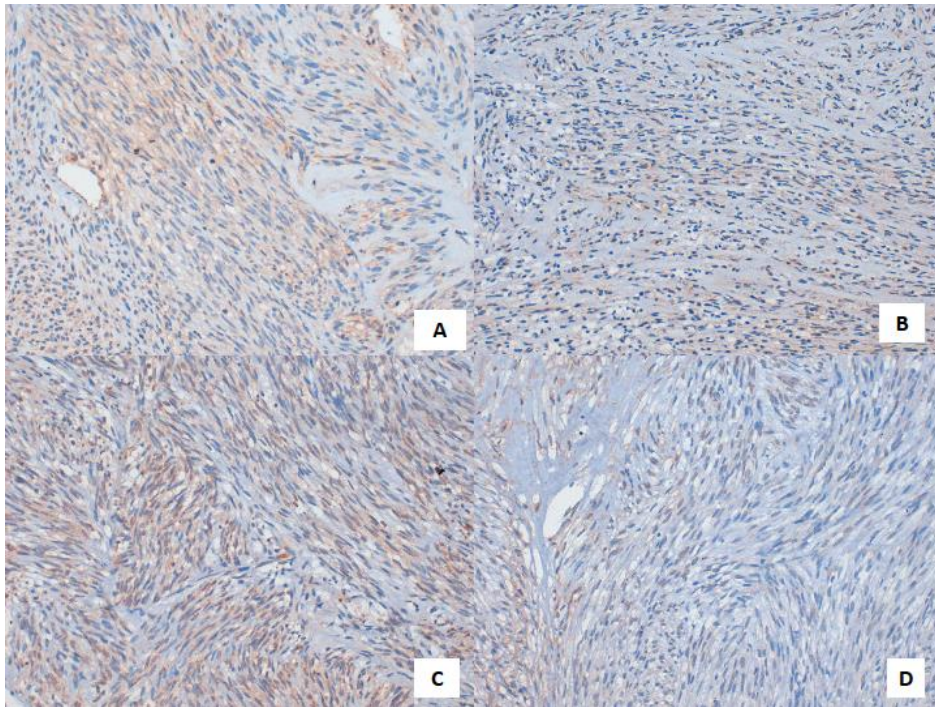


Figura 4.6.6. Expresión de GRO en los diferentes tiempos con inmunotinción de peroxidasa en el GIST. **A**, expresión moderada de GRO en el tumor control (200X). **B**, expresión débil de GRO a las 24h (200X). **C**, expresión moderada de GRO a las 48h (200X). **D**, expresión muy débil de GRO en la 4sem (200X).

4.6.2.1.5.-CXCR2

Expresión citoplasmática, intensa y homogénea en todos los tiempos. Ver figura 4.6.8.

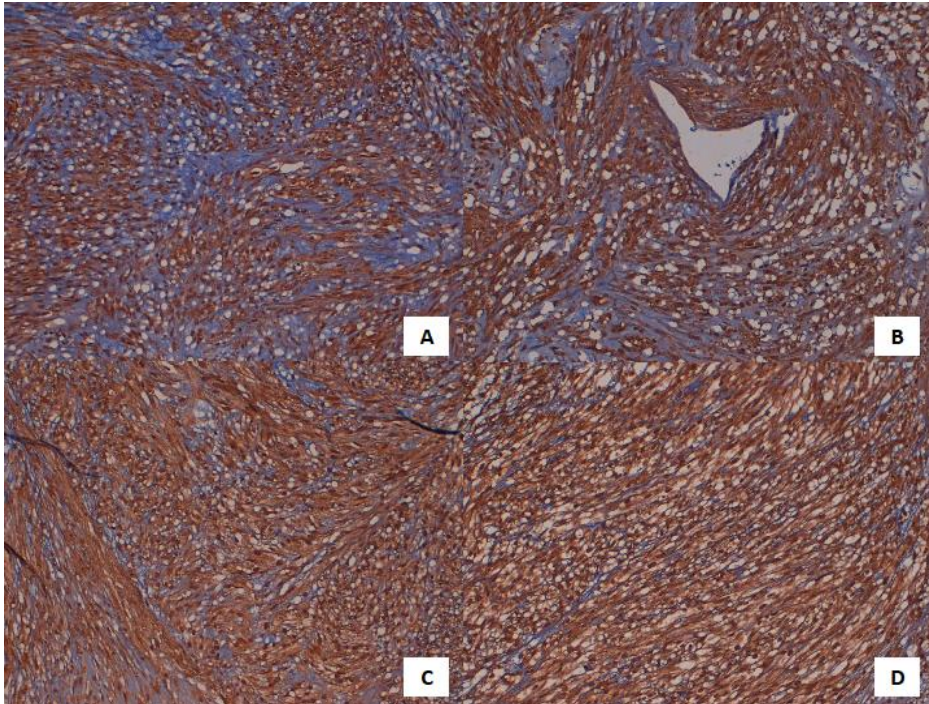


Figura 4.6.7. Expresión de CXCR2 en los diferentes tiempos con inmunotinción de peroxidasa en el GIST. **A, B, C y D** expresión intensa y homogénea de CXCR2 a las 48h, 96h 2sem y 4sem respectivamente (200X).

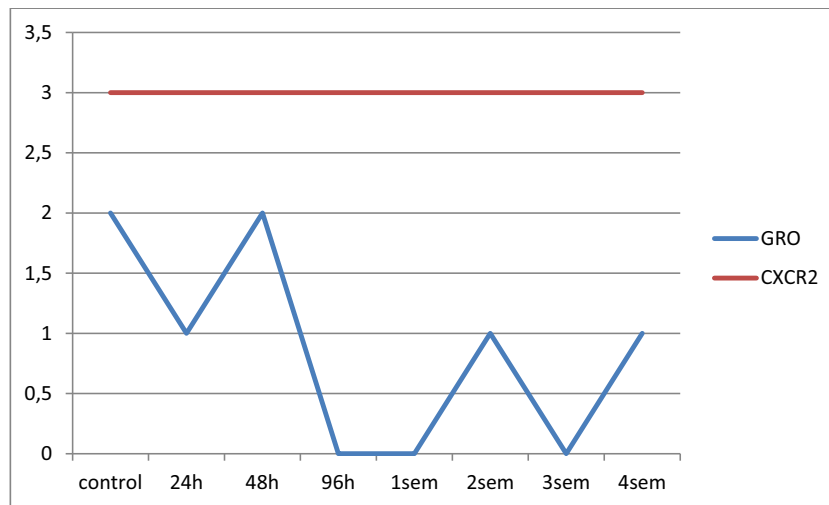


Figura 4.6.8. Gráfica de expresión de receptores de quimiocinas en los diferentes tiempos de GIST con peroxidasa. NV: GRO a las 3sem.

En **resumen** podemos destacar que en nuestra experiencia en el GIST con el estudio inmunohistoquímico con peroxidasa:

1. Los receptores muestran una expresión más mantenida y constitutiva, mientras que los ligandos muestran una expresión más fluctuante.
2. Los ligandos parecen mostrar un pico de expresión en las primeras 48h para descender posteriormente.
3. GRO presenta una intensidad de expresión menor que la de su receptor, lo contrario ocurre con el resto de quimiocinas que presentan una intensidad mayor que la de CXCR3. Este receptor presenta una expresión parcheada y heterogénea.
4. La expresión es en general citoplasmática intracelular, sólo en CXCL9 parece ser de manera puntual extracelular.

4.6.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

4.6.2.2.1.-CXCL9-VIMENTINA

La expresión de ligando es moderada y homogénea en todos los tiempos. Se observa en algunos tiempos expresión de ligando en el estroma peritumoral. Ver figura 4.6.9C. Por otro lado, la expresión de vimentina es intensa y homogénea en el citoplasma de todas las células tumorales.

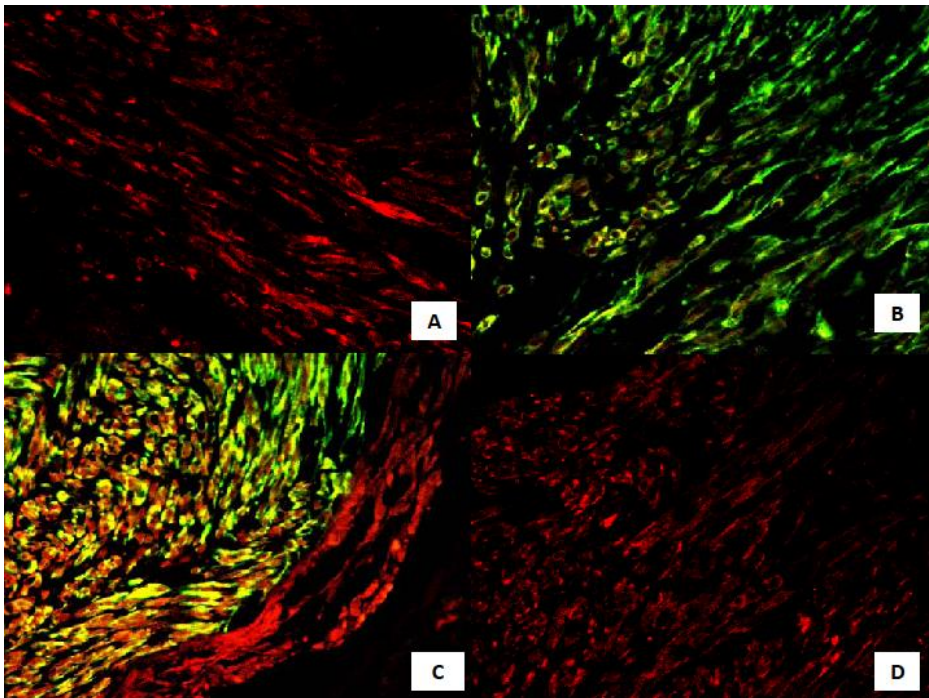


Figura 4.6.9. Expresión de CXCL9 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión moderada de CXCL9 (400X). **B**, expresión débil-moderada de CXCL9 a las 96h (400X). **C**, expresión intensa de CXCL9 a la 1sem con tinción citoplasmática y nuclear con expresión de quimiocina en el estroma peritumoral (400X). **D**, expresión moderada de CXCL9 a la 4sem (400X).

4.6.2.2.2.-CXCL10-VIMENTINA

Expresión moderada e intensa de las 48h a la primera semana del xenotrasplante. La positividad es homogénea en las células tumorales y en el estroma peritumoral con expresión nuclear y citoplasmática. Ver figura 4.6.10. La vimentina presenta una expresión citoplasmática, intensa y homogénea.

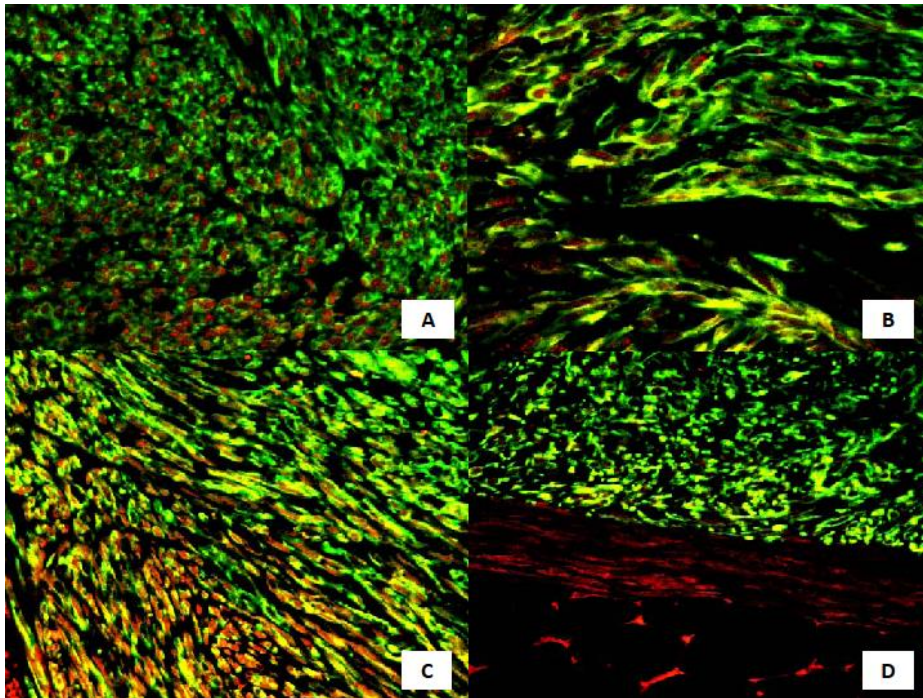


Figura 4.6.10. Expresión nuclear y citoplasmática de CXCL10 (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión intensa de CXCL10 en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de CXCL10 a las 24h (400X). **C**, expresión intensa de CXCL10 en la 1sem (400X). **D**, expresión moderada de CXCL10 en la 2sem con expresión en el estroma peritumoral (400X).

4.6.2.2.3.-GRO-VIMENTINA

Expresión moderada-intensa y homogénea de forma variable en todos los tiempos del GIST. En una de las imágenes parece evidenciarse una mayor expresión de ligando alrededor de un vaso sanguíneo tumoral (fig. 4.6.11C). La positividad es tanto citoplasmática como nuclear. Ver figura 4.6.11. Por otra parte, la vimentina presenta una expresión intensa y homogénea.

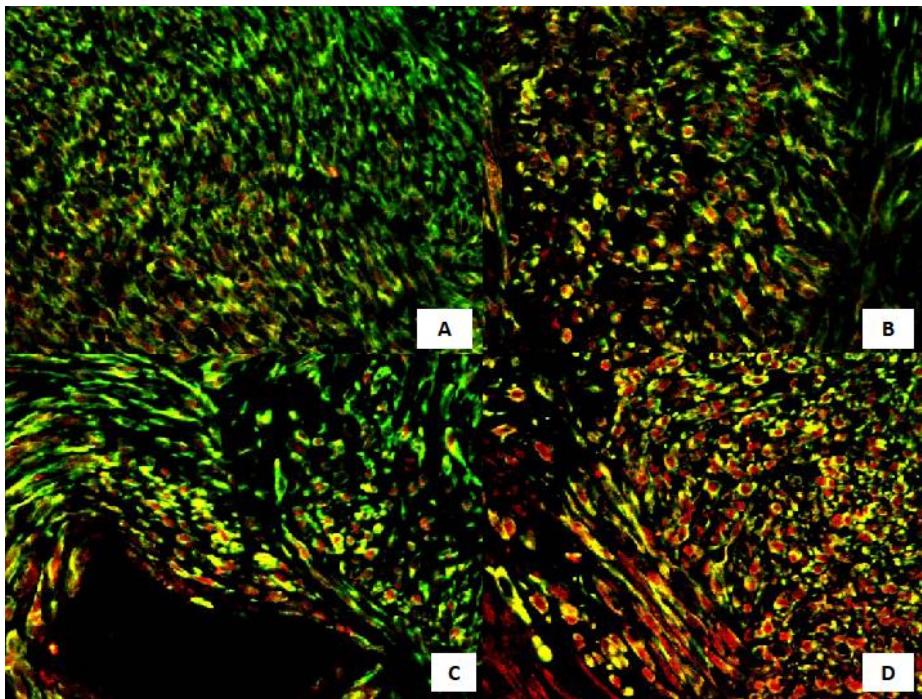


Figura 4.6.11. Expresión nuclear y citoplasmática de GRO (rojo) y vimentina (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión moderada de GRO a las 24h (400X). **B**, expresión intensa de GRO a las 48h (400X). **C**, expresión moderada de GRO a las 96h alrededor de un vaso (400X). **D**, expresión muy intensa de GRO a las 2sem con expresión del estroma peritumoral (400X).

4.6.2.2.4.-CXCL9-CXCR3

La expresión del ligando es débil, siendo más intensa entre la primera y tercera semanas. Por otro lado su receptor muestra una positividad más intensa desde las primeras 48h a la primera semana disminuyendo ligeramente después. Ver figura 4.6.14. La expresión de CXCL9 es nuclear y citoplasmática y la de su receptor es citoplasmática. Se observa positividad de CXCR3 en el estroma peritumoral (fig. 4.6.12A)

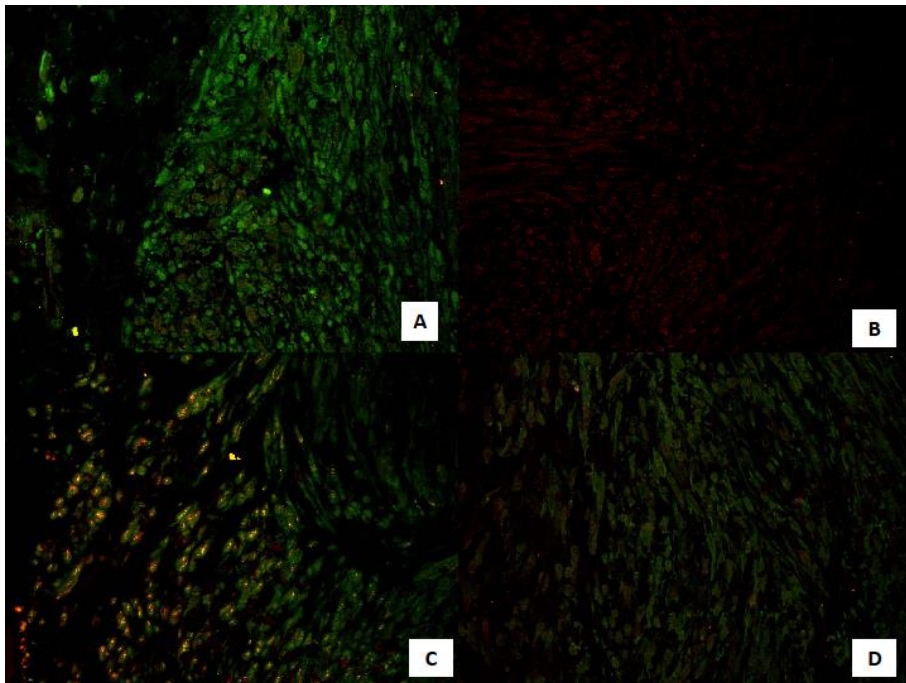


Figura 4.6.12. Expresión nuclear y citoplasmática de CXCL9 (rojo) y el receptor CXCR3 (verde) con expresión citoplasmática en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión débil de CXCL9 y moderada de receptor a las 48h en las células tumorales y en el estroma peritumoral (400X). **B**, expresión moderada de CXCL9 en la 1sem (400X). **C**, expresión intensa de ligando y moderada de receptor a las 3sem (400X). **D**, expresión débil de ligando y moderada de CXCR3 a las 4sem (400X).

4.6.2.2.5.-CXCL10-CXCR3

En la primera semana la expresión del ligando es más intensa que en el resto donde se mantiene débil y moderada. Parece que la expresión de la quimiocina es ligeramente más intensa a nivel perivascular a las 96h (fig.4.6.13B). Por otro lado el receptor muestra una expresión más intensa en las 96h y la primera semana, siendo moderada en el resto. Ver figura 4.6.14. La expresión del ligando es nuclear y la expresión de CXCR3 es citoplasmática (fig.4.6.13C).

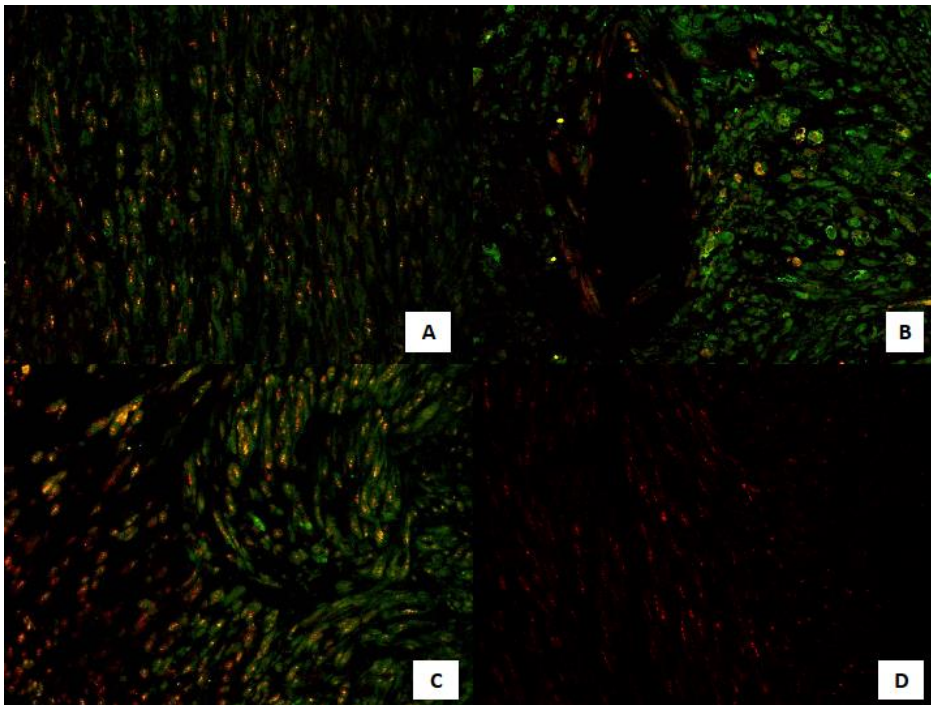


Figura 4.6.13. Expresión nuclear de CXCL10 (rojo) y citoplasmática del receptor CXCR3 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión moderada de CXCL10 y débil de CXCR3 a las 24h (400X). **B**, expresión moderada de CXCL10 e intensa del receptor a las 96h con mayor expresión perivascular (400X). **C**, expresión intensa de ligando y moderada de receptor a las 3sem (400X). **D**, expresión débil de ligando a las 4sem (400X).

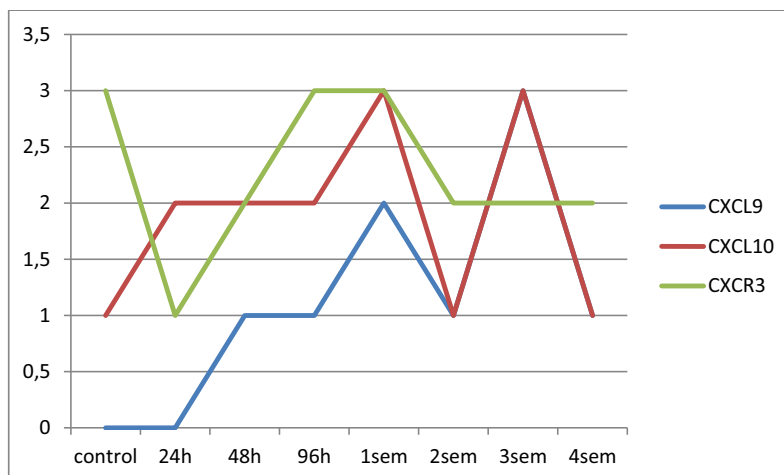


Figura 4.6.14. Gráfica de expresión de CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 en los diferentes tiempos en el GIST con IF indirecta.

4.6.2.2.6.-GRO-CXCR2

La expresión de GRO muestra un perfil irregular que va desde una fuerte positividad a una expresión débil. Los picos de máxima expresión ocurren a las 96h y a las 2sem. Por otro lado, el perfil de expresión del receptor CXCR2 es más intensa entre las dos primeras semanas reduciéndose posteriormente. Ver figura 4.6.16. La expresión de GRO es citoplasmática y nuclear, mientras que la de CXCR2 es citoplasmática (fig.4.6.15A).

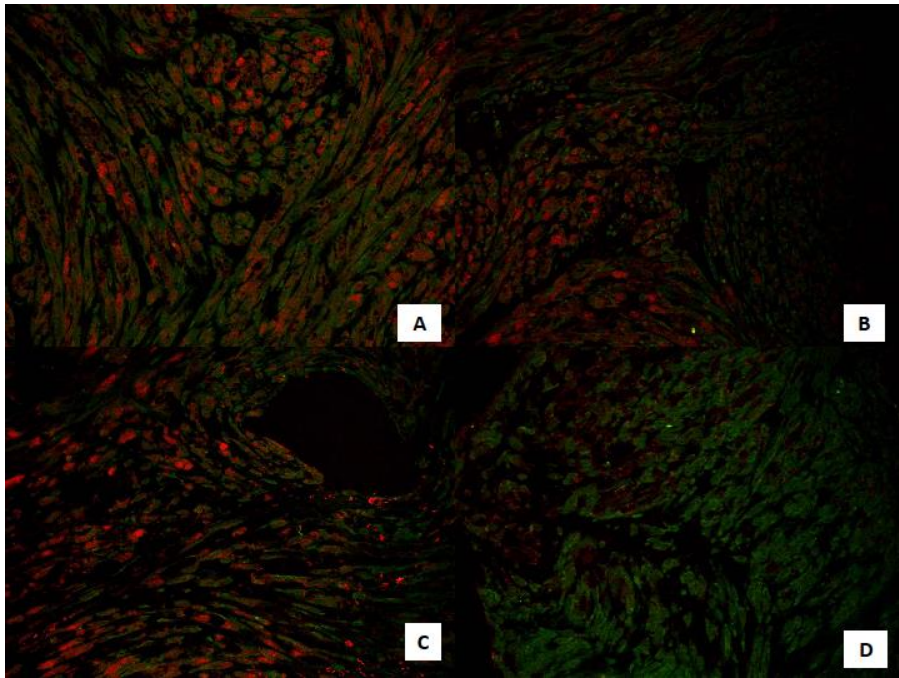


Figura 4.6.15. Expresión citoplasmática y nuclear de GRO (rojo) y citoplasmática del receptor CXCR2 (verde) en los diferentes tiempos con IF indirecta en el GIST. **A**, expresión intensa de GRO y moderada de CXCR2 en el tumor control (400X). **B**, expresión moderada de GRO y débil de CXCR2 a las 24h (400X). **C**, expresión intensa de GRO y moderada de receptor a las 96h (400X). **D**, expresión débil de ligando y moderada de receptor a las 3sem (400X).

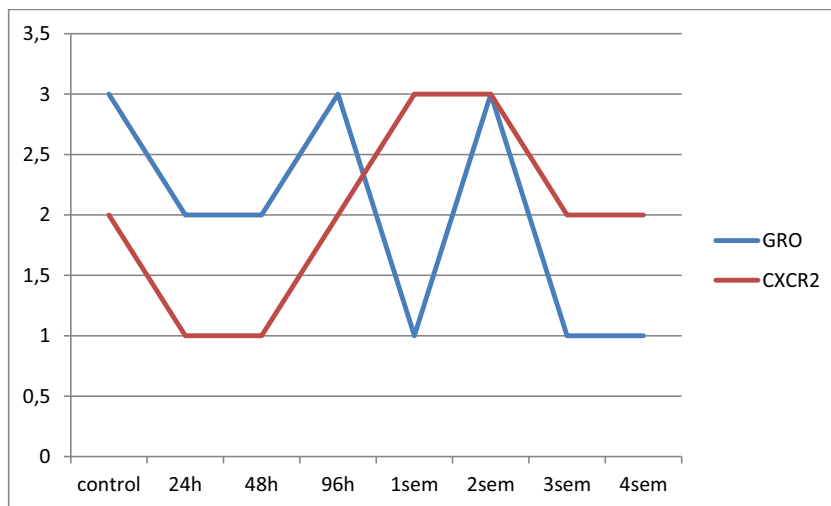


Figura 4.6.16. Gráfica de expresión de GRO y CXCR2 en los diferentes tiempos en el GIST con IF indirecta.

En resumen podemos destacar que en nuestra experiencia en el GIST con el estudio inmunohistoquímico :

1. Las quimiocinas CXCL9, CXCL10, GRO y sus receptores CXCR2 y CXCR3 son expresados por las células tumorales. CXCL9, CXCL10 y su receptor CXCR3 son expresados también por el estroma murino peritumoral (fig.4.6.10D), pero no de forma clara en el estroma tumoral o matriz extracelular como vemos en los condrosarcomas, SS y en el OS. En algunos casos se observa una expresión ligeramente más aumentada en el área perivascular de quimiocinas (fig. 4.6.11C y 4.6.13B).
2. Los ligandos muestran un pico de expresión que en IF es más tardío que en las técnicas de peroxidasa. En IF las quimiocinas presentan el pico de expresión entre las 96h y la segunda semana, mientras que en peroxidasa aparece a las 48h del xenoinjerto.
3. La concordancia entre la técnica de peroxidasa e IF es del 30% de los casos.
4. En líneas generales, la expresión de las quimiocinas en peroxidasa es más débil que en IF (37.5% de los casos), excepto como sucede en los casos anteriores, de CXCR2 donde la peroxidasa muestra una positividad mayor. La expresión de las quimiocinas es ligeramente inferior cuando se combina con su receptor en lugar de la vimentina como sucede en los casos anteriores.
5. La expresión de ligandos en peroxidasa es más citoplasmática que en IF donde es más nuclear.

4.6.2.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS.

En este apartado describiremos los perfiles de expresión inmunohistoquímicos con peroxidasa en los diferentes tiempos de importantes factores relacionados con la angiogénesis y el crecimiento vascular.

4.6.2.3.1. Índice proliferativo.

El índice proliferativo con Ki67 disminuye bruscamente desde las primeras 24h tras el xenotrasplante, manteniéndose bajo hasta las primeras dos semanas tras el xenoinjerto donde parece incrementarse moderadamente. Ver figura 4.6.17. Estos datos se correlacionan con los vistos en los cambios morfológicos (epígrafe 4.6.1).

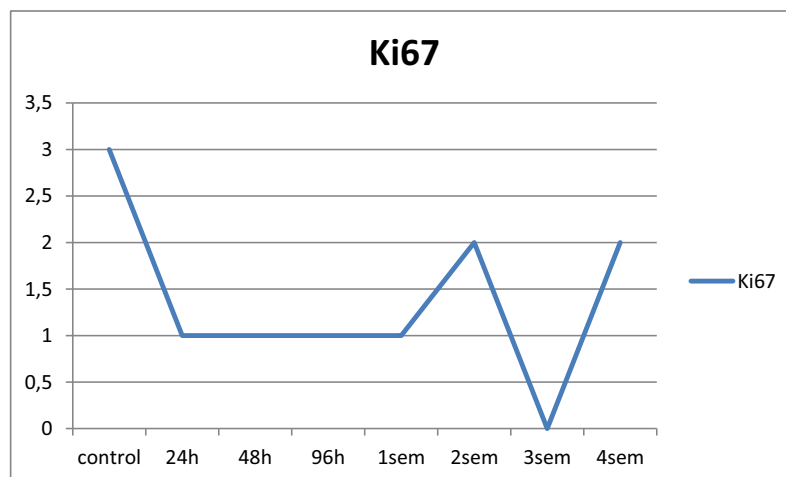


Figura 4.6.17. Gráfica de expresión con peroxidasa de Ki67 en los distintos tiempos en un GIST. NV: 3sem.

4.6.2.3.2. Factores angiogénicos.

La expresión de HIF1A como principal inductor de producción de VEGF, muestra una positividad elevada en las primeras 96h del xenoinjerto, decreciendo su expresión a partir de la primera semana. Ver figura 4.6.18.

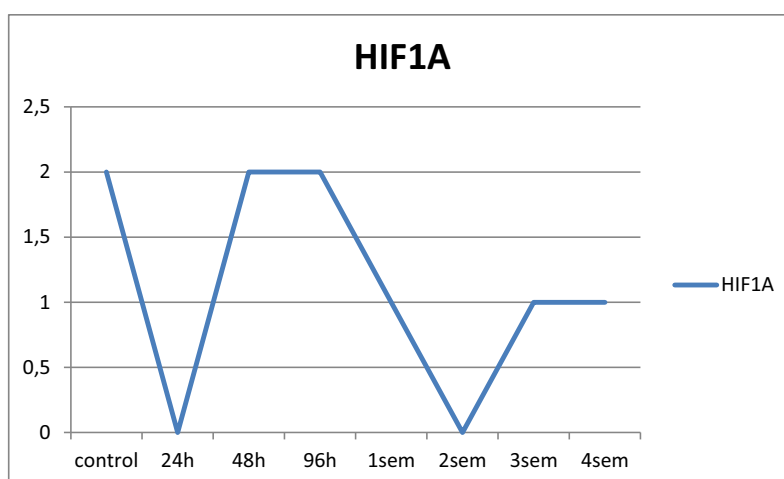


Figura 4.6.18. Gráfica de expresión con peroxidasa de HIF1A en los distintos tiempos en un GIST. NV: 24h ni 2sem.

VEGF se mantiene moderada en casi todos los tiempos disminuyendo discretamente en las últimas semanas de manera similar como sucedía en el HIF1A con el que comparte un mismo perfil de expresión. Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 tienen una positividad leve siendo más intensa la de VEGFR3. Ver figura 4.6.20. En general este es el perfil característico de todos los sarcomas estudiados, VEGF en todos ellos se encuentra elevado en las primeras horas del desarrollo tumoral al igual que HIF1A.

Por otro lado, PDGFRA y VE-CAD muestran una positividad leve en las primeras horas, descendiendo a nula en las primeras semanas. FGF2 presenta una expresión intensa de manera constitutiva en todos los tiempos. Ver figura 4.6.21.

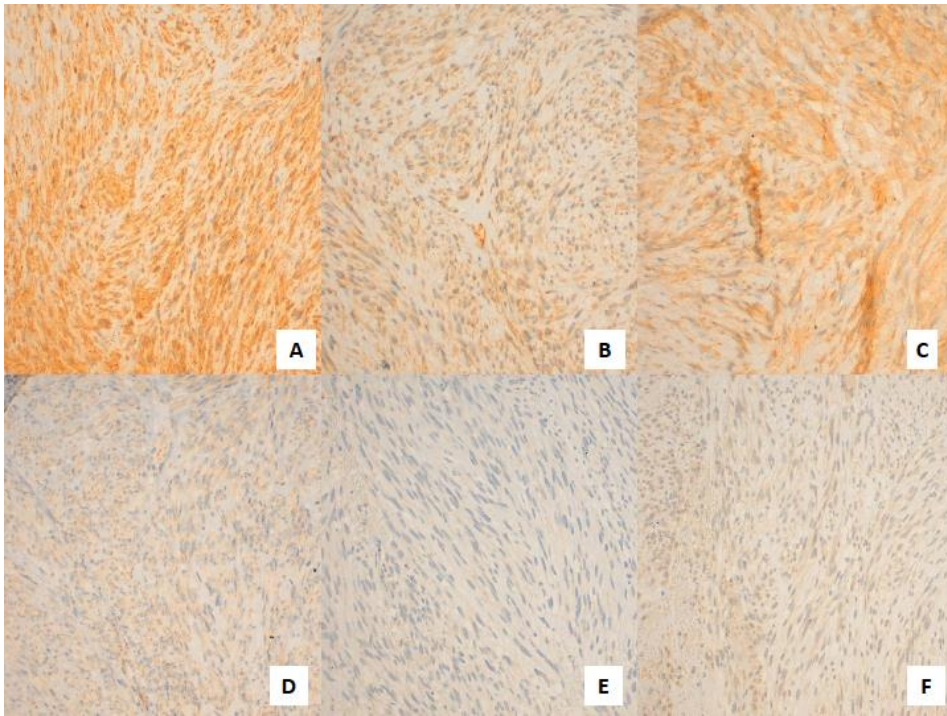


Figura 4.6.19. Expresión citoplasmática de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en los diferentes tiempos en el GIST con peroxidasa. **A, B, C y D**, expresión moderada de VEGF en las 96h, 1sem, 3sem y 4sem respectivamente (200X). **E**, expresión nula de VEGFR1 en la 1sem (200X). **F**, expresión débil de VEGFR2 en la 2sem (200X).

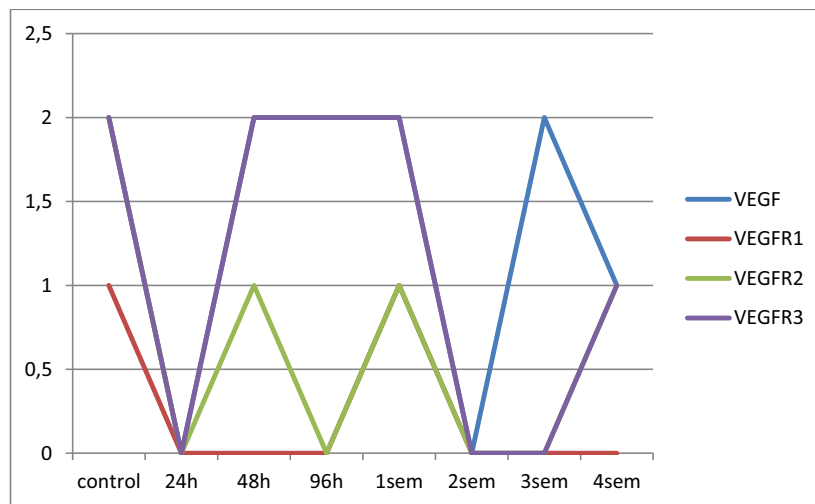


Figura 4.6.20. Gráfica de expresión con peroxidasa de distintos factores relacionados con la formación de vasos capilares VEGF y sus receptores en los distintos tiempos en un GIST. NV: 24h ni 2sem en todos los marcadores.

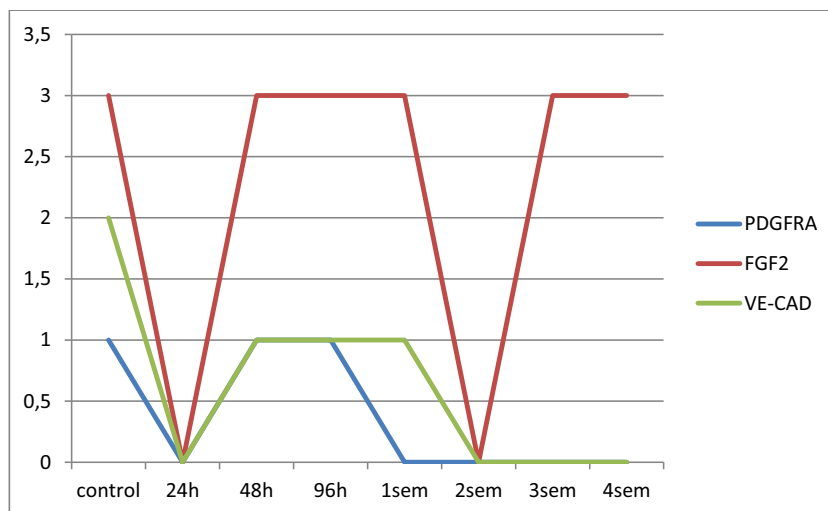


Figura 4.6.21. Gráfica de expresión con peroxidasa de PDGFRA, FGF2 y VE-CAD en los distintos tiempos en un GIST. NV: 24h ni 2sem en todos los marcadores.

4.6.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.6.3.1. Matrices de baja densidad qRT-PCR de los genes relacionados con la angiogénesis.

El análisis de expresión de ARN se realizó por medio de qRT-PCR usando una matriz de baja densidad en una tarjeta microfluidica como se indicó en Material y Métodos (epígrafe 3.4.5).

Los valores Ct de los genes se normalizaron entre las muestras con un valor medio entre el Ct de los genes constitutivos *S18* y *β 2-microglobulina*. Además, el nivel de expresión de cada gen fue normalizado en cada una de las muestras, con los valores normalizados para cada gen del tejido tumoral antes de la implantación (tumor control).

Los análisis de la matriz se llevaron a cabo utilizando el “Gene Expression Pattern Analysis Suite” v3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>).

En la figura 4.6.22 se muestra el árbol de matrices obtenido de las series aplicando una correlación de distancia y un coeficiente de correlación lineal. De este conglomerado se obtiene la siguiente información:

- 1- El perfil de expresión génica entre las primeras 24h y la primera semana es similar.
- 2- La mayoría de factores angiogénicos se encuentran sobreexpresados a las 96h del xenotransplante. Una sobreexpresión tardía en comparación con los sarcomas más agresivos de alto grado como ES, OS y el Ch grado 3.
- 3- Existe una buena correlación entre el perfil de expresión de *HIF1A* entre técnicas de IHQ y biología molecular (fig. 4.6.18 y 4.6.23).
- 4- Los factores angiostáticos y estabilizadores vasculares presentan un perfil de expresión similar a los factores pro-angiogénicos con mayor expresión a partir de las 96h del xenoinjerto (fig.4.6.24).
- 5- VEGFC es el factor de angiogénesis que se eleva más prematuramente (a las 24h), aunque su receptor eleva su expresión a las 96h (fig. 4.6.23).

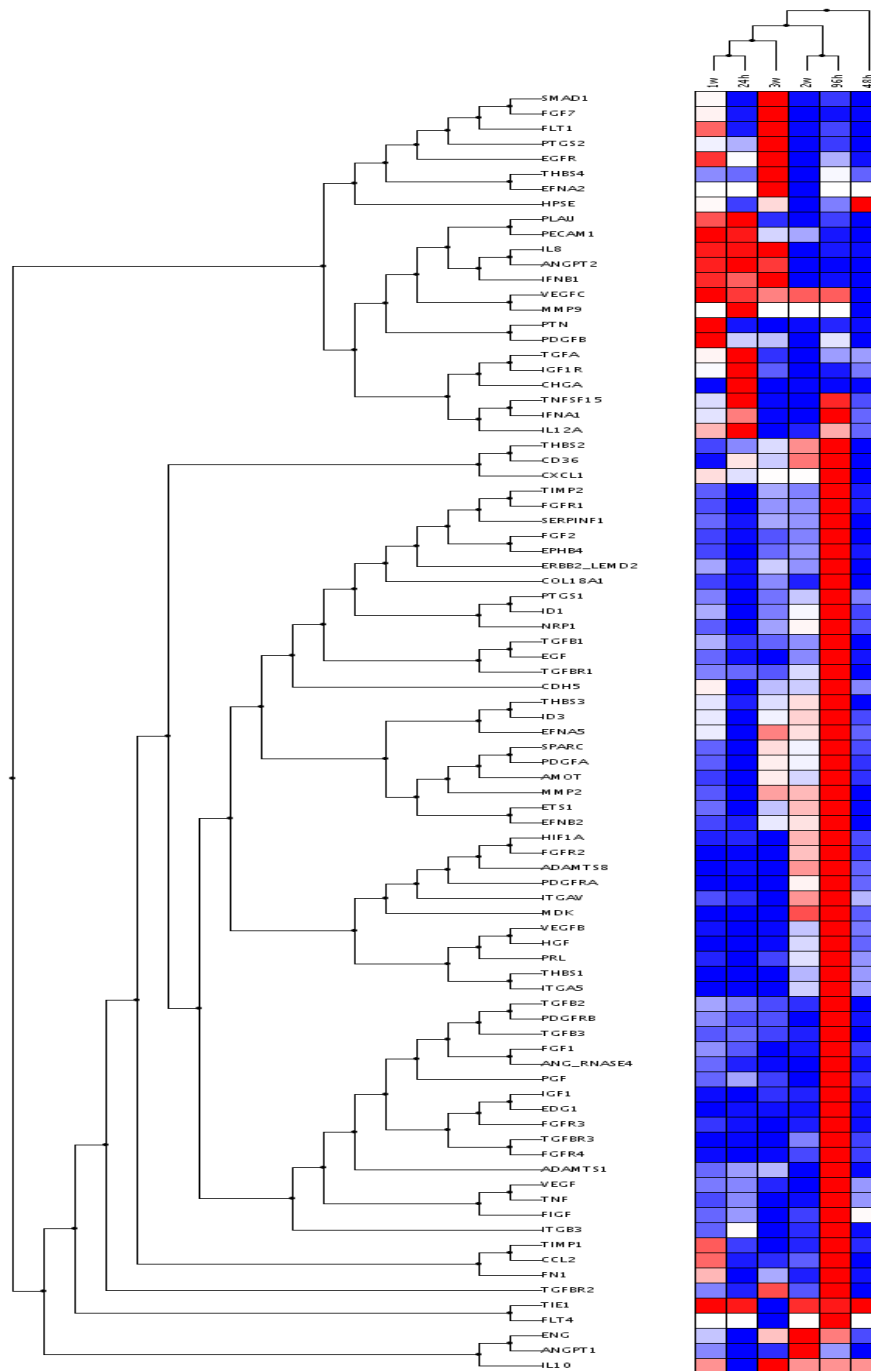
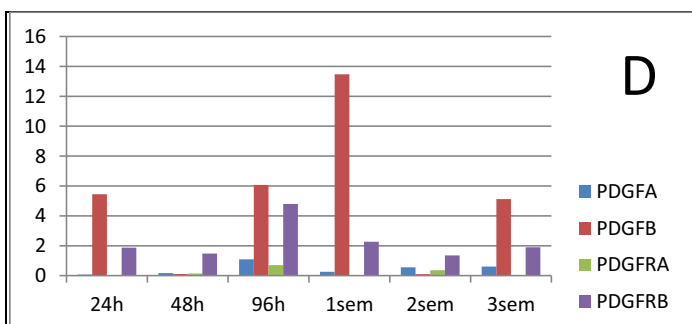
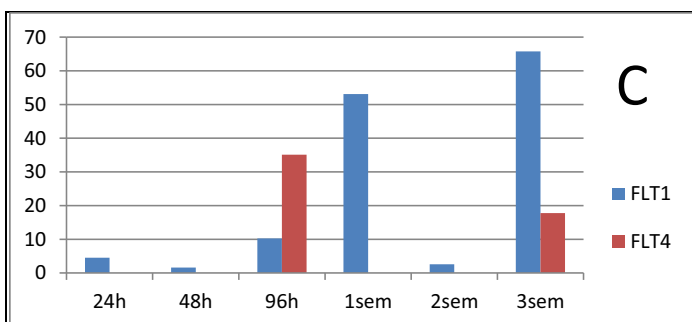
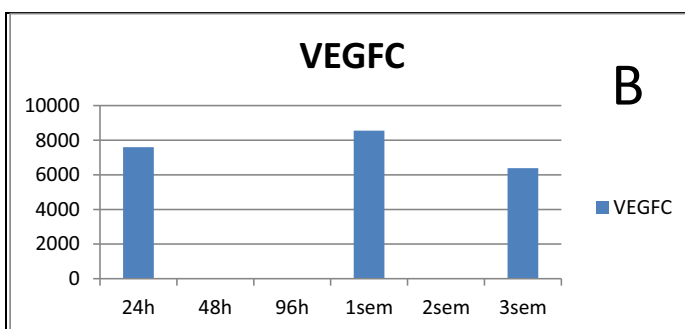
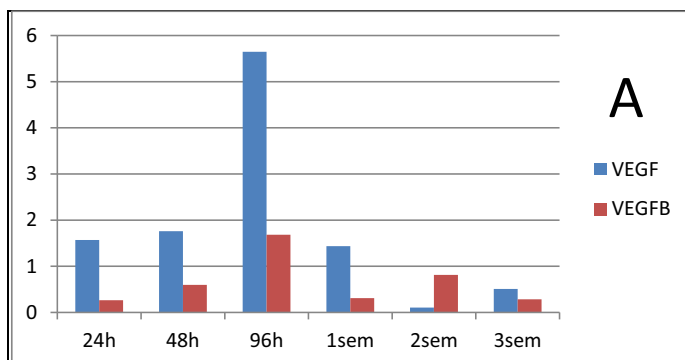


Figura 4.6.22. Análisis de conglomerados de qRT-PCR con los valores de los genes relacionados con la angiogénesis del GIST. 1, 24h; 2, 48h; 3, 96h; 4, 1sem; 5, 2sem; 6, 3sem. No se pudo evaluar la 4sem por mala calidad del ARN de las muestras obtenidas.



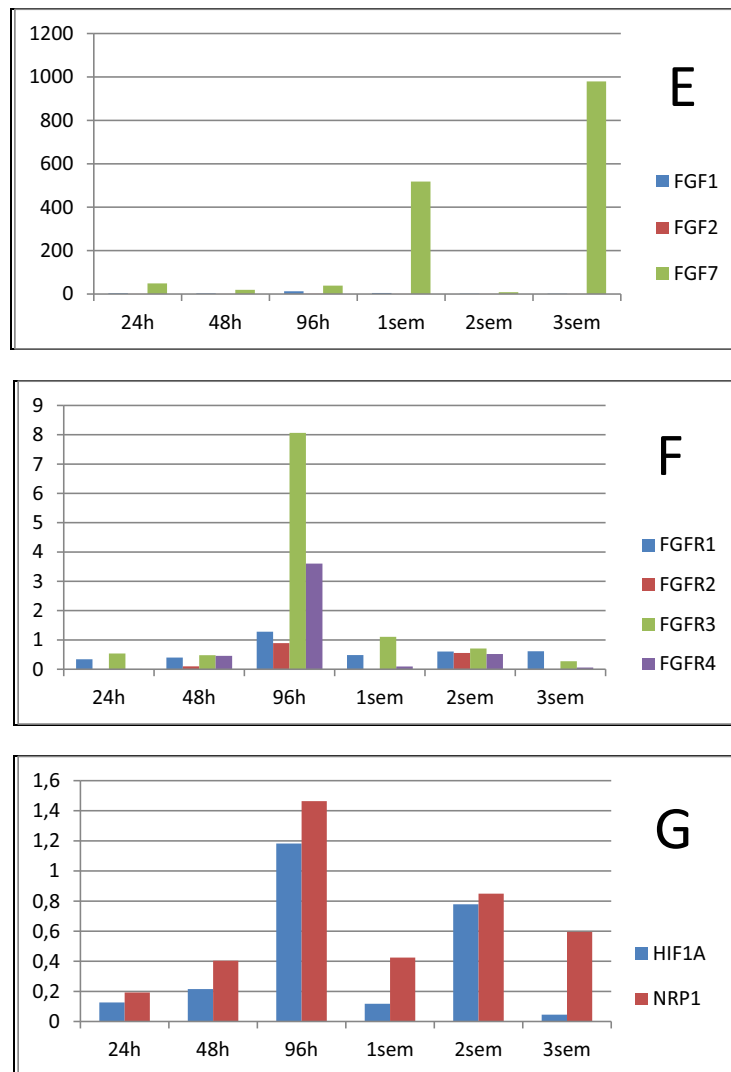


Figura 4.6.23. Histogramas de representación de los genes pro-angiogénicos sobreexpresados mayoritariamente a las 96h del xenotrasplante con sus receptores en el GIST. **A** y **B**. Expresión de la familia *VEGF*, presentando *VEGFC* una expresión mantenida, con una sobreexpresión de *VEGF* a las 96h; **C**. Expresión de los receptores de *VEGF* a partir de las 96h; **D**. Perfil de expresión de la familia *PDGF* y sus receptores; **E** y **F**. Perfil de expresión de la familia *FGF* y sus receptores; **G**. Perfil de expresión de los factores pro-angiogénicos *HIF1A* y *NRP1*.

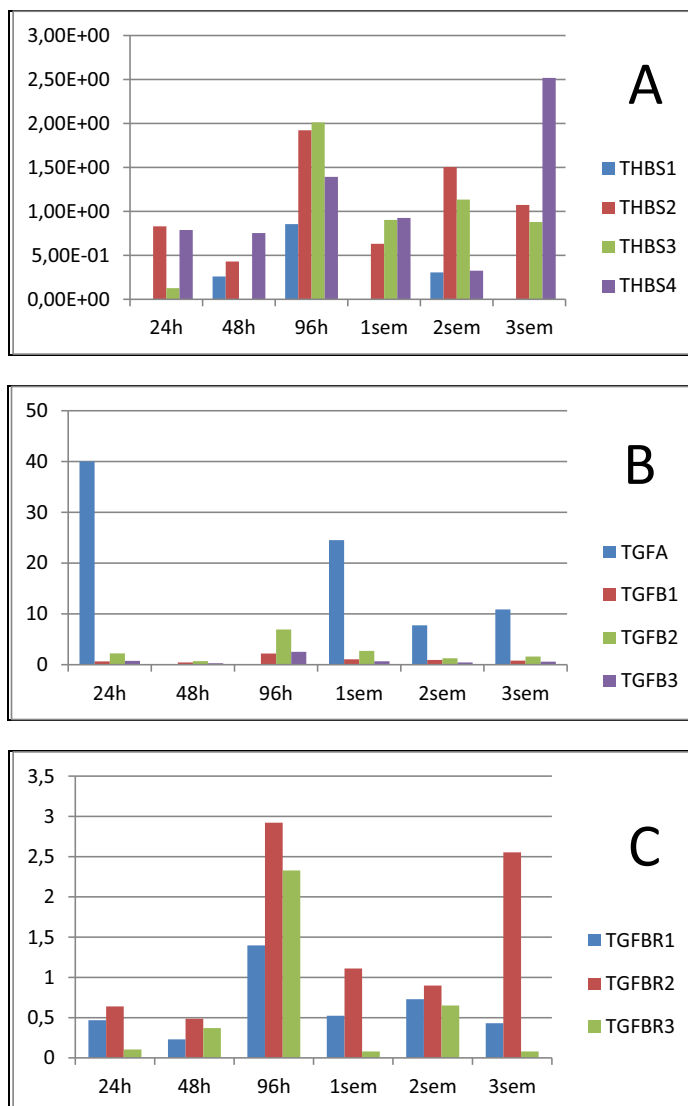


Figura 4.6.24. Histogramas de representación de los genes angiostáticos como *THBS* y factores estabilizadores vasculares como *TGF* y sus receptores en el GIST. **A.** Perfil de expresión de la familia *THBS*, mostrando una mayor sobreexpresión a partir de las 96h; **B** y **C.** Perfil de expresión de la familia *TGF* y sus receptores.

5. DISCUSIÓN

Los tumores óseos y de partes blandas son neoplasias de baja incidencia, la mayoría con comportamiento agresivo y de crecimiento rápido. Muchos de ellos aparecen en niños y adultos jóvenes y su pronóstico continua siendo pobre e infausto en la mayoría de casos ^{1,2}. La baja incidencia de estas neoplasias, unido a la alta heterogeneidad, hace difícil el estudio de grandes series de sarcomas lo que dificulta el planeamiento de tratamientos estándares con niveles de evidencia adecuados ⁵. En este sentido, los modelos animales de algunos tipos de sarcomas han constituido una alternativa muy útil en el estudio de la biología y de las alternativas terapéuticas de estas neoplasias.

En base a nuestra experiencia, los xenotrasplantes en ratones nude nos han proporcionado una herramienta interesante para el estudio de la progresión y evolución tumoral no solo en sarcomas humanos, sino también en otro tipo de neoplasias como melanoma o mama, porque ellos imitan en un modelo experimental *in vivo*, lo que podría suceder en el contexto del paciente. Es importante saber cómo son de parecidos los tumores xenoinjertados de los originales y cómo los genomas se mantienen tras los pases en el huésped xenobiótico. Incluso cuando una célula tumoral es representativa del tumor original, los patrones de expresión genéticos y señalización son bastante dinámicos y estarían fuertemente influenciados por el patrón de crecimiento, vascularización, interacciones y señalizaciones con las células del estroma del huésped, y las reducidas o nulas interacciones con el sistema inmune ^{238-242, 365}. No obstante, algunas propiedades pueden hacer que no representen los tumores originales, como el caso de las interacciones con el estroma del huésped así como con el nuevo sistema inmune del ratón. Además, el xenoinjerto se establece a partir de un pequeño fragmento del tumor resecado quirúrgicamente y puede que no sea siempre representativo de todo el tumor, en el cual la heterogeneidad en mayor o menor medida puede ocurrir ^{241, 366}. Por otra parte, los procesos de selección pueden diferir en el ratón huésped, y nuevas aberraciones genéticas pueden aparecer con los pases ³⁶⁵. A pesar de esto, sigue siendo un modelo que aporta valiosos datos en el estudio morfológico y biológico de los tumores humanos.

La angiogénesis tumoral ha sido estudiada por muchos grupos de trabajo tratando de hallar los factores moleculares que regulan este proceso y las posibles dianas terapéuticas que se pueden derivar para evitar el crecimiento y la expansión

tumoral. Este fenómeno se ha visto relacionado con la aparición, desarrollo, invasión y metástasis tumorales ⁷. Se han descrito diferentes modelos de formación vascular: brote de angiogénesis, vasculogénesis, intussusception, vessel co-option y vascular mimicry. Todos estos procesos están desencadenados por múltiples factores de estimulación angiogénicos ⁷. Algunos de estos factores como el HIF1 α , VEGF con sus receptores, FGF2, PDGFRA y PDGFRB los hemos estudiado inmunohistoquímicamente expresados en los diferentes tumores mesenquimales, presentando diferencias en los diferentes tiempos del xenoinjerto tumoral tras el implante.

En los últimos años, el papel del sistema inmune y los procesos inflamatorios también han sido objeto de numerosos estudios en algunos tumores ⁸⁻¹¹, pero no tanto en los tumores de partes blandas y hueso ^{12, 367}. Se ha visto más concretamente el papel que juegan los fenómenos inflamatorios a través de las quimiocinas que se expresan en el “microambiente tumoral” por las células inflamatorias y tumorales así como su implicación en el proceso de angiogénesis tumoral ^{12, 13, 367, 368}. Son muchas las quimiocinas que están implicadas en el crecimiento y desarrollo tumoral ³⁶⁸. En este trabajo, nos hemos centrado en la expresión tumoral y extratumoral de las quimiocinas CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10, así como de sus receptores CXCR2 y CXCR3. Estas moléculas se han visto implicadas en los procesos de angiogénesis, supervivencia, crecimiento, invasión y metástasis neoplásica entre otros ¹³.

En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de seis tipos de sarcomas de naturaleza histopatológica, inmunohistoquímica y molecular distinta: ES, OS, Chs grado 2 y 3, SS y GIST.

Según la clasificación molecular, los sarcomas pueden agruparse en dos grandes grupos: los sarcomas que tienen una alteración molecular específica y los que no la tienen ³⁶⁹. Estas alteraciones moleculares nos ayudan en el diagnóstico morfológico e inmunohistoquímico incluso en algunos casos pueden tener un valor pronóstico como en los casos de ES y SS ³⁶⁹. Además, estos estudios pueden servir para detectar enfermedad mínima residual en torrente circulatorio tras tratamiento ³⁷⁰ o representar auténticas dianas terapéuticas como es el caso del Gleevec® en el GIST ³⁷¹. Así pues, de los sarcomas que hemos estudiado el ES, el SS y el GIST pertenecerían al grupo de sarcomas con alteración genética característica. Por otro lado, los Chs grados 2 y 3 junto con el OS osteoblástico

formarían parte de los sarcomas que acumulan alteraciones cariotípicas sin una alteración molecular específica.

En el estudio de los cambios morfológicos, dividimos los sarcomas estudiados en dos grandes grupos. Un grupo de sarcomas de mayor grado y agresividad representados por ES, OS, Ch grado 3 y el SS. Otro grupo de sarcomas de menor grado o agresividad como son el Ch grado 2 y el GIST. Curiosamente aunque el SS supuestamente es un tumor agresivo y de alto grado en humanos, en nuestra experiencia de xenotrasplante en ratones nude tiene un comportamiento biológico más semejante a los sarcomas de menor grado como a continuación discutiremos.

Los tumores de mayor grado se caracterizan por presentar un índice proliferativo mayor que los sarcomas del grupo de menor grado, objetivado fundamentalmente por la expresión de Ki67. De forma particular, el ES es el sarcoma que presenta un mayor índice divisional de entre todos los sarcomas estudiados tanto por recuento mitótico (fig.4.1.1) como por la inmunotinción con Ki67 (fig.4.1.16). Otra de las características que definen este grupo de tumores es la abundante necrosis que se evidenció a las 48h postimplante en todos los sarcomas, debida fundamentalmente a la hipoxia inducida de las primeras fases del experimento. Por el contrario, en el grupo de sarcomas de menor grado (Ch grado 2, SS y GIST) la aparición de necrosis extensa aparece de manera más tardía, en la primera y tercera semana tras el implante, aunque nunca llega a formar el core de necrobiosis como el que aparece en el ES y en el OS (fig.4.1.1C y 4.2.1C). Estos dos tumores presentan cambios morfológicos similares con la presencia de un core central necrótico en las primeras 48h del xenotrasplante, y aunque el Ch grado 3 y el SS son de alto grado y presentan necrosis abundante, esta se presenta de manera parcheada (fig.4.5.1D). Del grupo de tumores más agresivos, el SS es el que muestra de manera significativa la necrosis masiva más tardía respecto a los sarcomas del mismo grupo. En general, la necrosis extensa que se instaura es central y parcheada, ya que esta zona es la menos perfundida, presentado un déficit de concentración de oxígeno mucho mayor. Esto ocurre en la mayoría de carcinomas y sarcomas que poseen un rápido crecimiento ². En nuestro estudio, es frecuente observar, sobre todo en las primeras fases de la

experiencia, un gradiente de células entrando en picnosis a medida que se alejan de la luz de un vaso sanguíneo (fig.4.1.1D).

Con respecto a la actividad divisional, se observa de forma común en todos los tumores un fenómeno que consiste en la correlación inversa que existe entre necrosis y mitosis en cada uno de los casos. De esta forma, cuanto mayor es la cantidad de necrosis menor es el número de mitosis y viceversa. Esto podría tener su explicación, en el hecho de que el tumor, puesto que detecta que no tiene el oxígeno necesario para sobrevivir ralentiza el ciclo celular manteniéndose y alargando la fase del ciclo celular G1. La activación del proceso divisional supone en la célula un extra de gasto energético consumiendo abundantes moléculas de ATP procedentes del ciclo de Krebs ³⁷². En general, a partir de las 96h se observa un incremento paulatino del número de mitosis a excepción del SS donde el mayor número de mitosis se observa a las 48h.

Otro hallazgo importante en nuestras experiencias es que el índice divisional con el Ki67 es inversamente proporcional a la expresión de HIF1 α , cuando el tumor se encuentra en hipoxia desciende el número de mitosis y por otro lado genera niveles elevados de HIF1 α para tratar de favorecer la angiogénesis de la forma más rápida. Es bien conocido, cómo la sobreexpresión de HIF1 α promueve la activación del proceso angiogénico y de la maquinaria de supervivencia de las células tumorales mediante más de 40 genes y proteínas entre las que se encuentran miembros de la familia de los transportadores de la glucosa, anhidrasa carbónica y diferentes oncogenes³⁷³. Se ha visto que la sobreexpresión de esta proteína implica un mal pronóstico en múltiples tumores sólidos ^{373, 374}.

Así mismo, las primeras fases del crecimiento se caracterizan por un abundante infiltrado inflamatorio polimorfonuclear que se observa de manera más prominente en el Ch grado 2, SS y GIST precisamente en los tumores que poseen un índice divisional más bajo y un fenómeno de necrosis establecido en fases más tardías. El infiltrado a partir de la primera semana pasa a ser linfoplasmacitario, este infiltrado inflamatorio es el responsable de reclutar angioblastos a través de las quimiocinas que favorecen la vasculogénesis y la remodelación vascular tumoral (fig.4.5.1B y 4.5.2B) ^{13, 368}.

Por otro lado, según el estudio inmunohistoquímico que aquí se ha realizado con peroxidasa e IF indirecta, los niveles de expresión de CXCL9, CXCL10 y GRO con sus receptores CXCR2 y CXCR3 presentan un perfil de expresión que varía de un tumor a otro y de una técnica a otra. En general los ligandos, a excepción del GRO, presentan una expresión más intensa con peroxidasa que con IF, posiblemente por la mayor sensibilidad de la peroxidasa o mayor especificidad de la IF indirecta, aunque puede ser simplemente un hallazgo incidental y aleatorio por los propios parámetros de visualización del microscopio confocal ³⁷⁵. De hecho, en dos de las experiencias (Ch grado 3 y GIST) la expresión de ligandos fue más intensa en IF que en peroxidasa. Pero si observamos cada tumor podemos apreciar un perfil de expresión que se repite en más de una ocasión. La expresión de los receptores se mantiene más o menos constante en todos los tiempos y tumores de una manera constitutiva. Además la expresión de ligandos suele ser inferior a la de los receptores generalmente en las tinciones en combinación de ambos, excepto con el GRO que en combinación con CXCR2 suele presentar en todos los tumores una expresión más intensa que las quimiocinas angiostáticas CXCL9 y CXCL10.

Otro fenómeno interesante que hemos observado tanto con peroxidasa como IF indirecta, es que las quimiocinas fisiológicamente deben encontrarse en el citoplasma y la membrana celular. No obstante, en los tumores estudiados la expresión de CXCL9 y GRO es citoplasmática y nuclear en muchos de los tumores mientras que CXCL10 presenta una tinción granular y nuclear. Hay poca experiencia de estos anticuerpos en tumores de hueso y partes blandas, sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura donde se refleja este fenómeno ¹². Este grupo de trabajo obtuvo en el ES en la inmunotinción con peroxidasa la misma tinción nuclear con el CXCL10 si bien la tinción de CXCL9 era citoplasmática. Posiblemente este fenómeno se trate de un artefacto del proceso en la recuperación antigénica puesto que en el tejido control amigdalario el CXCL10 es citoplasmático ¹².

En general la expresión de ligandos en todos los tumores es más oscilante respecto a sus receptores. La concordancia entre la IF y la peroxidada en general es de un 30% con un rango entre el 23% observado en SS y el 40% en ES. Esta concordancia tan baja, en general en todos los casos, es posible que sea debida por tratarse de dos técnicas IHQ diferentes con una sensibilidad y especificidad

diferente, así como un sistema de visualización especial en el caso de la IF indirecta que ha sido interpretada con un microscopio confocal en el que se ajustan múltiples parámetros ³⁷⁵. En nuestro trabajo hemos decidido basarnos fundamentalmente en los resultados de IF indirecta por observar una mejor concordancia con los resultados de biología molecular.

Según los perfiles de inmunexpresión observados en IF indirecta, podemos afirmar que en el grupo de los tumores más agresivos y con un elevado índice proliferativo (ES, Ch grado 3 y OS) suele haber dos picos de expresión de quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y GRO). En estos tumores se produce un primer pico de expresión en las primeras 24-48h para disminuir bruscamente y aumentar de nuevo entre la primera y segunda semana postimplante. El primer pico ocurre en el mayor momento de necrosis y cariorrexis por hipoxia que suele acompañarse de abundante infiltrado inflamatorio de predominio polimorfonuclear. Esto podría explicar el pico de expresión en las primeras fases (fase temprana) de crecimiento tumoral (primeras 96h) que denominamos fase de inducción angiogénica y que coincide con la fase de activación morfológica e inmunofenotípica del proceso angiogénico. El segundo pico se produce en las siguientes semanas (1-3 sem) del xenoinjerto, una fase en la que la necrosis tumoral empieza a descender y donde el número de mitosis se incrementa de forma paulatina. Esta segunda fase tardía la denominamos remodelación angiogénica e incluye la movilización de angioblastos de la médula ósea del ratón al tumor así como la estabilización vascular de los nuevos vasos al recubrirse por células periciticas ⁷.

Por otro lado, en el resto de tumores, menos agresivos, como el Ch grado 2, SS y GIST se produce un solo pico de expresión de quimiocinas y además aparece de forma más tardía que en los tumores anteriores, entre las 96h y primera semana tras el trasplante, para disminuir luego progresivamente. Tal vez en estos tumores el segundo pico se produzca después de la cuarta semana del xenoinjerto, haciendo imposible la detección en el estudio planteado; o bien, en estos tipos de tumores de crecimiento más limitado el proceso angiogénico, al producirse de forma más paulatina, no se distinguen esas dos fases que anteriormente se han citado. Recordemos que en estos tres tumores (Ch grado 2, SS y GIST) la necrosis masiva por hipoxia aparecía más tarde respecto del grupo

anterior (ES, OS y Ch grado 3). Posiblemente el pico de producción de quimiocinas vaya en concordancia con el estado de hipoxia celular tumoral y sea una señal de que el tumor necesita formar nuevos vasos capilares para poder oxigenarse y nutrirse en respuesta a la intensa hipoxia y necrosis en el caso de la expresión de la quimiocina angiogénica GRO. Como apuntábamos al principio de la discusión, el SS aunque en teoría es un tumor considerado agresivo y de alto grado en humanos, sufre unos cambios morfológicos e inmunofenotípicos en nuestras experiencias de xenotrasplante en ratones atímicos más agrupables al Ch grado 2 y el GIST. Estos tres sarcomas, además no sólo presentan el aumento de quimiocinas de manera más tardía sino también como veremos más adelante de los factores angiogénicos estudiados por qRT-PCR.

También, conviene reseñar que las quimiocinas estudiadas tienen efectos fisiológicos antagónicos. Por una parte, CXCL9 y CXCL10 pertenecen al grupo de quimiocinas ELR-, este grupo tienen un efecto inhibitor sobre la angiogénesis, es decir son citocinas angiostáticas³⁶⁸. Su efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral ha sido estudiado en numerosos modelos experimentales de numerosos tipos de tumores tanto *in vitro* como *in vivo*³⁶⁸. Además, su receptor CXCR3 presenta dos isoformas con funciones diferentes²²⁷: CXCR3A que recluta células mononucleares³⁷⁶, células dendríticas³⁷⁷, células natural killer, linfocitos CD4 y CD8^{12, 195}; y CXCR3B, que media la actividad angiostática de las células endoteliales²²⁷. CXCR3A parece promover la proliferación celular en algunos tumores como mama²³³. La expresión constitutiva de CXCR3 parece que juegue un papel crucial en el asentamiento de metástasis por células CXCR3 positivas hacia sitios y órganos donde las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 presentan altas concentraciones^{214, 378}. Pradelli et al³⁷⁸, observaron que la inhibición de la ruta CXCR3/quimiocinas disminuye el crecimiento metastático del OS en el pulmón de ratones nude y que las interacciones receptores/ligandos puede directamente activar los procesos de supervivencia, crecimiento e invasión de las células neoplásicas. Otro hallazgo de este grupo de trabajo fue que CXCR3 de las células neoplásicas presentó una expresión a la baja tras exposiciones a altas concentraciones de ligandos. Posiblemente como consecuencia de la internalización del receptor inducida por ligando³⁷⁹. Otros trabajos también han evidenciado este fenómeno en líneas celulares de melanoma³⁸⁰.

No obstante, en el caso de CXCL9 y CXCL10, que como hemos dicho son quimiocinas angiostáticas, esto resulta ser una paradoja, la explicación tal vez radicaría en la base de que la promoción de células Th1 y angiostasis por el receptor CXCR3 se encuentra en la característica reacción inmunitaria celular de los humanos frente al *Mycobacterium tuberculosis* produciendo la reacción típica granulomatosa con la necrosis caseificante³⁶⁸. Esto podría estar relacionado con la extensa necrosis tumoral por hipoxia de los sarcomas más agresivos, que presentan una necrosis masiva central parecida al caseum del granuloma tuberculoso. Posiblemente, en nuestro estudio, el complejo desequilibrio que se produce en las primeras fases hacia el predominio de los factores angiostáticos produzca este fenómeno como ocurre de forma patológica en la infección bacteriana anteriormente descrita. De todas formas el proceso no es muy sencillo, esta paradoja también la plantea el grupo de Pradelli et al³⁷⁸, donde al final de su trabajo se plantean la pregunta evidente de cómo es posible que inhibiendo la ruta CXCR3/ quimiocinas disminuyan la metástasis de OS en pulmón de ratones nude, si también han bloqueado el efecto de reclutamiento de células inflamatorias de este eje que supuestamente como se ha visto en algunos trabajos tienen un efecto beneficioso en el pronóstico tumoral¹². Sin embargo, se han observado células NK y leucocitos sin receptor CXCR3 en superficie y por tanto actúan de manera independiente a la presencia de ligandos³⁸¹. Además, por otro lado, CXCL9 bloquea la apoptosis celular³⁸².

Además, la función de CXCR3 es muy compleja y como ya hemos dicho parece jugar un papel relevante en el nicho metastásico y por tanto en la capacidad metastásica de los tumores^{235, 378}. De todas formas, son múltiples los factores y rutas metabólicas implicadas en el proceso de crecimiento tumoral, por ello, es complicado encontrar una única explicación al rol de estas quimiocinas angiostáticas en los tumores de hueso y partes blandas. Probablemente a lo largo del tiempo nuevas funciones de estas quimiocinas y nuevas interacciones con otras rutas de activación sean descubiertas y permitan explicar estos fenómenos paradójicos.

Por otro lado, en el perfil de expresión de GRO parece que predomine sobre las quimiocinas angiostáticas a partir de la primera semana de crecimiento tumoral, este fenómeno se observa sobre todo en el ES y en Ch grado 3. En el resto de sarcomas no se aprecia esta característica de forma tan significativa. El hecho de

que el GRO sea más intenso que su propio receptor en algunas ocasiones, a diferencia de lo que sucede con las otras quimiocinas angiostáticas, hace pensar que el ligando puede producirse como respuesta a la inminente necesidad de formación vascular en un momento crítico en la sobrevivencia y desarrollo tumoral. Otra explicación podría ser que este fenómeno sea debido a la internalización del receptor CXCR2 ante la fuerte estimulación y alta concentración de ligando ^{378, 379}.

Hay pocos trabajos publicados de este ligando en relación al efecto sobre tumores. Recientemente, Killian et al ³⁸³ han demostrado el efecto beneficioso de bloquear los ligandos CXCL1 y CXCL2 en el cáncer prostático inhibiendo la capacidad metastática.

CXCL1/2/3 (GRO) pertenece al grupo de quimiocinas ELR+ que tienen una actividad fundamentalmente angiogénica, promoviendo y activando células endoteliales para formar nuevos vasos a través del receptor CXCR2 que activa una cascada de señalización que promueve la proliferación, migración e inhibición de la apoptosis ³⁶⁸.

La expresión de quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y GRO) y sus receptores (CXCR3 y CXCR2) no han sido muy estudiados en los tumores de partes blandas y hueso, con pocos estudios en la literatura ^{12, 378}. Como vimos en la IF indirecta, las células neoplásicas de los sarcomas coexpresan tanto ligandos como receptores de quimiocinas en mayor y/o menor intensidad en los diferentes tiempos tumorales así como en las células del estroma peritumoral. Además en los tumores con abundante matriz extracelular como son el OS y los Chs, se observa de forma más evidente quimiocinas y receptores en dicha matriz tumoral. De esta forma se produce una activación de estímulos autocrinos y paracrinos intratumorales ³⁶⁷. La expresión de los ligandos es ligeramente más intensa en las áreas del tumor periestromales y perinecróticas pero sobretodo en el área periestromal. Este fenómeno se observa de manera más llamativa en el ES. Esta estimulación autocrina y paracrina también se observa en relación con la expresión de VEGF y sus receptores. Las propias células tumorales son capaces de producir y sintetizar tanto factores de proliferación e inhibición vasculares como los propios receptores de estos. Se ha observado una estrecha relación entre VEGF y GRO que recluta neutrófilos liberando abundantes factores angiogénicos

CXCL9 y CXCL10 reclutan del estroma y del microambiente tumoral células inflamatorias y en especial de linfocitos T CD8+ que tienen en su membrana el receptor CXCR3 ¹². Berghuis et al ¹², demostraron correlación entre los niveles de expresión de quimiocinas CXCL9 y CXCL10 en el microambiente tumoral con el número de infiltrado linfocitario en el ES. Este infiltrado inflamatorio por linfocitos T CD8+ se ha visto además, que tiene un efecto beneficioso ya que implica la capacidad de adaptación a la inmunidad antitumoral en su interacción con la inmunidad del huésped en el ES ¹². Algunos estudios preclínicos han aportado pruebas de que las células del ES pueden ser diana de linfocitos T y células NK ³⁸⁴. Además, la temprana recuperación del infiltrado linfocitario T tras la quimioterapia se ha visto que es un indicador de buen pronóstico ³⁸⁵. El infiltrado inflamatorio T está siendo objeto de estudio en otros tumores como el melanoma donde también se ha visto que tiene un efecto beneficioso en el pronóstico ³⁸⁶. En otros estudios, se ha observado la relación que existe entre los niveles séricos de CXCL9 y el nivel de fibrosis hepática en ratones y humanos, donde CXCL9/CXCR3 tiene un efecto antifibrótico ³⁸⁷.

Debemos decir también que, los estudios de perfiles de expresión inmunohistoquímica en nuestros sarcomas se encuentra limitado por el número de casos que no pudieron ser valorados en algunos de los tiempos de la experiencia por ausencia de tumor, bien por agotamiento de material como por pérdida del mismo en el proceso técnico de tinción IHQ. Además, sólo hemos estudiado un caso de cada tipo tumoral, deberíamos en un futuro intentar repetir las experiencias con los mismos tumores para intentar esclarecer los perfiles de expresión inmunofenotípicos.

Las dos fases (inducción y remodelación) de la angiogénesis que ya hemos comentado anteriormente se observan claramente en los estudios tanto inmunohistoquímicos como de biología molecular de la expresión de VEGF, tanto en tejido como en suero, de los sarcomas estudiados. En el estudio IHQ del ES, Ch grado 3 y del OS parece que el pico de VEGF se produce unas horas antes que en el resto de sarcomas. Curiosamente estos tres sarcomas los agrupamos anteriormente en un mismo grupo puesto que tienen una agresividad mayor que el resto. Además, los picos detectados en sangre de ratón de VEGF (VEGF murino) por ELISA parecen observarse con unas horas de retraso respecto a la

detección IHQ de VEGF en el tumor, sobre todo esto se observa en dos tumores, en el ES y el Ch grado 3, lo que parece correlacionarse con una movilización de las células angioblásticas de la médula ósea. En general, suele existir en cada tumor una buena correlación entre la IHQ y la detección de los factores angiogénicos por biología molecular.

En todos los sarcomas, podemos agrupar a las moléculas que se expresan en la fase temprana del crecimiento y las moléculas angiogénicas que se expresan en la fase tardía o de remodelación angiogénica. Sobre todo, observamos que los sarcomas más agresivos presentan una expresión más temprana de estos factores angiogénicos.

Los factores que se expresan en la fase temprana suelen ser: VEGF, HIF1A, PDGFA, PDGFB, FGF2 y los receptores VEGFR1/2/3. Aunque hemos observado que los receptores suelen aumentar unas horas después de la expresión de su ligando como ocurre nuevamente de manera más evidente en el ES y Ch grado 3. Además hay factores y receptores (VEGF, y los receptores VEGFR1/2/3) que producen un pico de expresión en la fase tardía también, como observamos en el ES y el OS (fig.4.1.18 y 4.2.19). Podemos decir que esta molécula participa de forma activa en las dos fases de la angiogénesis adquiriendo una importancia capital en las fases de inducción y remodelación ⁷, en algunos estudios en OS se ha observado que los niveles séricos de VEGF en sangre de pacientes tiene valor pronóstico ³⁸⁸.

A su vez, VEGF es un factor sintetizado por los neutrófilos estimulados por la activación de CXCR2 a través de GRO ²¹⁶.

Como hemos comentado, VEGF es necesaria para la formación de nuevos vasos, seleccionando las células endoteliales "tip" a partir de las cuales surgirán las nuevas ramas vasculares, este proceso está controlado básicamente por el receptor VEGFR2 ⁷. Este receptor sería crucial en la primera fase de la angiogénesis (fase de inducción). Por otra parte, los angioblastos procedentes de la médula ósea poseen el receptor VEGFR1 en su superficie y se ha relacionado con los procesos de metástasis y nicho tumoral en los diferentes órganos ³⁸⁹. Este receptor (VEGFR1) podría jugar un papel relevante en la fase tardía de la angiogénesis (fase de remodelación) ya que en esta fase los angioblastos

penetran en el tumor procedentes de la médula ósea murina y participan de forma clave en la consolidación vascular.

Todo ello explicaría que VEGF se mantenga alto en las dos fases de la angiogénesis jugando un papel crucial en el crecimiento y en el microambiente tumoral en las primeras fases del desarrollo neoplásico. En algunos sarcomas vimos una infiltración prominente de neutrófilos en las primeras fases del crecimiento que podría explicar el primer pico de VEGF en la fase de inducción angiogénica.

Por otro lado, HIF es un factor de transcripción involucrado en la adaptación celular a la hipoxia. La actividad transcripcional de HIF está regulada por la presencia más o menos de oxígeno y se activa en condiciones bajas de oxígeno³⁹⁰. HIF1A se ha observado sobreexpresado en tumores observándose una correlación positiva con angiogénesis, agresividad, metástasis y resistencia a radio y quimioterapia. Además presenta una correlación negativa con la progresión, supervivencia y pronóstico^{373, 391}.

En nuestros sarcomas, el HIF1A presenta un perfil de expresión característico en cada uno de los tumores, sin embargo hay algo común en todos ellos, y es que el pico de expresión es más alto en la primera fase del desarrollo (24-96h) que es precisamente cuando los niveles de oxígeno en los tumores xenotrasplantados es más bajo.

En prácticamente todos los tumores, a partir de la primera semana, HIF1A tiende a descender los niveles de expresión. Sólo en el SS se mantiene elevado en la primera empezando el descenso a partir de la tercera semana, de forma más tardía que el resto de sarcomas. Recordemos que en este tumor también la necrosis y las quimiocinas tardaban unas horas más en aparecer y producir los picos de expresión.

También, cabe reseñar que como dijimos anteriormente los niveles de expresión de HIF1A presentan unos niveles de expresión inversamente proporcionales a la gráfica de expresión de Ki67. Es precisamente en los momentos de mayor hipoxia donde se expresa en mayor cantidad HIF1A reduciéndose de manera significativa la proliferación celular neoplásica como explicamos anteriormente (fig.4.3.17, 4.3.18, 4.4.17 y 4.4.18).

El estudio de expresión de HIF1A por qRT-PCR muestra claramente en los tumores más agresivos (ES, OS y Ch grado 3) una sobreexpresión más temprana que aparece ya en las primeras 24h del xenotransplante, sin embargo en los tumores menos agresivos esta sobreexpresión aparece no antes de las 96h.

En general, los perfiles de expresión IHQ de HIF1A, en los tumores donde se pudo realizar, no se correlacionan exactamente con los perfiles de expresión génica con biología molecular. Los dos tumores que muestran una correlación mayor entre estas dos técnicas son el Ch grado 3 y el GIST.

La familia de PDGF es necesaria para la maduración correcta de los vasos sanguíneos neoformados que deben ser recubiertos por células murales (pericitos) para proporcionarles estabilidad²⁶⁹. PDGF-B atrae por quimiotaxis a los pericitos que poseen en superficie su receptor (PDGFR-B)³⁹². La deficiencia de PDGF-B produce debilidad vascular, tortuosidad, formaciones aneurismáticas y sangrado³⁹³. Todo ello significa que la familia PDGF juega un papel relevante en la fase de remodelación y estabilidad angiogénica.

En nuestros sarcomas la expresión de los receptores PDGFRA en inmunohistoquímica mostraron una positividad muy variable.

En general en el grupo de sarcomas de alto grado la expresión es intensa, apareciendo el pico de expresión a las 48h y manteniéndose de manera constitutiva con niveles elevados en el resto de tiempos. Los dos sarcomas que muestran unos perfiles de expresión menos elevados son el SS y el GIST, dos tumores que tienen un índice divisional no muy elevado, con lo que puede ser un marcador de agresividad tumoral como lo son casi todos los factores relacionados con el proceso de angiogénesis.

En los sarcomas el estudio por biología molecular de la expresión génica por RT-PCR de ligandos y receptores de la familia *PDGF*, observamos que en los tres sarcomas más agresivos (ES, OS y Ch grado 3) se produce la sobreexpresión en las primeras 24h, mientras que en el resto de sarcomas dicho pico de sobreexpresión aparece a partir de las 48h. En resumen, como en el resto de factores angiogénicos, podemos decir que la expresión de la familia PDGF es más precoz en los sarcomas de alto grado o índice divisional con respecto a los sarcomas menos agresivos, pudiendo tener dichos resultados cierto valor en el estudio pronóstico de estos tumores (fig.4.2.23 y 4.4.24).

La familia FGF y sus receptores controlan un amplio espectro de funciones biológicas ³⁹⁴. Se necesitan niveles bajos de FGF para mantener la integridad vascular, ya que la inhibición de FGFR en células endoteliales quiescentes causa desintegración de la estructura vascular ³⁹⁵. Además la estimulación aberrante de la señal FGF promueve la angiogénesis tumoral y proporciona una ruta de escape en la vascularización de tumores tratados con inhibidores de VEGF y EGFR ³⁹⁶. En los sarcomas, la expresión IHQ de FGF2 fue intensa en todos los tiempos y sólo en el SS presentó unos perfiles diferentes (fig.4.5.20). En los sarcomas la detección de la expresión por qRT-PCR de esta familia de factores al igual que en los anteriores mostró un perfil de expresión más prematuro en los sarcomas con un mayor índice mitótico con respecto a los tumores estudiados de menor grado o con un comportamiento menos agresivo.

VE-cadherina, es una molécula de unión entre las células endoteliales, promueve la estabilización vascular inhibiendo la señal de VEGFR2 mientras a su vez, activa la ruta *TGFR* ⁷. En el brote vascular la función adhesiva de VE-cadherina se reduce en respuesta a VEGF y otros factores angiogénicos ³⁹⁷. Al mismo tiempo, la localización de VE-cadherina en los filopodios permite a las células tip establecer nuevos contactos con las células en contacto directo con los brotes ⁷. La expresión de VE-cadherina en los sarcomas estudiados es heterogénea. En el ES la expresión es intensa en todos los tiempos, mientras que en el SS y Ch grado 2 es prácticamente nula. En el Ch grado 3 y en el GIST es más positiva en el tumor establecido (tumor control), mientras que en el OS presenta una expresión más acentuada en la dos primeras semanas postrasplante. Por consiguiente, podemos decir que los tumores con mayor índice proliferativo y una mayor agresividad, presentan una expresión de VE-cadherina más elevada en respuesta posiblemente a la actividad angiogénica y neovascular que se desarrolla. De hecho, el sarcoma que presenta una intensidad mayor corresponde al ES, que presenta el índice proliferativo más elevado de todos.

Por otro lado, podemos decir que los genes más expresados en la fase de remodelación angiogénica tardía como se muestra en las figuras de biología molecular de los sarcomas son: *THBS1*, *THBS2*, *MDK*, la familia *TGF* junto a

elementos de la matriz condral involucrados en la consolidación de estructuras vasculares como observamos en los conglomerados de los resultados.

THBS es un potente inhibidor de la angiogénesis, suele elevarse en la fase de remodelación angiogénica, a partir de las 96h y sólo en el Ch grado 2 muestra una expresión más prematura a las 48h. Mientras, *TGF* y sus receptores son factores más relacionados con fenómenos de maduración y estabilización vascular⁷.

En resumen, podemos decir que los sarcomas estudiados se pueden agrupar en dos grandes grupos: un grupo de sarcomas más agresivo (ES, Ch grado 3 y OS) y otro grupo de sarcomas de perfil de menor agresividad (Ch grado 2, SS y GIST) con un índice divisional más bajo que el primer grupo. Este marcado índice proliferativo se correlaciona con unos cambios morfológicos e inmunohistoquímicos y con un perfil de expresión de factores angiogénicos y quimiocinas en los diferentes tiempos. En general, el grupo de tumores de alto grado presentan un pico de expresión de quimiocinas y factores pro-angiogénicos más prematuro que el otro grupo de sarcomas tanto con técnicas IHQ como de biología molecular. Este hallazgo hay que correlacionarlo con los cambios morfológicos que sufre el implante tumoral en las primeras fases del desarrollo ya que, el grupo más agresivo presenta amplias áreas de necrosis que aparecen también de manera más precoz como hemos descrito en el estudio morfológico. Es posible que estos factores angiogénicos puedan ser útiles para determinar un mejor o peor pronóstico en función del perfil de expresión tanto IHQ como por técnicas de biología molecular. Dicho de otra forma, puede que estos marcadores sean una herramienta útil como marcadores pronósticos de tumores óseos y de partes blandas según el perfil de expresión o sobreexpresión génica y/o proteica^{12, 45, 398, 399} como se ha observado en otros tumores tales como mama, riñón^{399, 400} y melanoma^{401, 402}.

Por otro lado, la expresión de factores anti-angiogénicos como *THBS* y estabilizadores vasculares presenta una sobreexpresión en general más tardía que el resto de factores.

Además, curiosamente el SS que es un tumor muy agresivo en humanos, hemos observado que en nuestras experiencias realizadas en ratones nude muestra

unos cambios morfológicos y unos perfiles de expresión IHQ y moleculares característicos como hemos observado del grupo de sarcomas con un índice divisional más bajo. De hecho, el tumor no muestra un índice divisional muy elevado y la necrosis masiva que suele aparecer en las primeras horas del xenotrasplante en los tumores de alto grado como se muestra sobre todo en el ES y el OS, no la observamos hasta las primeras semanas del xenotrasplante.

Posiblemente el microambiente tumoral murino juegue un papel relevante en el comportamiento biológico del SS estudiado en nuestras experiencias. Al principio de la discusión ya hemos comentado la importancia de las interacciones entre las células tumorales, y las células del estroma y el sistema inmune del huésped en los xenotrasplantes ^{241, 242}. Así pues, esta podría ser la razón por la cual el SS tenga un comportamiento menos agresivo en el xenotrasplante en los ratones nude. Posiblemente el sistema inmunológico y el estroma murino jueguen un papel esencial en este comportamiento biológico peculiar.

Por otro lado, podemos afirmar que las correlaciones entre las diferentes técnicas IHQ en nuestro trabajo no han sido del todo satisfactorias, tanto entre las técnicas IHQ, como de estas con respecto a las técnicas de biología con RT-PCR, donde los perfiles de expresión no se han superpuesto en la mayoría de casos. Posiblemente el hecho que sean técnicas diferentes con una sensibilidad y especificidad propias dificulten estas correlaciones y sean la explicación más razonable a lo sucedido en nuestras experiencias ^{375, 403}.

Encontramos en la literatura estudios relacionados con sarcomas, angiogénesis y metástasis incluyendo el papel en este proceso del infiltrado inflamatorio y las quimiocinas o citocinas, tratando de hallar nuevas dianas terapéuticas, de manera especial en el ES ^{12, 367, 404-406} y OS ^{378, 388, 407-409}, pero también en Chs ⁴¹⁰⁻⁴¹² SS ⁴¹³ y GIST ⁴¹⁴. En estos dos últimos tipos de tumores hemos encontrado tan solo un estudio relacionado con la expresión de quimiocinas en el SS ⁴¹⁵ y ninguno con GIST.

Por otra parte, varios bloqueantes de VEGF han sido aprobados para uso clínico en cáncer y enfermedades oculares ^{347, 416, 417}. Además, la FDA ha aceptado el uso del anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (Avastin®) entre otros para el cáncer colo-rectal metastásico, adenocarcinoma pulmonar metastásico, cáncer de mama metastásico, glioblastoma multiforme recurrente y carcinoma renal metastásico. El

tratamiento con inhibidores de VEGF generalmente prolongan la supervivencia de pacientes con cáncer en el orden de meses ⁷. Estos mecanismos de bloqueo suelen claudicar con el tiempo debido a varios mecanismos, por mutaciones en las células neoplásicas, células endoteliales, estromales ^{396, 418} y porque la ruta de angiogénesis tumoral no depende tan sólo de la producción de VEGF sino también de otras moléculas pro-angiogénicas ⁷. La complejidad del proceso angiogénico complica y dificulta en la práctica clínica la eficacia de los diferentes tratamientos diana. A diferencia de otros tumores, plantear ensayos clínicos con nuevos fármacos en series de sarcomas es muy complicado, ya que es una enfermedad rara como para tener un nivel de evidencia de primer orden. Por otra parte, la carencia de contar con biomarcadores específicos de este proceso hace que no contemos con indicadores predictivos adecuados con evidencia suficiente como para recomendar un tratamiento con antiangiogénicos en el contexto de los sarcomas de hueso y partes blandas.

A continuación mostramos una tabla con los últimos ensayos con antiangiogénicos en los que están involucrados algunos o todos los sarcomas.

Tabla 5.1. Algunos ensayos clínicos con antiangiogénicos en funcionamiento con tumores de hueso y partes blandas. Tabla extraída de clinicaltrials.gov.

Estado	Título	Tumores
1. Completado	Vinblastine, Celecoxib, and Combination Chemotherapy in Treating Patients With Newly-Diagnosed Metastatic Ewing's Sarcoma Family of Tumors	Sarcomas
2.Reclutamiento	Anti-Angiogenic Therapy Post Transplant (ASCR) for Relapsed and Refractory Pediatric Solid Tumors	Sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma y osteosarcoma
3.Desconocido	Sorafenib, Epirubicin, Ifosfamide, and Radiation Therapy Followed By Surgery in Treating Patients With High-Risk Stage II or Stage III Soft Tissue Sarcoma	Sarcomas
4.Reclutamiento	Pazopanib Hydrochloride Followed By Chemotherapy and Surgery in Treating Patients With Soft Tissue Sarcoma	Sarcomas
5.Completado	Chemotherapy, SU5416, Radiation Therapy, and Surgery in Treating Patients With Soft Tissue Sarcoma	Sarcomas
6.Desconocido	Etoposide, Cyclophosphamide, Thalidomide, Celecoxib, and Fenofibrate in Treating Young Patients With Relapsed or Progressive Cancer	Sarcomas
7.Completado	Combination Therapy of Interleukin-12 and Interleukin-2 to Treat Advanced Cancer	Sarcomas

En futuros estudios se podrían realizar experiencias enfocadas a inhibir algunos de estos factores de crecimiento vascular estudiados o algunas de sus rutas génicas o metabólicas y observar el comportamiento morfológico, inmunohistoquímico y molecular de estos tumores que puedan reportar nuevas dianas terapéuticas en la práctica clínica diaria ⁷, como ya lo son para algunos tumores que presentan ciertas mutaciones y perfiles inmunohistoquímicos. Por otro lado, debemos continuar las investigaciones dirigidas a esclarecer el verdadero papel que juegan las quimiocinas en la biología e historia natural de los sarcomas. Ulteriores estudios dirigidos a inhibir la acción de estas quimiocinas bloqueando los receptores podrían esclarecer el efecto directo e indirecto que producen en la biología de los tumores de hueso y partes blandas.

La existencia de múltiples rutas de señalización, señales angiogénicas y angiostáticas simultáneas ⁴¹⁹, la aparición de resistencias a los fármacos ¹⁹⁴, vías alternativas de escape por parte de las células neoplásicas ⁴⁰⁶ y rol del estroma animal peritumoral en los experimentos *in vivo* ⁴⁰⁵, dificultan claramente el estudio y las dianas terapéuticas y nos hacen conscientes de la inmensidad y del complejo entramado de los procesos biológicos celulares y de manera particular en la angiogénesis tumoral.

6. CONCLUSIONES

- 1- En el modelo de inducción de angiogénesis que se ha propuesto, los ES, OS y ChG3 tienen un comportamiento más agresivo, sufren una intensa necrosis central en las primeras horas tras el injerto y comparten una remodelación estructural e inmunofenotípica similar, pero distinta de los SS, GIST y ChG2, de comportamiento menos agresivo.
- 2- En el primer grupo, el pico de expresión de factores proangiogénicos se produce más temprano (en las primeras 48h), mientras que en el grupo de sarcomas menos agresivos este mismo efecto se observa a partir de las 48h.
- 3- Las células tumorales xenoinjertadas estimulan la neoformación vascular reclutando células angioblásticas e inflamatorias del estroma murino secretando quimiocinas en el estroma peritumoral. En el ES, la expresión de quimiocinas es más intensa en las células que contactan con el estroma peritumoral murino y en las áreas perinecroticas.
- 4- Los tumores con rápido crecimiento (ES, OS y Ch G3) muestran correlación inversa entre el índice proliferativo e intensidad de necrosis así como entre los niveles de expresión de Ki67 y de HIF-1A.
- 5- La concordancia entre la expresión de las quimiocinas CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10 y sus receptores CXCR2 y CXCR3 con IF indirecta y IHQ convencional es del 30%.
- 6- Todos los tumores expresan las quimiocinas CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10 y sus receptores CXCR2 y CXCR3 generando una estimulación autocrina. En el OS se encuentra además ligando en la matriz extracelular que justificaría una estimulación paracrina.
- 7- A nivel inmunohistoquímico y molecular se evidencia que el proceso de angiogénesis en el xenoinjerto consta de dos fases claramente diferenciadas: una fase de inducción, y otra ulterior de remodelación. Ambas se caracterizan por picos de expresión de quimiocinas CXCL1/2/3, CXCL9 y CXCL10 y VEGF. Siendo los factores VEGF y HIF1A los que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de ambas fases.
- 8- HIF1A se expresa en las primeras fases del xenoinjerto (24h-96h), coincidiendo con la fase de mayor hipoxia, mayor proporción de células en picnosis y los primeros signos de inducción angiogénica.

- 9-** A lo largo de toda la experiencia no se detecta expresión de VEGF de origen humano en suero murino, sino que el VEGF humano se produce solo a nivel local producido por el propio tumor.
- 10-** Se observa mayores niveles de VEGF murino en suero durante la fase de remodelación de la angiogénesis que coincide con un incremento de células angioblásticas (VE-cadherina positivas) en el tumor y estroma peritumoral. Sugiriendo que esta mayor concentración sérica de VEGF moviliza estas células angioblásticas de la médula ósea del ratón.
- 11-** En el presente estudio, el SS, tumor de alto grado en humanos se comporta morfológica y biológicamente como tumor de menor grado con un perfil de expresión inmunohistoquímico y génico más semejante al ChG2 y GIST.

7.ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
Akt: proteína quinasa B
AMOT: angiomotina
ANG: angiogenina
ANGPT: angiopoyetina
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosina trifosfato
BCL: b-cell lymphoma
CEA: antígeno carcinoembrionario
CGH: hibridación genómica comparativa
Ch: condrosarcoma
cm: centímetros
Ct: ciclo umbral
Da: dalton
DAB: diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica
EC: célula endotelial
EEUU: Estados Unidos
EFN: efrina
EGF: factor de crecimiento epidérmico
ELISA: Enzyme-Linked Método Inmunoenzimático
EMA: antígeno epitelial de membrana
EPC: célula endotelial progenitora
Eph: efrinas
ES: sarcoma de Ewing
ETS: E26 transformation-specific
FDA: food and drug administration
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
FGFR: receptor de factor de crecimiento fibroblástico
FISH: hibridación in situ fluorescente
FRET: transferencia electrónica de la resonancia
GAG: glicosaminglicanos
GIST: tumor del estromal gastrointestinal
GPCR: receptor transmembrana acoplado a proteína G
GRO: oncogen relacionado con el crecimiento
h: hora
HE: hematoxilina-eosina
HIF: factor inducible por hipoxia
HIV: virus de la inmunodeficiencia humano
HMGB: grupo de elevada movilidad box
IF: inmunofluorescencia
IFN: interferón
IGF: factor de crecimiento de insulina
IGFR: receptor factor de crecimiento de insulina
IHH: Indian hedgehog
IHQ: inmunohistoquímica
IL: interleuquina
IP10: Interferon gamma-induced protein 10

I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
ITG: integrina
ITGAV: integrina alfa-V
kDa: quilodalton
KSHV: virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi
l: litro
M: mol
MAGE-CT: antigen cancer-testis
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
mM: milimol
μl: microlitro
μm: micra
miRNA: micro ARN
MDK: midkine
ME: microscopía electrónica
min: minuto
MIP: proteína inflamatoria macrofágica
ml: mililitro
mm: milímetros
MMP: metaloproteinasa
MT1MMP: metaloproteinasa transmembrana
NK: natural killer
ng: nanogramo
nm: nanómetro
NRP: neuropilina
NV: no valorable
OMS: organización mundial de la salud
OS: osteosarcoma
PAS: ácido periódico de Schiff
Pb: pares de bases
PBS: solución salina tamponada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDGF: factor de crecimiento derivado plaquetario
PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado plaquetario
PF: factor plaquetario
pg: picogramo
PGP9.5: proteína producto del gen 9.5
PI3K: fosfoinositol 3-quinasa
PLGF: factor de crecimiento placentario
PNET: tumor neuroectodérmico primitivo
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa
RA: recuperación antigénica
rpm: revoluciones por minuto
RT: transcriptasa reversa
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa
SDF: stromal cell-derived factor
seg: segundo
sem: semana
SS: sarcoma sinovial

TBE: tris, borato y EDTA
TGF: factor de crecimiento transformador
TGFR: receptor factor de crecimiento transformador
Th1: T helper 1
THBS: trombospondina
TLE1: transducin-like enhancer protein 1
TNF: factor de necrosis tumoral
UV: ultravioleta
VE-cad: cadherina del endotelio vascular
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR: receptor factor de crecimiento del endotelio vascular
wk: semana
WT-1: Wilms tumor-1

8.BIBLIOGRAFÍA

1. Romeo S, Dei Tos AP. Clinical application of molecular pathology in sarcomas. *Curr Opin Oncol* 2011;**23**;379-384.
2. Fletcher CDM UK, Mertens F. *Pathology and Genetics-Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC, 2002.
3. Machado I, Alberghini M, Giner F *et al*. Histopathological characterization of small cell osteosarcoma with immunohistochemistry and molecular genetic support. A study of 10 cases. *Histopathology* 2010;**57**;162-167.
4. Machado I, Noguera R, Mateos EA *et al*. The many faces of atypical Ewing's sarcoma. A true entity mimicking sarcomas, carcinomas and lymphomas. *Virchows Arch* 2011;**458**;281-290.
5. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S *et al*. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch* 2009;**455**;397-411.
6. Calabuig-Farinas S, Lopez-Guerrero JA, Navarro S *et al*. Evaluation of prognostic factors and their capacity to predict biological behavior in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Surg Pathol* 2011;**19**;448-461.
7. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;**473**;298-307.
8. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A *et al*. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;**155**;739-752.
9. Clarijs R, Otte-Holler I, Ruiters DJ, de Waal RM. Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;**43**;912-918.
10. Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H *et al*. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res* 2004;**64**;4010-4017.
11. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M *et al*. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 2007;**26**;4679-4688.
12. Berghuis D, Santos SJ, Baelde HJ *et al*. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8(+) T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *J Pathol* 2011;**223**;347-357.
13. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008;**267**;226-244.
14. Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 1979;**43**;2438-2451.
15. Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ. Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1994;**118**;608-615.
16. Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Bovee JV. Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors. *Cancer Genet* 2012;**205**;193-204.
17. Dehner LP. Primitive neuroectodermal tumor and Ewing's sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1993;**17**;1-13.
18. Dehner LP. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. *Mod Pathol* 1998;**11**;669-685.
19. Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP *et al*. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *Am J Surg Pathol* 2005;**29**;1025-1033.

20. Llombart-Bosch A, Pellin A, Carda C, Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A. Soft tissue Ewing sarcoma--peripheral primitive neuroectodermal tumor with atypical clear cell pattern shows a new type of EWS-FEV fusion transcript. *Diagn Mol Pathol* 2000;**9**;137-144.
21. Kissane JM, Askin FB, Foulkes M, Stratton LB, Shirley SF. Ewing's sarcoma of bone: clinicopathologic aspects of 303 cases from the Intergroup Ewing's Sarcoma Study. *Hum Pathol* 1983;**14**;773-779.
22. Nascimento AG, Unii KK, Pritchard DJ, Cooper KL, Dahlin DC. A clinicopathologic study of 20 cases of large-cell (atypical) Ewing's sarcoma of bone. *Am J Surg Pathol* 1980;**4**;29-36.
23. Navarro S, Noguera R, Pellin A *et al.* Atypical pleomorphic extrasosseous ewing tumor/peripheral primitive neuroectodermal tumor with unusual phenotypic/genotypic profile. *Diagn Mol Pathol* 2002;**11**;9-15.
24. Oda Y, Kinoshita Y, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Extraskeletal primitive neuroectodermal tumour with massive osteo-cartilaginous metaplasia. *Histopathology* 2000;**36**;188-191.
25. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991;**67**;1886-1893.
26. Ozdemirli M, Fanburg-Smith JC, Hartmann DP, Azumi N, Miettinen M. Differentiating lymphoblastic lymphoma and Ewing's sarcoma: lymphocyte markers and gene rearrangement. *Mod Pathol* 2001;**14**;1175-1182.
27. Ozdemirli M, Fanburg-Smith JC, Hartmann DP *et al.* Precursor B-Lymphoblastic lymphoma presenting as a solitary bone tumor and mimicking Ewing's sarcoma: a report of four cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1998;**22**;795-804.
28. Perlman EJ, Lumadue JA, Hawkins AL, Cohen K, Colombani P, Griffin CA. Primary cutaneous neuroendocrine tumors. Diagnostic use of cytogenetic and MIC2 analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;**82**;30-34.
29. Lumadue JA, Askin FB, Perlman EJ. MIC2 analysis of small cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994;**102**;692-694.
30. Gerald WL, Ladanyi M, de Alava E *et al.* Clinical, pathologic, and molecular spectrum of tumors associated with t(11;22)(p13;q12): desmoplastic small round-cell tumor and its variants. *J Clin Oncol* 1998;**16**;3028-3036.
31. Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. *Hum Pathol* 1996;**27**;1273-1276.
32. Machado I, Noguera R, Pellin A *et al.* Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2009;**18**;189-199.
33. Carter RL, al-Sams SZ, Corbett RP, Clinton S. A comparative study of immunohistochemical staining for neuron-specific enolase, protein gene product 9.5 and S-100 protein in neuroblastoma, Ewing's sarcoma and other round cell tumours in children. *Histopathology* 1990;**16**;461-467.
34. Amann G, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M, Windhager R, Kovar H. Relation of neurological marker expression and EWS gene fusion types in MIC2/CD99-positive tumors of the Ewing family. *Hum Pathol* 1999;**30**;1058-1064.
35. Machado I, Navarro S, Lopez-Guerrero JA, Alberghini M, Picci P, Llombart-Bosch A. Epithelial marker expression does not rule out a diagnosis of Ewing's sarcoma family of tumours. *Virchows Arch* 2012;**459**;409-414.

36. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 2000;**24**;1657-1662.
37. Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;**9**;255-260.
38. Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos AP. Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expression in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody. *Mod Pathol* 2004;**17**;547-552.
39. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, Mazabraud A. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;**12**;21-25.
40. Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Douglass EC, Israel MA. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. *N Engl J Med* 1984;**311**;584-585.
41. de Alava E, Pardo J. Ewing tumor: tumor biology and clinical applications. *Int J Surg Pathol* 2001;**9**;7-17.
42. Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D, Karseladze A, Tanke HJ, Hogendoorn PC. The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Cancer Res* 2009;**15**;2259-2268.
43. de Alava E, Kawai A, Healey JH *et al.* EWS-FLII fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998;**16**;1248-1255.
44. Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL *et al.* Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;**28**;1982-1988.
45. Pinto A, Dickman P, Parham D. Pathobiologic markers of the ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma*;2011;856190.
46. Mackintosh C, Ordonez JL, Garcia-Dominguez DJ *et al.* 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* 2012;**31**;1287-1298.
47. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995;**75**;203-210.
48. Huvos AG. Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons. A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer* 1986;**57**;1442-1449.
49. Huvos AG. Henry L. Jaffe, MD (1896-1979), a pioneering authority on bone diseases: reflections and an appreciation. *Ann Diagn Pathol* 1999;**3**;260-261.
50. Mirra JM, Gold R, Downs J, Eckardt JJ. A new histologic approach to the differentiation of enchondroma and chondrosarcoma of the bones. A clinicopathologic analysis of 51 cases. *Clin Orthop Relat Res* 1985;214-237.
51. Raymond AK, Murphy GF, Rosenthal DI. Case report 425: Chondroblastic osteosarcoma: clear-cell variant of femur. *Skeletal Radiol* 1987;**16**;336-341.
52. Mirra JM, Kameda N, Rosen G, Eckardt J. Primary osteosarcoma of toe phalanx: first documented case. Review of osteosarcoma of short tubular bones. *Am J Surg Pathol* 1988;**12**;300-307.
53. Okada K, Wold LE, Beabout JW, Shives TC. Osteosarcoma of the hand. A clinicopathologic study of 12 cases. *Cancer* 1993;**72**;719-725.
54. Dahlin DC, Coventry MB. Osteogenic sarcoma. A study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* 1967;**49**;101-110.

55. Dahlin DC, Unni KK. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. *Am J Surg Pathol* 1977;**1**:61-72.
56. Raymond AK, Chawla SP, Carrasco CH *et al*. Osteosarcoma chemotherapy effect: a prognostic factor. *Semin Diagn Pathol* 1987;**4**:212-236.
57. Mayordomo E, Machado I, Giner F *et al*. A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;**18**:453-461.
58. Fletcher C. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. China: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.
59. Williams AH, Schwinn CP, Parker JW. The ultrastructure of osteosarcoma. A review of twenty cases. *Cancer* 1976;**37**:1293-1301.
60. Paschall HA, Paschall MM. Electron microscopic observations of 20 human osteosarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 1975;**42**:56.
61. Onda M, Matsuda S, Higaki S *et al*. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* 1996;**77**:71-78.
62. Hasegawa T, Hirose T, Kudo E, Hizawa K, Usui M, Ishii S. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. *Hum Pathol* 1991;**22**:583-590.
63. Gorlick R, Huvos AG, Heller G *et al*. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1999;**17**:2781-2788.
64. Ferguson RJ, Yunis EJ. The ultrastructure of human osteosarcoma: a study of nine cases. *Clin Orthop Relat Res* 1978;**234**:246.
65. Le Guellec S, Moyal EC, Filleron T *et al*. The beta5/focal adhesion kinase/glycogen synthase kinase 3beta integrin pathway in high-grade osteosarcoma: a protein expression profile predictive of response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol* 2013;**44**:2149-2158.
66. Anninga JK, Picci P, Fiocco M *et al*. Osteosarcoma of the hands and feet: a distinct clinico-pathological subgroup. *Virchows Arch* 2013;**462**:109-120.
67. Biegel JA, Womer RB, Emanuel BS. Complex karyotypes in a series of pediatric osteosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;**38**:89-100.
68. Bridge JA, Nelson M, McComb E *et al*. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;**95**:74-87.
69. Fletcher JA, Gebhardt MC, Kozakewich HP. Cytogenetic aberrations in osteosarcomas. Nonrandom deletions, rings, and double-minute chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;**77**:81-88.
70. Hoogerwerf WA, Hawkins AL, Perlman EJ, Griffin CA. Chromosome analysis of nine osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;**9**:88-92.
71. Lopez-Guerrero JA, Lopez-Gines C, Pellin A, Carda C, Llombart-Bosch A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;**13**:81-91.
72. Namlos HM, Meza-Zepeda LA, Baroy T *et al*. Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PLoS One* 2012;**7**:e48086.
73. Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998;**153**:159-163.
74. Wunder JS, Gokgoz N, Parkes R *et al*. TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol* 2005;**23**:1483-1490.
75. Overholtzer M, Rao PH, Favis R *et al*. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:11547-11552.

76. Miller CW, Ikezoe T, Krug U *et al.* Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;**33**;17-21.
77. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S *et al.* Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol* 2009;**219**;294-305.
78. Mohseny AB, Tiekens C, van der Velden PA *et al.* Small deletions but not methylation underlie CDKN2A/p16 loss of expression in conventional osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;**49**;1095-1103.
79. Ulaner GA, Huang HY, Otero J *et al.* Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res* 2003;**63**;1759-1763.
80. Sanders RP, Drissi R, Billups CA, Daw NC, Valentine MB, Dome JS. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 2004;**22**;3790-3797.
81. Kuijjer ML, Peterse EF, van den Akker BE *et al.* IR/IGF1R signaling as potential target for treatment of high-grade osteosarcoma. *BMC Cancer* 2013;**13**;245.
82. Unni KK, Dahlin DC, Beabout JW, Sim FH. Chondrosarcoma: clear-cell variant. A report of sixteen cases. *J Bone Joint Surg Am* 1976;**58**;676-683.
83. Gadwal SR, Fanburg-Smith JC, Gannon FH, Thompson LD. Primary chondrosarcoma of the head and neck in pediatric patients: a clinicopathologic study of 14 cases with a review of the literature. *Cancer* 2000;**88**;2181-2188.
84. Young CL, Sim FH, Unni KK, McLeod RA. Chondrosarcoma of bone in children. *Cancer* 1990;**66**;1641-1648.
85. Huvos AG, Marcove RC. Chondrosarcoma in the young. A clinicopathologic analysis of 79 patients younger than 21 years of age. *Am J Surg Pathol* 1987;**11**;930-942.
86. Campanacci M, Giunti A, Leonessa C, Pagani P, Trentani C. Pathological fractures in osteopathies and bony dysplasias. *Ital J Orthop Traumatol* 1975;**Suppl 1**;7-45.
87. Bjornsson J, McLeod RA, Unni KK, Ilstrup DM, Pritchard DJ. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. *Cancer* 1998;**83**;2105-2119.
88. Bovee JV, van der Heul RO, Taminiu AH, Hogendoorn PC. Chondrosarcoma of the phalanx: a locally aggressive lesion with minimal metastatic potential: a report of 35 cases and a review of the literature. *Cancer* 1999;**86**;1724-1732.
89. Dahlin DC, Salvador AH. Chondrosarcomas of bones of the hands and feet--a study of 30 cases. *Cancer* 1974;**34**;755-760.
90. Lansche WE, Spjut HJ. Chondrosarcoma of the small bones of the hand. *J Bone Joint Surg Am* 1958;**40-A**;1139-1145.
91. Ogose A, Unni KK, Swee RG, May GK, Rowland CM, Sim FH. Chondrosarcoma of small bones of the hands and feet. *Cancer* 1997;**80**;50-59.
92. Ostrowski ML, Spjut HJ. Lesions of the bones of the hands and feet. *Am J Surg Pathol* 1997;**21**;676-690.
93. Coltrera MD, Googe PB, Harrist TJ, Hyams VJ, Schiller AL, Goodman ML. Chondrosarcoma of the temporal bone. Diagnosis and treatment of 13 cases and review of the literature. *Cancer* 1986;**58**;2689-2696.
94. Rosenberg AE, Nielsen GP, Keel SB *et al.* Chondrosarcoma of the base of the skull: a clinicopathologic study of 200 cases with emphasis on its distinction from chordoma. *Am J Surg Pathol* 1999;**23**;1370-1378.
95. Dahlin DC, Henderson ED. Chondrosarcoma, a surgical and pathological problem; review of 212 cases. *J Bone Joint Surg Am* 1956;**38-A**;1025-1038; passim.

96. Schajowicz F. Juxtacortical chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg Br* 1977;**59-B**;473-480.
97. Bertoni F, Boriani S, Laus M, Campanacci M. Periosteal chondrosarcoma and periosteal osteosarcoma. Two distinct entities. *J Bone Joint Surg Br* 1982;**64**;370-376.
98. Machado I, Giner F, Mayordomo E, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. Tissue microarrays analysis in chondrosarcomas: light microscopy, immunohistochemistry and xenograft study. *Diagn Pathol* 2008;**3 Suppl 1**;S25.
99. Schiller AL. Diagnosis of borderline cartilage lesions of bone. *Semin Diagn Pathol* 1985;**2**;42-62.
100. Marcove RC, Huvos AG. Cartilaginous tumors of the ribs. *Cancer* 1971;**27**;794-801.
101. Kindblom LG, Angervall L. Histochemical characterization of mucosubstances in bone and soft tissue-tumors. *Cancer* 1975;**36**;985-994.
102. Nakamura Y, Becker LE, Marks A. S-100 protein in tumors of cartilage and bone. An immunohistochemical study. *Cancer* 1983;**52**;1820-1824.
103. Okajima K, Honda I, Kitagawa T. Immunohistochemical distribution of S-100 protein in tumors and tumor-like lesions of bone and cartilage. *Cancer* 1988;**61**;792-799.
104. Castresana JS, Barrios C, Gomez L, Kreicbergs A. Amplification of the c-myc proto-oncogene in human chondrosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 1992;**1**;235-238.
105. Franchi A, Calzolari A, Zampi G. Immunohistochemical detection of c-fos and c-jun expression in osseous and cartilaginous tumours of the skeleton. *Virchows Arch* 1998;**432**;515-519.
106. Wrba F, Gullick WJ, Fertl H, Amann G, Salzer-Kuntschik M. Immunohistochemical detection of the c-erbB-2 proto-oncogene product in normal, benign and malignant cartilage tissues. *Histopathology* 1989;**15**;71-76.
107. Dobashi Y, Sugimura H, Sato A *et al.* Possible association of p53 overexpression and mutation with high-grade chondrosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 1993;**2**;257-263.
108. Oshiro Y, Chaturvedi V, Hayden D *et al.* Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study. *Cancer* 1998;**83**;2324-2334.
109. Terek RM, Healey JH, Garin-Chesa P, Mak S, Huvos A, Albino AP. p53 mutations in chondrosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 1998;**7**;51-56.
110. van Oosterwijk JG, van Ruler MA, Briaire-de Bruijn IH *et al.* Src kinases in chondrosarcoma chemoresistance and migration: dasatinib sensitises to doxorubicin in TP53 mutant cells. *Br J Cancer* 2013;**109**;1214-1222.
111. Schrage YM, Briaire-de Bruijn IH, de Miranda NF *et al.* Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res* 2009;**69**;6216-6222.
112. Amary MF, Bacsı K, Maggiani F *et al.* IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* 2011;**224**;334-343.
113. Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG *et al.* Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med* 2009;**13**;2843-2852.
114. Grignani G, Palmerini E, Dileo P *et al.* A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann Oncol* 2012;**23**;508-516.
115. Ho L, Stojanovski A, Whetstone H *et al.* Gli2 and p53 cooperate to regulate IGFBP-3- mediated chondrocyte apoptosis in the progression from benign to malignant cartilage tumors. *Cancer Cell* 2009;**16**;126-136.

116. Cleton-Jansen AM, van Beerendonk HM, Baelde HJ, Bovee JV, Karperien M, Hogendoorn PC. Estrogen signaling is active in cartilaginous tumors: implications for antiestrogen therapy as treatment option of metastasized or irresectable chondrosarcoma. *Clin Cancer Res* 2005;**11**;8028-8035.
117. Grignani G, Palmerini E, Dileo P *et al.* A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure and outcome in cartilage tumours. *Histopathology* 2012;**56**;641-651.
118. Rozeman LB, Hameetman L, van Wezel T *et al.* cDNA expression profiling of chondrosarcomas: Ollier disease resembles solitary tumours and alteration in genes coding for components of energy metabolism occurs with increasing grade. *J Pathol* 2005;**207**;61-71.
119. Tarpey PS, Behjati S, Cooke SL *et al.* Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat Genet* 2013;**45**;923-926.
120. van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D *et al.* Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol* 2012;**23**;1617-1626.
121. Smith LW. Synoviomata. *Am J Pathol* 1927;**3**;355-364 357.
122. Weiss RM. *Enzinger y Weiss. Tumores de partes blandas.* 5th ed. St Louis: Mosby, 2009.
123. Kransdorf MJ. Malignant soft-tissue tumors in a large referral population: distribution of diagnoses by age, sex, and location. *AJR Am J Roentgenol* 1995;**164**;129-134.
124. Herzog CE. Overview of sarcomas in the adolescent and young adult population. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;**27**;215-218.
125. Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH *et al.* Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res* 2002;**62**;135-140.
126. Spillane AJ, A'Hern R, Judson IR, Fisher C, Thomas JM. Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging, and prognostic assessment. *J Clin Oncol* 2000;**18**;3794-3803.
127. Campbell C, Gallagher J, Dickinson I. Synovial sarcoma--towards a simplified approach to prognosis. *ANZ J Surg* 2004;**74**;727-731.
128. Paulino AC. Synovial sarcoma prognostic factors and patterns of failure. *Am J Clin Oncol* 2004;**27**;122-127.
129. Raney RB. Synovial sarcoma in young people: background, prognostic factors, and therapeutic questions. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;**27**;207-211.
130. Namba Y, Kawai A, Naito N, Morimoto Y, Hanakawa S, Inoue H. Intraarticular synovial sarcoma confirmed by SYT-SSX fusion transcript. *Clin Orthop Relat Res* 2002;**221**-226.
131. Fetsch JF, Meis JM. Synovial sarcoma of the abdominal wall. *Cancer* 1993;**72**;469-477.
132. Subramaniam MM, Navarro S, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical study of correlation between histologic subtype and expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in synovial sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011;**135**;1001-1009.
133. Martin-Broto J, Gutierrez AM, Ramos RF *et al.* MRP1 Overexpression Determines Poor Prognosis in Prospectively Treated Patients with Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma of Limbs and Trunk Wall: An ISG/GEIS Study. *Mol Cancer Ther* 2014.
134. Przybyl J, Sciot R, Rutkowski P *et al.* Recurrent and novel SS18-SSX fusion transcripts in synovial sarcoma: description of three new cases. *Tumour Biol* 2012;**33**;2245-2253.

135. Bovee JV, Hogendoorn PC. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch* 2010;**456**:193-199.
136. Morrison C, Wakely PE, Jr., Ashman CJ, Lemley D, Theil K. Cystic synovial sarcoma. *Ann Diagn Pathol* 2001;**5**:48-56.
137. Milchgrub S, Ghandur-Mnaymneh L, Dorfman HD, Albores-Saavedra J. Synovial sarcoma with extensive osteoid and bone formation. *Am J Surg Pathol* 1993;**17**:357-363.
138. Subramaniam MM, Navarro S, Pellin A *et al*. Tissue microarray profiling of primary and xenotransplanted synovial sarcomas demonstrates the immunophenotypic similarities existing between SYT-SSX fusion gene confirmed, biphasic, and monophasic fibrous variants. *Virchows Arch* 2006;**449**:435-447.
139. Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K *et al*. MAGE antigen expression in monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Hum Pathol* 2002;**33**:225-229.
140. Abenzoa P, Manivel JC, Swanson PE, Wick MR. Synovial sarcoma: ultrastructural study and immunohistochemical analysis by a combined peroxidase-antiperoxidase/avidin-biotin-peroxidase complex procedure. *Hum Pathol* 1986;**17**:1107-1115.
141. Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, Lasota J. Patterns of keratin polypeptides in 110 biphasic, monophasic, and poorly differentiated synovial sarcomas. *Virchows Arch* 2000;**437**:275-283.
142. Folpe AL, Schmidt RA, Chapman D, Gown AM. Poorly differentiated synovial sarcoma: immunohistochemical distinction from primitive neuroectodermal tumors and high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors. *Am J Surg Pathol* 1998;**22**:673-682.
143. van de Rijn M, Barr FG, Xiong QB, Hedges M, Shipley J, Fisher C. Poorly differentiated synovial sarcoma: an analysis of clinical, pathologic, and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol* 1999;**23**:106-112.
144. Smith TA, Machen SK, Fisher C, Goldblum JR. Usefulness of cytokeratin subsets for distinguishing monophasic synovial sarcoma from malignant peripheral nerve sheath tumor. *Am J Clin Pathol* 1999;**112**:641-648.
145. Pelmus M, Guillou L, Hostein I, Sierankowski G, Lussan C, Coindre JM. Monophasic fibrous and poorly differentiated synovial sarcoma: immunohistochemical reassessment of 60 t(X;18)(SYT-SSX)-positive cases. *Am J Surg Pathol* 2002;**26**:1434-1440.
146. Olsen SH, Thomas DG, Lucas DR. Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, and Ewing sarcoma. *Mod Pathol* 2006;**19**:659-668.
147. Suster S, Fisher C, Moran CA. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1998;**22**:863-872.
148. Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, Lasota J. Calretinin and other mesothelioma markers in synovial sarcoma: analysis of antigenic similarities and differences with malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 2001;**25**:610-617.
149. Ordonez NG, Mahfouz SM, Mackay B. Synovial sarcoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1990;**21**:733-749.
150. Fisher C, Montgomery E, Healy V. Calponin and h-caldesmon expression in synovial sarcoma; the use of calponin in diagnosis. *Histopathology* 2003;**42**:588-593.
151. Terry J, Saito T, Subramanian S *et al*. TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies. *Am J Surg Pathol* 2007;**31**:240-246.
152. Qi Y, Wang CC, He YL *et al*. The correlation between morphology and the expression of TGF-beta signaling pathway proteins and epithelial-mesenchymal transition-related proteins in synovial sarcomas. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;**6**:2787-2799.

153. Clark J, Rocques PJ, Crew AJ *et al*. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994;**7**;502-508.
154. Antonescu CR, Kawai A, Leung DH *et al*. Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2000;**9**;1-8.
155. Begueret H, Galateau-Salle F, Guillou L *et al*. Primary intrathoracic synovial sarcoma: a clinicopathologic study of 40 t(X;18)-positive cases from the French Sarcoma Group and the Mesopath Group. *Am J Surg Pathol* 2005;**29**;339-346.
156. Surace C, Panagopoulos I, Palsson E, Rocchi M, Mandahl N, Mertens F. A novel FISH assay for SS18-SSX fusion type in synovial sarcoma. *Lab Invest* 2004;**84**;1185-1192.
157. Panagopoulos I, Mertens F, Isaksson M *et al*. Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;**31**;362-372.
158. Hiraga H, Nojima T, Abe S *et al*. Diagnosis of synovial sarcoma with the reverse transcriptase-polymerase chain reaction: analyses of 84 soft tissue and bone tumors. *Diagn Mol Pathol* 1998;**7**;102-110.
159. Guillou L, Benhattar J, Bonichon F *et al*. Histologic grade, but not SYT-SSX fusion type, is an important prognostic factor in patients with synovial sarcoma: a multicenter, retrospective analysis. *J Clin Oncol* 2004;**22**;4040-4050.
160. Subramaniam MM, Noguera R, Piqueras M *et al*. Evaluation of genetic stability of the SYT gene rearrangement by break-apart FISH in primary and xenotransplanted synovial sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;**172**;23-28.
161. Kawaguchi S, Wada T, Ida K *et al*. Phase I vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma. *J Transl Med* 2005;**3**;1.
162. Trautmann M, Sievers E, Aretz S *et al*. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/beta-catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene* 2013.
163. Ishibe T, Nakayama T, Aoyama T, Nakamura T, Toguchida J. Neuronal differentiation of synovial sarcoma and its therapeutic application. *Clin Orthop Relat Res* 2008;**466**;2147-2155.
164. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y *et al*. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;**279**;577-580.
165. Stout AP. Bizarre smooth muscle tumors of the stomach. *Cancer* 1962;**15**;400-409.
166. Appleman HD, Helwig EB. Gastric epithelioid leiomyoma and leiomyosarcoma (leiomyoblastoma). *Cancer* 1976;**38**;708-728.
167. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983;**7**;507-519.
168. Medeiros F, Corless CL, Duensing A *et al*. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004;**28**;889-894.
169. Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006;**48**;83-96.
170. Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005;**117**;289-293.
171. Carney JA. The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *Cancer* 1979;**43**;374-382.
172. Carney JA. The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)* 1983;**62**;159-169.

173. Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y *et al.* Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 2005;**29**:755-763.
174. Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 2006;**30**:90-96.
175. Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien P, Kapusta L, Dardick I. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. *Am J Surg Pathol* 2000;**24**:326-327.
176. O'Riain C, Corless CL, Heinrich MC *et al.* Gastrointestinal stromal tumors: insights from a new familial GIST kindred with unusual genetic and pathologic features. *Am J Surg Pathol* 2005;**29**:1680-1683.
177. Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC *et al.* Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J Clin Oncol* 2005;**23**:2735-2743.
178. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;**29**:52-68.
179. Wong NA, Young R, Malcomson RD *et al.* Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 2003;**43**:118-126.
180. Takubo K, Nakagawa H, Tsuchiya S, Mitomo Y, Sasajima K, Shiota A. Seedling leiomyoma of the esophagus and esophagogastric junction zone. *Hum Pathol* 1981;**12**:1006-1010.
181. Suster S, Sorace D, Moran CA. Gastrointestinal stromal tumors with prominent myxoid matrix. Clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of nine cases of a distinctive morphologic variant of myogenic stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 1995;**19**:59-70.
182. Evans HL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years. *Cancer* 1985;**56**:2242-2250.
183. Suster S. Gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol* 1996;**13**:297-313.
184. Emile JF. [Histology and molecular biology of GIST]. *Bull Acad Natl Med* 2012;**196**:835-844.
185. Hemminger J, Iwenofu OH. Discovered on gastrointestinal stromal tumours 1 (DOG1) expression in non-gastrointestinal stromal tumour (GIST) neoplasms. *Histopathology* 2012;**61**:170-177.
186. Chan JK. Newly available antibodies with practical applications in surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 2013;**21**:553-572.
187. Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A *et al.* Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;**23**:6190-6198.
188. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C *et al.* Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002;**33**:459-465.
189. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M *et al.* Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;**344**:1052-1056.

190. Corless CL, Schroeder A, Griffith D *et al*. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;**23**;5357-5364.
191. Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J *et al*. Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2005;**11**;638-645.
192. Wardelmann E, Hrychyk A, Merkelbach-Bruse S *et al*. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004;**6**;197-204.
193. Lasota J, Stachura J, Miettinen M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 2006;**86**;94-100.
194. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;**144**;646-674.
195. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;**338**;436-445.
196. Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol* 2003;**81**;1-44.
197. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;**12**;121-127.
198. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL *et al*. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;**270**;27348-27357.
199. Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**;3574-3577.
200. Hebert CA, Vitangcol RV, Baker JB. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J Biol Chem* 1991;**266**;18989-18994.
201. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* 1995;**4**;155-160.
202. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;**22**;891-928.
203. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;**2**;129-134.
204. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002;**54**;227-229.
205. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD *et al*. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000;**165**;5269-5277.
206. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L *et al*. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001;**107**;53-63.
207. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z *et al*. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**;1885-1890.
208. Folkman J, Shing Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* 1992;**313**;355-364.
209. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**;540-550.
210. Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* 2004;**14**;155-160.

211. Opendakker G, Van Damme J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int J Dev Biol* 2004;**48**;519-527.
212. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 2008;**180**;2011-2017.
213. Wallace ME, Smyth MJ. The role of natural killer cells in tumor control--effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2005;**27**;49-64.
214. Muller A, Homey B, Soto H *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;**410**;50-56.
215. Richmond A, Thomas HG. Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J Cell Biochem* 1988;**36**;185-198.
216. Scapini P, Morini M, Tecchio C *et al.* CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol* 2004;**172**;5034-5040.
217. Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* 2002;**72**;9-18.
218. Bordoni R, Fine R, Murray D, Richmond A. Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, nevocytes, and malignant melanocytes. *J Cell Biochem* 1990;**44**;207-219.
219. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H *et al.* Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol* 1997;**62**;588-597.
220. Wang D, Richmond A. Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001;**276**;3650-3659.
221. Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol* 1999;**163**;2017-2022.
222. Gershengorn MC, Geras-Raaka E, Varma A, Clark-Lewis I. Chemokines activate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor in mammalian cells in culture. *J Clin Invest* 1998;**102**;1469-1472.
223. Loos T, Dekeyzer L, Struyf S *et al.* TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Lab Invest* 2006;**86**;902-916.
224. Proost P, Vynckier AK, Mahieu F *et al.* Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur J Immunol* 2003;**33**;3146-3153.
225. Furuya M, Suyama T, Usui H *et al.* Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Hum Pathol* 2007;**38**;1676-1687.
226. Struyf S, Burdick MD, Peeters E *et al.* Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res* 2007;**67**;5940-5948.
227. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F *et al.* An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 2003;**197**;1537-1549.

228. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;**16**:593-609.
229. Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993;**178**:1057-1065.
230. Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol* 2005;**124**:37-48.
231. Yang J, Richmond A. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther* 2004;**9**:846-855.
232. Kouroumalis A, Nibbs RJ, Aptel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG. The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. *J Immunol* 2005;**175**:5403-5411.
233. Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S *et al.* Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* 2006;**66**:9509-9518.
234. Walser TC, Rifat S, Ma X *et al.* Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2006;**66**:7701-7707.
235. Zipin-Roitman A, Meshel T, Sagi-Assif O *et al.* CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2007;**67**:3396-3405.
236. Ehlert JE, Addison CA, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol* 2004;**173**:6234-6240.
237. Soejima K, Rollins BJ. A functional IFN-gamma-inducible protein-10/CXCL10-specific receptor expressed by epithelial and endothelial cells that is neither CXCR3 nor glycosaminoglycan. *J Immunol* 2001;**167**:6576-6582.
238. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2007;**2**:247-250.
239. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2003;**2**:S134-139.
240. Garber K. From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 2009;**101**:6-8.
241. Guenot D, Guerin E, Aguillon-Romain S *et al.* Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *J Pathol* 2006;**208**:643-652.
242. Lopez-Guerrero JA, Noguera R, Llombart-Bosch A. GIST: particular aspects related to cell cultures, xenografts, and cytogenetics. *Semin Diagn Pathol* 2006;**23**:103-110.
243. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N *et al.* A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:3989-3998.
244. Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer* 2004;**40**:802-820.
245. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:4227-4239.

246. Lydiatt WM, Murty VV, Davidson BJ *et al.* Homozygous deletions and loss of expression of the CDKN2 gene occur frequently in head and neck squamous cell carcinoma cell lines but infrequently in primary tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;**13**;94-98.
247. Whiteford CC, Bilke S, Greer BT *et al.* Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer Res* 2007;**67**;32-40.
248. Gil-Benso R, Martinez-Lorente A, Pellin-Perez A *et al.* Characterization of a new rat cell line established from 2'AAF-induced combined hepatocellular cholangiocellular carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001;**37**;17-25.
249. Gil-Benso R, Carda-Batalla C, Navarro-Fos S, Pellin-Perez A, Llombart-Bosch A. Cytogenetic study of a spindle-cell rhabdomyosarcoma of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;**109**;150-153.
250. Llombart-Bosch A, Carda C, Boix J, Pellin A, Peydro-Olaya A. Value of nude mice xenografts in the expression of cell heterogeneity of human sarcomas of bone and soft tissue. *Pathol Res Pract* 1988;**183**;683-692.
251. Llombart-Bosch A, Carda C, Peydro-Olaya A, Noguera R, Boix J, Pellin A. Pigmented esthesioneuroblastoma showing dual differentiation following transplantation in nude mice. An immunohistochemical, electron microscopical, and cytogenetic analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;**414**;199-208.
252. Llombart-Bosch A, Lopez-Guerrero JA, Carda Batalla C, Ruiz Suari A, Peydro-Olaya A. Structural basis of tumoral angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2003;**532**;69-89.
253. Lopez-Gines C, Carda-Batalla C, Lopez-Terrada L, Llombart-Bosch A. Presence of double minutes and monosomy 17p in xenografted human osteosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;**90**;57-62.
254. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 2001;**81**;803-814.
255. Noguera R, Machado I, Piqueras M *et al.* Tissue microarrays: applications in study of p16 and p53 alterations in Ewing's cell lines. *Diagn Pathol* 2008;**3 Suppl 1**;S27.
256. Noguera R, Villamon E, Berbegall A *et al.* Gain of MYCN region in a Wilms tumor-derived xenotransplanted cell line. *Diagn Mol Pathol* 2010;**19**;33-39.
257. Pellin A, Boix-Ferrero J, Carpio D *et al.* Molecular alterations of the RB1, TP53, and MDM2 genes in primary and xenografted human osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol* 1997;**6**;333-341.
258. Schrage YM, Machado I, Meijer D *et al.* COX-2 expression in chondrosarcoma: a role for celecoxib treatment? *Eur J Cancer* 2010;**46**;616-624.
259. Subramaniam MM, Calabuig-Farinas S, Pellin A, Llombart-Bosch A. Mutational analysis of E-cadherin, beta-catenin and APC genes in synovial sarcomas. *Histopathology* 2010;**57**;482-486.
260. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;**438**;932-936.
261. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2007;**26**;489-502.
262. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;**61**;253-270.
263. Liekens S, Bronckaers A, Perez-Perez MJ, Balzarini J. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;**74**;1555-1567.
264. Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev* 2003;**23**;117-145.

265. Koch AE. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;**62** **Suppl 2**:ii60-67.
266. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:639-648.
267. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**:57-70.
268. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;**9**:669-676.
269. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;**9**:685-693.
270. Iyer S, Acharya KR. Role of placenta growth factor in cardiovascular health. *Trends Cardiovasc Med* 2002;**12**:128-134.
271. Carmeliet P, Moons L, Luttun A *et al*. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;**7**:575-583.
272. Davis S, Aldrich TH, Jones PF *et al*. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;**87**:1161-1169.
273. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF *et al*. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;**277**:55-60.
274. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23**:2078-2093.
275. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;**97**:512-523.
276. Petit AM, Rak J, Hung MC *et al*. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;**151**:1523-1530.
277. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;**170**:3369-3376.
278. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M *et al*. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;**161**:1163-1177.
279. Brantley DM, Cheng N, Thompson EJ *et al*. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 2002;**21**:7011-7026.
280. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989;**56**:345-355.
281. Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 1995;**182**:219-231.
282. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y *et al*. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;**79**:315-328.
283. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;**88**:277-285.
284. van der Schaft DW, Toebes EA, Haseman JR, Mayo KH, Griffioen AW. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood* 2000;**96**:176-181.
285. Maeshima Y, Colorado PC, Torre A *et al*. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000;**275**:21340-21348.
286. Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 1986;**216**:154-164.

287. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004;**231**:474-488.
288. Djonov VG, Kurz H, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn* 2002;**224**:391-402.
289. Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1996;**51**:260-272.
290. Djonov V, Andres AC, Ziemiecki A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* 2001;**52**:182-189.
291. Asahara T, Murohara T, Sullivan A *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;**275**:964-967.
292. Kalka C, Masuda H, Takahashi T *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:3422-3427.
293. Heissig B, Hattori K, Dias S *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;**109**:625-637.
294. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C *et al.* Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;**9**:1370-1376.
295. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M *et al.* Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* 2003;**197**:1755-1765.
296. Deb A, Skelding KA, Wang S, Reeder M, Simper D, Caplice NM. Integrin profile and in vivo homing of human smooth muscle progenitor cells. *Circulation* 2004;**110**:2673-2677.
297. Chavakis E, Hain A, Vinci M *et al.* High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2007;**100**:204-212.
298. Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med* 1995;**182**:1337-1343.
299. Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 2002;**3**:143-150.
300. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U *et al.* In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;**95**:3106-3112.
301. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Heibel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;**105**:71-77.
302. Asahara T, Masuda H, Takahashi T *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;**85**:221-228.
303. Lyden D, Hattori K, Dias S *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;**7**:1194-1201.
304. Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W *et al.* Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 2003;**4**:277-289.
305. Larrivee B, Niessen K, Pollet I *et al.* Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature. *J Immunol* 2005;**175**:2890-2899.

306. Peters BA, Diaz LA, Polyak K *et al.* Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005;**11**;261-262.
307. Wesseling P, van der Laak JA, de Leeuw H, Ruiter DJ, Burger PC. Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections. *J Neurosurg* 1994;**81**;902-909.
308. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;**1**;149-153.
309. 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.
310. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;**284**;1994-1998.
311. Zhang L, Yang N, Park JW *et al.* Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;**63**;3403-3412.
312. Kim ES, Serur A, Huang J *et al.* Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**;11399-11404.
313. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**;411-421.
314. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N *et al.* Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001;**61**;6322-6327.
315. Seftor EA, Brown KM, Chin L *et al.* Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 2005;**65**;10164-10169.
316. van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P *et al.* Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005;**65**;11520-11528.
317. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R *et al.* The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;**100**;1389-1398.
318. Thies A, Mangold U, Moll I, Schumacher U. PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 2001;**195**;537-542.
319. Lee YJ, Nagai N, Siar CH *et al.* Angioarchitecture of primary oral malignant melanomas. *J Histochem Cytochem* 2002;**50**;1555-1562.
320. Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y *et al.* Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 2002;**62**;560-566.
321. Sharma N, Seftor RE, Seftor EA *et al.* Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002;**50**;189-201.
322. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS *et al.* Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001;**158**;1279-1288.
323. Sun B, Zhang S, Zhang D *et al.* Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006;**16**;693-698.

324. Fujimoto A, Onodera H, Mori A, Nagayama S, Yonenaga Y, Tachibana T. Tumour plasticity and extravascular circulation in ECV304 human bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2006;**26**;59-69.
325. Sun B, Zhang S, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* 2004;**25**;1609-1614.
326. Cai XS, Jia YW, Mei J, Tang RY. Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chin Med J (Engl)* 2004;**117**;94-98.
327. Favier J, Plouin PF, Corvol P, Gasc JM. Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *Am J Pathol* 2002;**161**;1235-1246.
328. Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**;16069-16074.
329. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T *et al.* Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**;3566-3570.
330. Banerji S, Ni J, Wang SX *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;**144**;789-801.
331. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;**154**;385-394.
332. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002;**16**;773-783.
333. Joukov V, Kumar V, Sorsa T *et al.* A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 1998;**273**;6599-6602.
334. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S *et al.* Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;**25**;2441-2449.
335. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K *et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;**5**;74-80.
336. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001;**20**;4762-4773.
337. Nagy JA, Vasile E, Feng D *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;**196**;1497-1506.
338. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F *et al.* Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**;11658-11663.
339. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P *et al.* PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 2004;**6**;333-345.
340. Anan K, Morisaki T, Katano M *et al.* Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 1996;**119**;333-339.
341. Gale NW, Thurston G, Hackett SF *et al.* Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002;**3**;411-423.

342. Kajiyi K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J* 2005;**24**;2885-2895.
343. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ *et al*. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**;15593-15598.
344. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;**175**;409-416.
345. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;**18**;4-25.
346. Marx J. Angiogenesis. A boost for tumor starvation. *Science* 2003;**301**;452-454.
347. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;**438**;967-974.
348. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W *et al*. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;**350**;2335-2342.
349. Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P *et al*. Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2001;**61**;6624-6628.
350. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;**438**;946-953.
351. Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002;**295**;1526-1528.
352. Glade Bender J, Cooney EM, Kandel JJ, Yamashiro DJ. Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2004;**7**;289-300.
353. Hida K, Hida Y, Amin DN *et al*. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 2004;**64**;8249-8255.
354. Streubel B, Chott A, Huber D *et al*. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2004;**351**;250-259.
355. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME *et al*. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;**7**;186-191.
356. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ *et al*. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001;**61**;1786-1790.
357. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 2010;**60**;222-243.
358. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol* 2010;**588**;257-270.
359. Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* 2001;**158**;419-429.
360. Cronin M, Pho M, Dutta D *et al*. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004;**164**;35-42.
361. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**;402-408.
362. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999;**270**;41-49.
363. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;**46**;69-81.

364. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Lopez-Guerrero JA *et al.* Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab Invest* 2003;**83**;877-887.
365. Mosakhani N, Guled M, Leen G *et al.* An integrated analysis of miRNA and gene copy numbers in xenografts of Ewing's sarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;**31**;24.
366. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013;**501**;355-364.
367. Berghuis D, Schilham MW, Santos SJ *et al.* The CXCR4-CXCL12 axis in Ewing sarcoma: promotion of tumor growth rather than metastatic disease. *Clin Sarcoma Res* 2012;**2**;24.
368. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006;**42**;768-778.
369. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;**3**;416-428.
370. Vermeulen J, Ballet S, Oberlin O *et al.* Incidence and prognostic value of tumour cells detected by RT-PCR in peripheral blood stem cell collections from patients with Ewing tumour. *Br J Cancer* 2006;**95**;1326-1333.
371. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;**130**;1466-1478.
372. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2013.
373. Mabweesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2007;**22**;559-572.
374. Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005;**5**;84.
375. van Vlierberghe RL, Sandel MH, Prins FA *et al.* Four-color staining combining fluorescence and brightfield microscopy for simultaneous immune cell phenotyping and localization in tumor tissue sections. *Microsc Res Tech* 2005;**67**;15-21.
376. Katschke KJ, Jr., Rottman JB, Ruth JH *et al.* Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;**44**;1022-1032.
377. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;**63**;1164-1171.
378. Pradelli E, Karimjee-Soilihi B, Michiels JF *et al.* Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer* 2009;**125**;2586-2594.
379. Mueller A. Internalization: what does it tell us about pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an antagonist? *Br J Pharmacol* 2007;**152**;1145-1146.
380. Pinto S, Martinez-Romero A, O'Connor JE *et al.* Intracellular coexpression of CXC- and CC- chemokine receptors and their ligands in human melanoma cell lines and dynamic variations after xenotransplantation. *BMC Cancer* 2014;**14**;118.
381. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 2006;**176**;1517-1524.
382. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 2003;**8**;345-352.

383. Killian PH, Kronski E, Michalik KM *et al.* Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* 2012;**33**;2507-2519.
384. Staeger MS, Hansen G, Baersch G, Burdach S. Functional and molecular characterization of interleukin-2 transgenic Ewing tumor cells for in vivo immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2004;**43**;23-34.
385. De Angulo G, Hernandez M, Morales-Arias J *et al.* Early lymphocyte recovery as a prognostic indicator for high-risk Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;**29**;48-52.
386. Bedognetti D, Spivey TL, Zhao Y *et al.* CXCR3/CCR5 pathways in metastatic melanoma patients treated with adoptive therapy and interleukin-2. *Br J Cancer* 2013;**109**;2412-2423.
387. Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM *et al.* Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology* 2009;**137**;309-319, 319 e301-303.
388. Kaya M, Wada T, Nagoya S, Sasaki M, Matsumura T, Yamashita T. The level of vascular endothelial growth factor as a predictor of a poor prognosis in osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Br* 2009;**91**;784-788.
389. Duda DG, Jain RK. Premetastatic lung "niche": is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required? *Cancer Res* 2010;**70**;5670-5673.
390. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008;**15**;621-627.
391. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF *et al.* Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**;309-314.
392. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**;630-638.
393. Quaegebeur A, Segura I, Carmeliet P. Pericytes: blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration? *Neuron* 2010;**68**;321-323.
394. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;**8**;235-253.
395. Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW *et al.* The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008;**118**;3355-3366.
396. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**;592-603.
397. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* 2009;**16**;209-221.
398. Na KY, Kim HS, Jung WW *et al.* CXCL16 and CXCR6 in Ewing sarcoma family tumor. *Hum Pathol* 2014.
399. Tsang JY, Ni YB, Chan SK *et al.* CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013;**140**;495-504.
400. Liu Q, Rexiati M, Yang Y *et al.* Expression of chemokine receptor 4 was associated with poor survival in renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2014;**31**;882.
401. Longo-Imedio MI, Longo N, Trevino I, Lazaro P, Sanchez-Mateos P. Clinical significance of CXCR3 and CXCR4 expression in primary melanoma. *Int J Cancer* 2005;**117**;861-865.
402. Monteagudo C, Martin JM, Jorda E, Llombart-Bosch A. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. *J Clin Pathol* 2007;**60**;596-599.

403. Fisher C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology* 2011;**58**;1001-1012.
404. Yu L, Su B, Hollomon M, Deng Y, Facchinetti V, Kleinerman ES. Vasculogenesis driven by bone marrow-derived cells is essential for growth of Ewing's sarcomas. *Cancer Res* 2010;**70**;1334-1343.
405. DuBois SG, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and vascular targeting in Ewing sarcoma: a review of preclinical and clinical data. *Cancer* 2010;**116**;749-757.
406. Reddy K, Zhou Z, Jia SF *et al*. Stromal cell-derived factor-1 stimulates vasculogenesis and enhances Ewing's sarcoma tumor growth in the absence of vascular endothelial growth factor. *Int J Cancer* 2008;**123**;831-837.
407. Li Y, Flores R, Yu A *et al*. Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients. *Cancer* 2011;**117**;207-217.
408. Huang CY, Lee CY, Chen MY *et al*. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways. *J Cell Physiol* 2009;**221**;204-212.
409. Baumhoer D, Smida J, Zillmer S *et al*. Strong expression of CXCL12 is associated with a favorable outcome in osteosarcoma. *Mod Pathol* 2012;**25**;522-528.
410. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer* 2010;**9**;17.
411. Schwager J, Hoeller U, Wolfram S, Richard N. Rose hip and its constituent galactolipids confer cartilage protection by modulating cytokine, and chemokine expression. *BMC Complement Altern Med* 2011;**11**;105.
412. Tang CH, Yamamoto A, Lin YT, Fong YC, Tan TW. Involvement of matrix metalloproteinase-3 in CCL5/CCR5 pathway of chondrosarcomas metastasis. *Biochem Pharmacol* 2010;**79**;209-217.
413. Do K, Doroshow JH, Kummar S. Antiangiogenic approaches for the treatment of advanced synovial sarcomas. *Curr Opin Oncol* 2012;**24**;425-430.
414. Zhao Y, Wang Q, Deng X. Altered angiogenesis gene expression in gastrointestinal stromal tumors: potential use in diagnosis, outcome prediction, and treatment. *Neoplasma* 2012;**59**;384-392.
415. Wada Y, Shimada K, Kimura T, Ushiyama S. Novel p38 MAP kinase inhibitor R-130823 suppresses IL-6, IL-8 and MMP-13 production in spheroid culture of human synovial sarcoma cell line SW 982. *Immunol Lett* 2005;**101**;50-59.
416. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;**3**;24-40.
417. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* 2009;**20**;158-163.
418. Jain RK, Duda DG, Willett CG *et al*. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;**6**;327-338.
419. Josko J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit* 2004;**10**;RA89-98.