

Angiogénesis en carcinoma invasivo de mama: un estudio prospectivo de heterogeneidad tumoral

J. Ahlgren^a, B. Risberg^b, K. Villman^a, J. Bergh^c

^aDepartamento de Oncología, Hospital Medical Centre, Örebro, Suecia

^bDepartamento de Patología, Hospital Medical Centre, Örebro, Suecia

^cDepartamento de Oncología, Akademiska sjukhuset, Uppsala, Suecia

Aceptado: 16 agosto 2001

Resumen

Se ha informado de que la angiogénesis es un factor pronóstico independiente en cáncer de mama, mientras que otros estudios han sido negativos. En este trabajo se investiga prospectivamente el grado de heterogeneidad de microvasos intratumorales y la posible influencia en los resultados. Se cortaron seis secciones de 4µ de 21 cánceres de mama invasivos. Las secciones (n=126) fueron teñidas inmunohistoquímicamente con un anticuerpo monoclonal CD31 (JC70). En cada sección, se identificaron tres áreas con la neovascularización más intensa (puntos calientes) y la densidad de microvasos (DMV) se obtuvo contando vasos a un aumento de 200x. La variación entre secciones contribuyó más en la varianza total que la variación entre distintos tumores: 45,0 y 37,3%, respectivamente, de acuerdo con un análisis ANOVA. Las comparaciones apareadas de dos secciones a un tiempo, del mismo tumor, mostraron una concordancia en el 59,0% (95% Intervalo de Confianza (IC): (55,3-62,8), con referencia a un nivel de corte tentativo. Se demuestra que la evaluación de DMV en puntos calientes es cuestionable para medir la angiogénesis debido a la considerable heterogeneidad intratumoral. © 2002 Elsevier Science Ltd. Todos los derechos están reservados.

Palabras clave: Cáncer de mama; Angiogénesis; Inmunohistoquímica; Heterogeneidad.

Introducción

La angiogénesis, es decir, la capacidad del tumor para inducir la formación de vasos sanguíneos nuevos en el estroma del tumor, es un requisito previo para el crecimiento tumoral [1]. Los vasos sanguíneos del tumor pueden ser visualizados con tinciones inmunohistoquímicas de secciones del mismo, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de células endoteliales. La mayoría de investigadores han utilizado un anticuerpo contra un antígeno relacionado con el factor VIII (FVIIIIRag), expresado mediante células endoteliales, o un anticuerpo (JC70) hacia la molécula de adhesión plaqueta/célula endotelial (MAPCE) o CD31 [2]. En la comparación entre aquellos dos marcadores, se ha afirmado que CD31 tiene una sensibilidad superior [3-5].

Varios estudios han demostrado que la densidad de microvasos (DMV) puede predecir de forma independien-

te un pronóstico pobre, en cáncer de mama operable [3-8], incluyendo pacientes con ganglios linfáticos negativos [8-12]. Sin embargo, algunos autores no pudieron hallar ningún valor pronóstico en ensayos sobre angiogénesis [13-18].

Una razón importante para los resultados contradictorios, bien pueden ser problemas metodológicos. Mientras que la variabilidad interobservador parece manejable [19], algunos informes afirman que la heterogeneidad intratumoral es un aspecto más problemático [15].

La capacidad del observador para identificar las áreas de mayor densidad vascular, lo cual es un paso importante en la metodología [2, 20], es muy probable que dependa en parte de la heterogeneidad intratumoral.

Debido a resultados contradictorios en la literatura, el objetivo de este estudio era investigar si el patrón angiogénico intratumoral demostraba una variación significativa que pudiera influir en los resultados. Por lo tanto, analiza-

mos meticulosamente 21 cánceres primarios de mama consecutivos.

Pacientes y métodos

En el Departamento de Patología de Örebro, se recibieron veintidós carcinomas invasivos de mama en muestras frescas, durante mayo a octubre de 1994. No se aceptaba ningún tratamiento preoperatorio del cáncer de mama. Todo el tumor fue seccionado en cortes de 5 mm. La fijación tuvo lugar durante la noche en una solución tampón de formaldehído al 4%. Después de deshidratación, se incluyó completamente todo el material tumoral en parafina. Se realizó una tinción de todos los tumores con hematoxilina y eosina (H&E), para la evaluación rutinaria del tipo y grado histológicos [21].

De cada tumor se obtuvieron de dos a 15 bloques. Se cortaron seis secciones de 4μ por tumor; es decir, el mismo número de secciones por tumor sin reparar en el tamaño del mismo (Fig. 1). Secciones de distintos niveles dentro de uno o más bloques, fueron cortadas de tumores con menos de seis bloques. En todos los casos, las secciones fueron separadas tan amplia y uniformemente como era posible, dentro de los tumores, con una distancia mínima de 1,5 mm. La posición de todas las secciones dentro del tumor, fue registrada y etiquetada como A-F.

La decisión de analizar seis secciones por tumor se debió al hecho de que un incremento en el número de secciones aumentaría considerablemente la extensión del tiempo gastado para el proceso de contar vasos. Nosotros también lo consideramos arbitrariamente razonable al creer

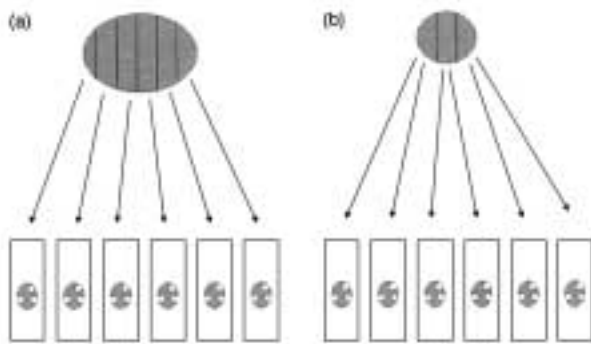


Fig. 1. Ejemplo de cómo se manejan los tumores. Se seccionaron en cortes de 5 mm. Todo el material tumoral fue incluido en parafina de manera que se obtuvieron 2-15 bloques de cada tumor. Se cortaron seis secciones de 4μ por tumor. Del tumor con seis bloques (a), se cortó una sección de cada uno. De tumores con más de seis bloques, las seis secciones se cortaron de seis bloques distintos, que fueron escogidos para asegurar que las secciones fueran separadas lo más amplia y uniformemente posible. De tumores con menos de seis bloques (b), las secciones se cortaron de distintas áreas dentro de uno o más bloques. Las secciones fueron separadas lo más amplia y regularmente posible, con una distancia mínima de 1,5 mm.

que seis secciones por tumor serían suficientes para detectar un grado significativo de variación intratumoral.

Evaluación de la vascularización

Se tiñeron seis secciones de 4μ de cada tumor, con un anticuerpo monoclonal contra CD31 (JC70 Dako AS Glostrup, Dinamarca) etiquetado con el método ABC (Dako Duet kit, DAKO AS Glostrup, Dinamarca). Las secciones fueron predigeridas con tripsina (Chymotrypsin Sigma, Estocolmo Suecia) durante 30 min a 37°C . Después de lavarlas con Tris-tamponado salino (TBS), las secciones fueron pre-incubadas con suero normal de cabra durante 10 min, para impedir una tinción inespecífica antes de que el anticuerpo JC70 fuera aplicado durante 30 min. Después de lavar con TBS, se aplicó el anticuerpo anti-ratón/conejo biotinilado de cabra, durante 30 min, el lavado con TBS se repitió antes de que el complejo strept-avidina-biotin peroxidasa-conjugado se añadiera a las secciones durante 30 min. El color fue inducido mediante la adición de donador de electrón diaminobenzidina (DAB) durante 10 min. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer.

Recuento de vasos

Todas las secciones fueron codificadas y barajadas para asegurar una evaluación ciega. La evaluación de DMV siguió el procedimiento recomendado en una visión de conjunto reciente [2]. La calidad de la tinción intratumoral fue juzgada utilizando vasos sanguíneos del tejido mamario benigno adyacente como controles positivos internos. Las áreas más vascularizadas del tejido tumoral, fueron localizadas a bajo aumento (10x oculares con 4x y 10x objetivos). Los vasos se contaron en tres campos de $200\times$ ($0,72\text{ mm}^2$). Los microvasos de zonas escleróticas dentro del tumor y áreas inmediatamente adyacentes de tejido mamario normal, no fueron considerados. Cualquier célula endotelial teñida de marrón o acumulación de células endoteliales que estaba separada de los microvasos adyacentes, fue considerada como un simple microvaso contable. Todos los cortes fueron evaluados simultáneamente por dos observadores, utilizando un microscopio de conferencia.

Análisis estadístico

Utilizamos la Statistica software (Statsoft, OK, EE.UU.) para el cálculo de la desviación estándar, intervalos de confianza (IC), y el test-*t* de dos lados, independiente, para comparaciones entre grupos. La variabilidad de DMV entre distintas secciones del mismo tumor, fue expresada mediante el coeficiente de variación (CV), el cual viene definido como $100\times$ la desviación estándar dividido por la media. Un ANOVA (Statistica software) fue utilizado para

analizar la proporción de la varianza total a que contribuyó cada nivel de muestreo. Para este análisis consideramos casos, intersección e intrasección como tres niveles en un modelo jerárquico; los casos constituyeron el nivel más alto en el cual el nivel de intersección fue colocado. Luego, el nivel más bajo, intrasección, fue ubicado en el nivel de intersección. Si un método está para detectar diferencias significativas entre los distintos tumores, la varianza relativa del nivel caso, tiene que ser claramente más grande que la de niveles metodológicos, es decir, intersección e intrasección.

Resultados

Mediana de edad de las pacientes fue de 69 años (intervalo 35-88 años). El tamaño mediano de los 21 tumores, fue de 20 mm (intervalo 10-40 mm). En la Tabla 1 se muestran status de ganglios linfáticos, tipo histológico y grado del tumor, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En 5 pacientes, la calidad de inmunotinción no fue juzgada como satisfactoria en una parte de las seis secciones (Tabla 2). Las ocho secciones con una tinción cuestionable, fueron teñidas una segunda vez con una sección tumoral altamente vascularizada como control positivo; ninguna de ellas resultó para ser evaluable mediante este proceso.

Medidas de variación

La media de todas las DMVs (n=345) fue 82,5/200XHPF (mediana 75, intervalo 21-196). La media de las puntuaciones más altas de cada sección (n=115), fue 93,3 (mediana 86,5, intervalo 40-196). La media de la puntuación más alta de cada tumor (n=21), fue 128,4 (mediana

120, intervalo 87-196) (Tabla 2). Se realizó un ANOVA de componentes de varianza, para evaluar la contribución de los tres niveles de muestreo a la varianza total. El nivel más alto del modelo jerárquico, los distintos tumores, contribuyó con un 37,3% de la varianza total. Las cifras correspondientes para niveles metodológicos, niveles de intersección e intrasección, fueron 45,0 y 17,7, respectivamente. De este modo, la variación entre distintas secciones de los tumores, contribuyó más a la varianza total que la variación entre distintos tumores. La DMV más alta de cada sección fue trazada para visualizar la heterogeneidad intratumoral (Fig. 2a). El CV de todas las puntuaciones máximas por sección dentro de cada tumor, fue 23,7% (10,9-45,9). Si se utilizaban las medias de las tres lecturas de cada corte, los resultados de los análisis eran similares a los obtenidos con la DMV máxima (Fig. 2b).

La variabilidad en la intersección puede ejemplificarse más por el hecho de que la media de todas puntuaciones más altas de cada tumor fue sobrepasada con >20% por el recuento más alto, en 19/21 casos. El CV fue analizado en distintos subgrupos con referencia a tamaño del tumor (≤ 20 mm *versus* >21 mm) y número de bloques obtenidos (2-5 bloques *versus* >5). En este análisis se utilizó el test-t de dos lados independiente, pero no se pudo hallar ninguna diferencia.

Tabla 1

Características de pacientes y tumores	
Edad, mediana (años)	69 (intervalo 35-88)
Tamaño del tumor, mediana (mm)	20 (intervalo 10-40)
Tipo de cirugía (%)	
Mastectomía	9 (43)
Conservadora de la mama	12 (57)
Status ganglionar, números (%)	
Negativo	11 (52)
Positivo	8 (38)
No evaluado	2 (10)
Tipo histológico	
Ductal	18 (86)
Lobular	1 (5)
Medular	1 (5)
Mucinoso	1 (5)
Grado histológico, de acuerdo con la OMS, de carcinomas intraductales	
Grado 1	3 (17)
Grado 2	8 (44)
Grado 3	7 (39)

OMS, Organización Mundial de la Salud

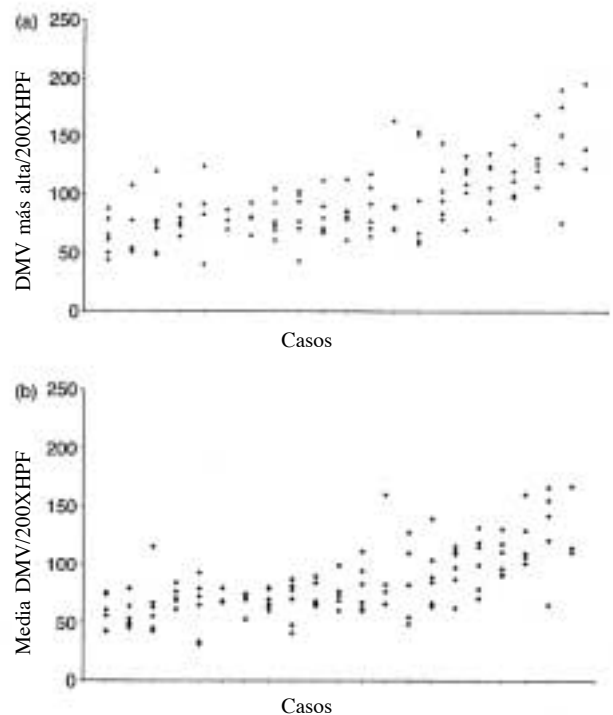


Fig. 2. (a) Se trazan las DMVs más altas de todas las secciones evaluables (n=115). Cada marca en el eje-X representa un tumor. Los tumores son ordenados por media de densidad de microvasos (DMV) creciente. (b) Se trazan las medias de tres densidades de microvasos (DMVs) de un punto caliente, dentro de cada sección evaluable (n= 115). Cada marca en el eje-X representa un tumor. Los tumores son ordenados por media de DMV creciente.

Tabla 2

DMV más alta en las 115 secciones evaluables: los tumores están ordenados desde la media de DMV más baja (parte superior) hasta la más alta (parte inferior)

T-tamaño (mm)	Bloques no.	Secciones, más altas de tres recuentos						Media (A-F)	CV%
		A	B	C	D	E	F		
15	4	44	50	88	65	79	61	64,5	26,0
10	2	51	53	54	54	78	108	66,3	34,3
22	5	48	71	75	78	120	50	73,7	35,4
19	5	91	76	73	64	80	64	74,7	13,8
15	3	83	40	83	92	125	40	77,2	42,3
10	3	^b	^b	70	87	^a	78	78,3	10,9
22	7	^a	^a	65	81	93	80	79,8	14,4
28	6	61	77	105	93	70	74	80,0	20,2
20	3	100	43	71	94	103	77	81,3	27,9
16	5	69	67	71	80	90	112	81,5	21,1
11	2	79	113	61	86	81	85	84,2	19,9
17	7	64	77	106	92	118	71	88,0	24,0
29	7	70	89	71	90	^a	164	96,8	40,0
35	7	152	95	155	61	58	67	98,0	45,9
30	4	84	145	121	95	79	103	104,5	23,7
11	5	134	122	70	102	109	119	109,3	20,3
22	4	94	80	106	125	123	136	110,7	19,1
21	5	120	98	100	112	144	99	112,2	15,9
15	3	169	^b	127	132	121	107	131,2	17,6
30	15	76	176	191	128	152	^a	144,6	31,3
40	10	^a	^a	123	^a	140	196	153,0	25,0

DMV, densidad de microvasos; CV%, % coeficiente de variación.

Media (A-F) es el valor medio de las puntuaciones más altas.

^aSección no teñida adecuadamente.

^bNo cáncer invasivo dentro de la sección.

Aplicación de cortes potenciales

Para convertirse en clínicamente útil, un factor tal como DMV, se suele dicotomizar en una categoría de DMV alta y una de DMV baja. En este análisis, nosotros elegimos la mediana de todas las puntuaciones más altas (86,5/200XHPF) de cada sección (n=115) como un nivel de corte tentativo, el cual fue aplicado a las puntuaciones de cada nivel de sección (A-F). De esta forma, tuvimos seis grupos de puntuaciones dicotomizadas, representado cada uno, una parte diferente de los tumores. Luego comparamos los resultados de un grupo de secciones con un segundo grupo de secciones (A-B; A-C; A-D; A-E; A-F; B-C, etc.) y calculamos la proporción de tumores para los que ambos resultados de un par, concordaban con respecto al nivel de corte.

De este modo, se realizaron quince comparaciones para cada uno de los 21 tumores. En estas comparaciones apareadas, la proporción media de resultados concordantes fue del 59,0% [95% IC (55,3:62,8)]. El resultado era similar si se escogía el tercil superior (101,3/200XHPF) como un nivel de corte, 64,7% [95% IC (60,0:69,5)]. Este ejemplo muestra que más de un tercio de las estimaciones dicotomizadas cambiarán de alto a bajo o de bajo a alto, si el análisis se realiza en una segunda sección de otra parte del tumor.

Los resultados de este análisis no cambiaron si se suprimían las dos secciones más periféricas (A y F).

Discusión

Este estudio demuestra que existe una marcada variación intratumoral de neovascularización. En el análisis ANOVA, la variación entre distintas secciones contribuyó más a la varianza total que la variación entre distintos tumores. Esto significa que existe un riesgo de que un resultado de una evaluación de DMV en una mancha caliente esté más influido por el proceso de muestreo que por la verdadera capacidad angiogénica del tumor.

La influencia de la heterogeneidad intratumoral sobre los resultados ha sido tenida en cuenta en estudios previos pero, como se observa más abajo, no ha habido ninguna forma estandarizada de diseño o registro de estudios sobre heterogeneidad. En un estudio en el que se utilizaba una única sección de 220 tumores de mama, Axelsson y co-autores [15] no pudieron encontrar ningún valor pronóstico de DMV. Llegaron a la conclusión de que esto se debía principalmente a la variabilidad de un campo a otro dentro de la misma sección. La diferencia entre el promedio de la puntuación y la puntuación máxima excedió el 20%, en el 49% de casos. La cifra correspondiente en nuestro estudio, fue una diferencia de más del 20%, en el 19% de secciones (n=115). Al contrario del estudio de Axelsson y colegas, en nuestro estudio se investigó la variabilidad entre múltiples secciones de cada tumor, la cual mostró ser incluso más pronunciada que la variación dentro de cada sección. Un hallazgo que está de acuerdo con un estudio holandés [22], en el cual se utilizaron todos los bloques disponibles [2-4] de 10 cánceres de mama. Sus datos mostraron que la variación entre bloques contribuía más a la variación total que la variación entre tumores, lo cual es idéntico a nuestros resultados. Los CVs para diferentes bloques del mismo tumor, en el estudio holandés, oscilaron de 5,7 a 54,9%. Aunque la técnica de muestreo no fue idéntica a la de nuestro estudio, el intervalo correspondiente de CVs en nuestro material, basado en dos veces más casos, es bastante similar (10,9-45,9%).

Bosari y co-autores [7] examinaron todos los bloques disponibles (un promedio de tres) de 120 tumores. Se registraron las tres puntuaciones más altas de todos los cortes. Observaron que la heterogeneidad es una dificultad potencial, en el 14% de los casos la diferencia entre el promedio y la puntuación máxima fue de más del 20%. Sin embargo, no queda claro si esta variación moderada era predominantemente el resultado de una heterogeneidad intra o intersección.

Otro importante estudio metodológico en 40 cánceres primarios de mama [19] se concentró en la reproducibilidad de distintos procedimientos de recuento. Hansen y colaboradores hallaron que, el 78% de la varianza total era debida a la variación biológica entre los distintos tumores,

mientras que el 22% se debía a una variación metodológica e intratumoral. Ya que la variación intertumoral era el principal contribuyente a la varianza total, sin reparar en el método de recuento, Hansen y colaboradores respaldaron el uso continuado de DMV en futuros estudios de pronóstico. Sin embargo, la relevancia de estos hallazgos no queda clara ya que el grupo danés seleccionó 40 tumores archivados para obtener distintos grados de DMV, lo cual pudo llevar a una sobreestimación de la variación intertumoral. Además, su estimación de un grado moderado de heterogeneidad intratumoral, está basada en una sección por caso. La mayoría de estudios que utilizan secciones de más de un bloque [14, 22], incluyendo este estudio, han demostrado un alto grado de variación intratumoral. Esto respalda el punto de vista de que la heterogeneidad intratumoral es la explicación más razonable para justificar los datos contradictorios sobre la utilidad de DMV como factor pronóstico.

Se ha argumentado que la probabilidad de encontrar los puntos calientes, puede estar incrementada mediante el recuento de los 10 campos aparentemente más altos [23], esta sugerencia parece estar apoyada por nuestros hallazgos. El problema de este enfoque es que si uno cuenta un gran número de manchas calientes aparentes, es probable que asuma una alta puntuación en la mayoría de tumores. En nuestro material, todos los tumores tenían como mínimo una puntuación por encima de la mediana de DMV de las 115 secciones.

En nuestro estudio, más de un tercio de los tumores, tenían una clasificación discordante respecto a los niveles de corte, si se comparaban dos secciones de distintas partes de los mismos. Anteriormente, se ha dirigido hacia la reproducibilidad de la asignación a grupos de DMV alta o baja, cuando se realiza el muestreo de distintos bloques [14, 23]. Van Hoef y colaboradores [14], analizaron retrospectivamente la DMV en 93 cánceres de mama, sin hallar ninguna información pronóstica independiente. En 41 de los tumores, DMV fue evaluada en dos secciones de dos bloques diferentes. Esta comparación mostró una concordancia respecto a categorías de DMV del 71-78%. Aunque sus cifras son ligeramente superiores a las nuestras, los autores concluyeron que este grado moderado de concordancia podía introducir un considerable error en el método. Otro estudio inglés [23], incluía un análisis de tres bloques diferentes de cada tumor. Como el 85% de los pacientes fueron asignados correctamente a los grupos de DMV alta y baja, sin reparar en si se tenían en cuenta una o tres secciones, llegaron a la conclusión de que la DMV medida en una sección, es representativa de toda la vascularización del tumor. Incluso si la cifra presentada por Martin y colaboradores es algo mejor que la presentada por Van-Hoef y co-autores y por nosotros, aún es obvio que las diferencias intratumorales entre distintas partes de los tumores, constituyen una fuente fundamental de error, cuando los tumores se agrupan de acuerdo con un nivel de corte. Además, la introducción de un nivel de corte y, de este modo, dicoto-

mizar una variable continua, está asociado con una pérdida de información. Además, la selección de un nivel de corte no sesgado, puede ser problemática [24]. Sin embargo, la mayoría de estudios publicados sobre angiogénesis como un factor pronóstico en cáncer de mama, presentan datos dicotomizados, y esta es la principal razón por la que nosotros hicimos un análisis de la concordancia con respecto a la clasificación en DMV alta y baja, de distintas secciones del mismo tumor del estudio.

Un problema de nuestro estudio, fue el fracaso en teñir satisfactoriamente todas las secciones. En total, fueron ocho secciones (6,3%) las que fueron juzgadas como inadecuadas (Tabla 2). Se ha informado de hasta un 13% de tinciones inadecuadas, utilizando anticuerpos contra CD31 [5]. Probablemente, el factor VIIIIRag es algo más fiable, con tinciones inadecuadas en el intervalo de 1-4% [5, 7]. Un artículo también informó que el anticuerpo CD34 era más fiable, cuando se comparaba con CD31 [5], mientras que otro grupo prefería el uso de este último [3]. Así, aun está en debate el tema de qué anticuerpo utilizar.

Aunque este estudio trata algunos de los problemas asociados con la evaluación de la vascularización tumoral, existe una evidencia clara de que la angiogénesis es un paso necesario en la progresión de tumores sólidos [25]. También se ha demostrado que inhibidores específicos de la angiogénesis pueden causar una regresión del tumor [26], y potenciar otras terapias contra el cáncer [27]. Estos hechos sugieren que la evaluación de la neovascularización en tumores sólidos primarios, debe tener el potencial de convertirse en un factor pronóstico útil. Otros enfoques, tales como análisis de péptidos angiogénicos [28-30], merecen más investigaciones.

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que el método de evaluación más extendido, DMV en manchas calientes, es cuestionable debido a una considerable heterogeneidad intratumoral. Los métodos de evaluación de la angiogénesis en tumores tienen que mejorar antes de que se puedan aplicar de rutina en patología.

Agradecimientos

Este estudio recibió el apoyo de becas del *Research Committee of Örebro County Council*, y de la *Swedish Cancer Society*. Agradecemos a Marlene Forslund por la ayuda de secretaría, y a Marit Hoolmqvist por el asesoramiento estadístico. Apreciamos los valiosos comentarios del Profesor Lars Holmberg.

Referencias

1. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* 1994, **12**, 441-443.
2. Gasparini G, Harris A. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995, **13**, 765-782.

3. Horak E, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992, **340**, 1120-1124.
4. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993, **55**, 371-374.
5. Martin L, Green B, Renshaw C, et al. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1997, **76**, 1046-1054.
6. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992, **84**, 1875-1887.
7. Bosari S, Lee A, DeLellis R, Wiley B, Heatley G, Silverman M. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992, **23**, 755-761.
8. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000, **6**, 139-146.
9. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994, **12**, 454-466.
10. Fox S, Leek R, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris A. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas-relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res Treat* 1994, **29**, 109-116.
11. Heimann R, Ferguson D, Powers C, Recant W, Weichselbaum R, Hellman S. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**, 1764-1769.
12. Gasparini G, Toi M, Verderio P, et al. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol* 1998, **12**, 1117-1125.
13. Hall N, Fish D, Hunt N, Goldin R, Guillou P, Monson J. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992, **1**, 223-229.
14. Van Hoef M, Knox W, Dhese S, Howell A, Schor A. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993, **29A**, 1141-1145.
15. Axelsson K, Ljung B, Moore 2nd D, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**, 997-1008.
16. Costello P, McCann A, Carney D, Dervan P. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995, **26**, 1181-1184.
17. Siitonen S, Haapasalo H, Rantala I, Helin H, Isola J. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 1995, **8**, 745-752.
18. Morphopoulos G, Pearson M, Ryder WD, Howell A, Harris M. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast (see comments). *J Pathol* 1996, **180**, 44-49.
19. Hansen S, Grabau DA, Rose C, Bak M, Sorensen FB. Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. *Lab Invest* 1998, **78**, 1563-1573.
20. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria evaluation. *Eur J Cancer* 1996, **32A**, 2474-2484.
21. World Health Organization. *Histological Typing of Breast Tumours. International Histological Classification of Tumours*. Geneva, World Health Organization, 1981, 19.
22. de Joog J, van Diest P, Baak J. Methods in laboratory investigation. Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab Invest* 1995, **73**, 922-926.
23. Martin L, Holcombe C, Green B, Leinster SJ, Winstanley J. Is a histological section representative of whole tumour vascularity in breast cancer? *Br J Cancer* 1997, **76**, 40-43.
24. Simon R, Altman DG. Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. *Br J Cancer* 1994, **69**, 979-985.
25. Fidler I, Ellis L. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994, **79**, 185-188.
26. Kim K, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993, **362**, 841-844.
27. Teicher B, Holden S, Ara G, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994, 920-925.
28. Gasparini G, Toi M, Gion M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997, **89**, 139-147.
29. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998, **16**, 3129-3136.
30. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in nodenegative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998, **16**, 3121-3128.