

ANGIOGENESIS Y PROLIFERACION EN TUMORES MALIGNOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL HUMANO

ANGIOGENESIS AND PROLIFERATION IN HUMAN MALIGNANT TUMORS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

Paola Tonino¹, Héctor Finol¹, Carlos Hidalgo² y Luis Sosa³

1. Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 76963, Caracas 1070, Venezuela. Email: ptonino@electra.ciens.ucv.ve
2. Departamento de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.
3. Cátedra de Histología, Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

El presente estudio constituye el primer reporte que establece una asociación entre angiogénesis y la actividad proliferativa en distintas regiones de tumores malignos del tracto gastrointestinal del humano. Biopsias quirúrgicas correspondientes al centro del tumor, la región de la periferia y las zonas de metástasis fueron procesadas mediante la técnica de la avidina-biotina inmunoperoxidasa, empleando los anticuerpos anti-Factor VIII de Von Willebrand y anti-PCNA, para la determinación de la densidad vascular, como una medida de la respuesta angiogénica, y la proliferación celular, expresada como el índice de marcaje con PCNA, respectivamente. Los resultados mostraron una correlación positiva entre la densidad vascular y el índice de marcaje con PCNA ($p < 0.00001$). La proliferación celular se observó incrementada en la región de la periferia, en comparación a la región del centro del tumor y las zonas de metástasis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la densidad vascular en las regiones del tumor con menor índice de marcaje con PCNA (centro del tumor $< 64\%$, la periferia $< 73\%$ y las zonas de metástasis $< 61\%$) y las regiones del tumor con mayor índice de marcaje con PCNA, (centro del tumor, $p < 0.05$; la periferia, $p < 0.001$ y las zonas de metástasis, $p < 0.01$). Estos resultados sugieren que los tumores con una elevada vascularización muestran una tendencia al incremento de su actividad proliferativa y en consecuencia de su potencial de malignidad. Tales parámetros podrían constituir indicadores pronósticos en estos tumores.

ABSTRACT

This study is the first report to establish an association between angiogenesis and the proliferation activity in different regions of human malignant tumors of the gastrointestinal tract. Surgical biopsies corresponding to the tumor center, periphery region, and metastasis zones were processed by the avidin-biotin immunoperoxidase technique, using the antibodies anti-factor VIII-related antigen or Von Willebrand factor and anti-PCNA, to determine the vascular density, as a measure of the angiogenic response, and the cellular proliferation, expressed as the PCNA labelling index, respectively. The results showed a positive correlation between vascular density and PCNA labelling index ($P < 0.00001$). Cellular proliferation was incremented in the periphery region compared to the tumor center and the metastasis zones. There was statistically significant differences between vascular density in the regions of the tumor with low PCNA labelling index (tumor center, $< 64\%$; periphery, $< 73\%$ and metastasis zones, $< 61\%$) and the regions of the tumor with high PCNA labelling index, (tumor center, $p < 0.05$; periphery, $p < 0.001$ and metastasis, $p < 0.01$). This results suggest that tumors with an increased vascularization, show a tendency to increase its proliferative activity. Such parameters could be prognostic indicators in these tumors.

Palabras clave: Densidad vascular, proliferación celular, adenocarcinomas gastrointestinales, inmunohistoquímica.

Key words: Vascular density, cellular proliferation, gastrointestinal adenocarcinomas, immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en las dos últimas décadas han revelado que la progresión del tumor (crecimiento, invasión y metástasis) depende del proceso de angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (Folkman, 1982; 1986; 1990; 1996; Folkman y Klagsbrum, 1987; Weidner, 1993; Baillie y Col., 1995; Battegay, 1995; Weidner y Col., 1993). El aumento en la población de células tumorales es precedido por un incremento en los nuevos capilares que convergen hacia el tumor. Por ello, la angiogénesis se ha correlacionado directamente con el crecimiento del tumor y las metástasis (Folkman, 1990). Los hallazgos experimentales subsiguientes lo han confirmado, e incluso han revelado que en ausencia de una fuente sanguínea adecuada, el tumor sufre necrosis y apoptosis, procesos que limitan el incremento en el volumen del tumor, consecuente a la proliferación celular continua característica del cáncer (Weidner, 1993; Leek y Col., 1994; Hanahan y Folkman, 1996). El crecimiento de un tumor está representado por el incremento total en el número de células tumorales como resultado neto de la ganancia de células a través de la actividad proliferativa y la pérdida de éstas por apoptosis o necrosis (Van Diest y Col., 1998).

En la actualidad, la correlación entre la densidad vascular, como una medida de la respuesta angiogénica y la malignidad del tumor se intenta emplear con fines pronósticos en el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y otros (Baillie y Col., 1995).

El primer paso en la determinación de la densidad vascular (Weidner, 1993), lo constituye la identificación de los vasos sanguíneos del tumor mediante técnicas de inmunohistoquímica, con el uso de anticuerpos que reconocen al antígeno relacionado al factor VIII de Von Willebrand (F-VIII), presente en el endotelio vascular, así como también la molécula de adhesión a células endoteliales y plaquetas (CD31/PECAM), las selectinas E y P, y el grupo de diferenciación CD34 (Fontanini y Col., 1995).

La proliferación celular también se ha considerado como un marcador del potencial de malignidad de diversos carcinomas (Leek y Col., 1994; Fontanini y Col., 1995; Folkman, 1996; Hanahan y

Folkman, 1996). En general, uno de los métodos empleados con frecuencia en la determinación de proliferación celular en tumores, consiste en la utilización de anticuerpos que reconocen proteínas nucleares (McLeod y Murray, 1999), tales como, la Ki-67, una proteína de unión al ADN expresada en todas las fases del ciclo celular, a excepción de la G₀ (Gerdes y Col., 1992), y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)/ciclina, que es una proteína ácida de tipo no histona (36 kDa), la cual funciona como un cofactor de la ADN polimerasa δ con expresión a nivel nuclear, particularmente en las fases G₁ tardía y S del ciclo celular (Hall y Wood., 1990; Linden y Col., 1992).

La vascularización del tumor y la actividad proliferativa representan aspectos fundamentales para un mejor conocimiento de la biología tumoral y de las bases para una terapia anti-angiogénica (Wesseling y Col., 1995). Recientemente, se ha descrito una asociación entre la vascularización tumoral, la proliferación de células tumorales y la evolución clínica en el cáncer de mama (Dutta y Col., 1995), la cavidad oral (Alcalde y Col., 1995; Tipoe y Col., 1996) y el cáncer gástrico. Sin embargo en estos estudios únicamente se ha considerado la masa tumoral (Maeda y Col., 1995; 1996), y en otros cánceres esta relación aún es objeto de controversia (Huang y Col., 1996; Onodera y Col., 2000; Lee y Col., 2001). No obstante, hasta el presente la relación entre densidad vascular y proliferación tumoral en distintas regiones de tumores malignos del humano no se ha establecido. En el presente estudio se determinó la asociación entre angiogénesis y proliferación de células tumorales en distintas regiones (centro, periferia y metástasis) de tumores malignos del tracto gastrointestinal del humano (estómago, colon y recto), a objeto de contribuir a un mejor conocimiento de la biología de estos tumores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes. Se emplearon biopsias quirúrgicas correspondientes al centro del tumor, la región de la periferia y zonas de metástasis de pacientes (n=13; 7 femeninos y 6 masculinos) con edades comprendidas entre 44 y 76 años (promedio 61.9 años) provenientes del Servicio de Oncología del

Hospital Oncológico Padre Machado y el Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Caracas, quienes presentaron un diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gastrointestinal. En ningún caso se realizó tratamiento previo a la cirugía.

Inmunohistoquímica. Las biopsias correspondientes a las distintas regiones del tumor (centro, periferia y metástasis) fueron fijadas en formalina neutra al 10%, procesadas e incluidas en parafina. Las secciones de 4 μm obtenidas en láminas portaobjeto cubiertas con poli-L-lisina (Sigma) fueron desparafinadas, rehidratadas y procesadas por el método modificado de la avidina-biotina inmunoperoxidasa (Hsu y Col., 1981). Posterior a la rehidratación de las secciones, se realizó una predigestión proteolítica con tripsina al 0.1 % (Lipshaw Immunon) en tampón Tris (150 mM NaCl, 3.3 mM Ca_2Cl , pH 7.6), durante 15 minutos a 37 °C. Se realizaron lavados en agua destilada y tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) durante 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.) y luego se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante el uso de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 5 minutos. Todas las incubaciones se realizaron a T.A. y en cámara húmeda. Se empleó el kit LSAB universal (*labelled streptavidin biotin peroxidase*) de tres componentes (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Para evitar la inespecificidad, las secciones se incubaron con una solución de bloqueo durante 10 minutos y a continuación se realizaron las incubaciones con los anticuerpos anti-F-VIII de humano (policlonal, dilución 1:300 en PBS, pH 7.4, 0.1 M) y anti-PCNA (monoclonal, dilución 1:100 en el mismo tampón). Posterior al lavado en PBS (5 minutos) se realizaron incubaciones con anticuerpos secundarios biotinados anti-conejo y anti-ratón durante 15 minutos y a continuación se realizó el lavado correspondiente con PBS por 5 minutos. Para finalizar, se realizó una incubación con el conjugado estreptavidina-peroxidasa durante 20 minutos. La inmunoreactividad se detectó con el uso del cromógeno 3-amino-9-etil carbazol (Sigma), el cual permite la observación de un precipitado de color rojo en el sitio de la inmunoreacción. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer y se montaron en gelatina glicerizada. Los controles positivos consistieron en tejidos de inmunoreacción conocida para cada anticuerpo, en tanto que los controles

negativos fueron secciones de tejido incubadas con una solución de PBS en lugar del anticuerpo primario.

Densidad vascular. La densidad vascular (número de capilares sanguíneos/ mm^2) se determinó de acuerdo al método de Weidner (1993). Las secciones inmunoreactivas al anticuerpo anti-F-VIII se observaron a bajo aumento, a objeto de identificar las áreas de mayor vascularización en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales (*hot spots*). La densidad vascular se cuantificó en 5 campos de 250X de aumento (área por campo de 0.639 mm^2) y los valores se expresaron como la media \pm la desviación estándar de vasos sanguíneos en tales áreas.

Índice de marcaje con PCNA. El índice de marcaje con PCNA se determinó de acuerdo al método de Maeda y Col. (1995). Los núcleos de un número mayor de 500 células tumorales se cuantificaron en 3 campos de 40X con la mayor densidad de núcleos con inmunoreacción positiva al anticuerpo anti-PCNA. El índice de marcaje con PCNA se expresó como el porcentaje de núcleos de células positivas.

Análisis estadísticos. La densidad vascular fue comparada en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales mediante la prueba t de Student para variables dependientes. La significancia estadística fue definida como $p < 0.5$. La relación entre la densidad vascular y la proliferación celular de los adenocarcinomas gastrointestinales se determinó mediante un análisis de varianza ANOVA y ANOVA Kruskal-Wallis por rangos.

RESULTADOS

Densidad vascular. En las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales la densidad vascular, como una medida de la respuesta angiogénica, fue determinada en las zonas de mayor vascularización (*hot spots*). La mayor densidad vascular en cada una de las regiones se encontró en el estroma, alrededor de las áreas de parénquima (Fig. 1). La heterogeneidad en la densidad vascular se observó no sólo en los diferentes tumores, sino también en las distintas regiones del mismo tumor. La densidad vascular en las áreas más

activas de neovascularización no mostró diferencias estadísticamente significativas en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales. El conteaje de vasos promedio \pm la desviación estándar fue de 28 ± 26 capilares/mm² en la región correspondiente al centro del tumor, 28 ± 23 capilares/mm² en la periferia y 24 ± 14 capilares/mm² en las zonas de metástasis.

Actividad proliferativa tumoral. La proliferación celular en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales fue variable. La inmunoreacción positiva al PCNA en los núcleos de las células tumorales se observó incrementada en la región correspondiente a la periferia del tumor y mostró variabilidad en relación al grado de intensidad (Fig. 2).

El índice de marcaje con PCNA promedio \pm desviación estándar fue de 64 ± 51 % en la región correspondiente al centro del tumor, 73 ± 54 % en la periferia y 61 ± 43 % en las zonas de metástasis. El análisis de varianza ANOVA de una vía determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre el índice de marcaje con PCNA en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales y la densidad vascular, con una $p < 0.00001$ en la región correspondiente al centro del tumor, $p < 0.0001$ en la periferia y $p < 0.0001$ en las zonas de metástasis.

Asociación entre la densidad vascular y la proliferación celular (PCNA). La asociación entre la densidad vascular y la expresión de PCNA como un indicador de la proliferación celular en

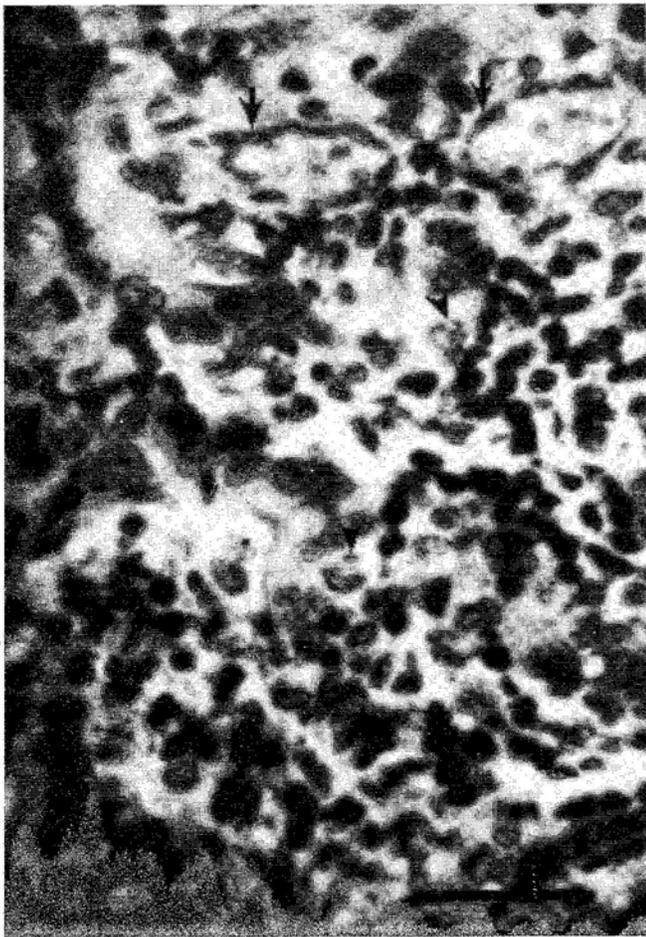


Figura 1. Sección de un adenocarcinoma gastrointestinal en la que se muestra la inmunoreacción positiva a FVIII en los vasos sanguíneos (flechas) y los brotes vasculares (cabezas de flecha). Barra= 12.5 μ m.

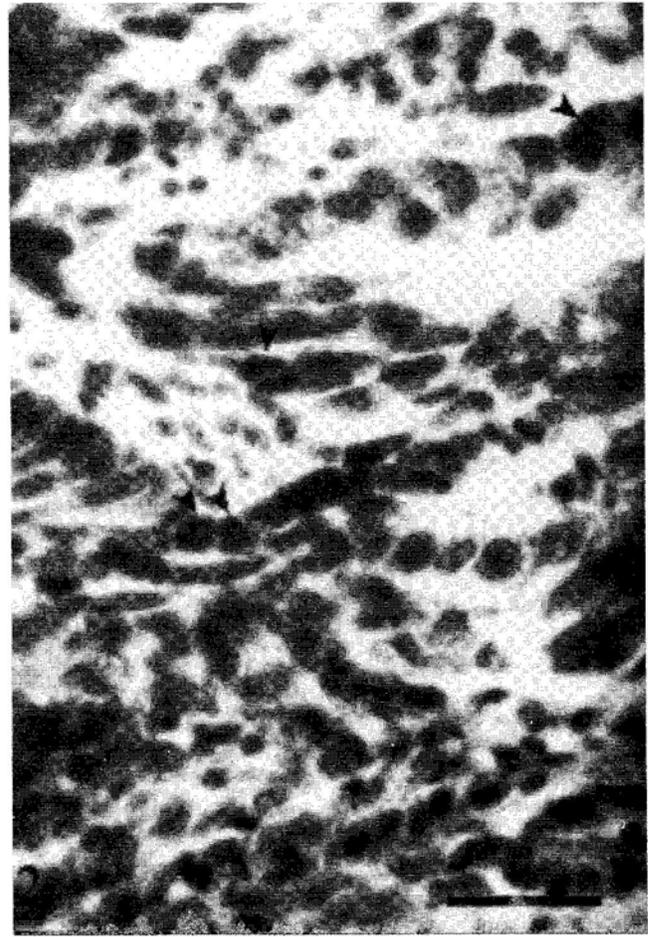


Figura 2. Sección de un adenocarcinoma gastrointestinal con inmunoreacción positiva a PCNA en los núcleos de las células tumorales (cabezas de flecha). Barra= 12.5 μ m.

distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales se realizó mediante los análisis estadísticos ANOVA de una vía y ANOVA Kruskal-Wallis por rangos. En la región correspondiente al centro del tumor, el análisis de varianza ANOVA mostró diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.0001$, en tanto que en las regiones de la periferia y las zonas de metástasis, el análisis de varianza ANOVA Kruskal-Wallis por rangos, mostró que existe diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente. Asimismo, se encontró significancia estadística entre la densidad vascular en las regiones del tumor con menor índice de marcaje con PCNA (centro del tumor, $< 64\%$; la periferia, $< 73\%$ y zonas de metástasis, $< 61\%$), y las de mayor índice de marcaje con PCNA, $p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.01$ en el centro del tumor, la periferia y las zonas de metástasis, respectivamente. Estos resultados sugieren que en las distintas regiones de adenocarcinomas gastrointestinales, el índice de proliferación celular incrementa con la vascularización del tumor (Fig. 3).

DISCUSION

La vascularización del tumor y la actividad proliferativa constituyen aspectos relevantes para el crecimiento, la invasión y las metástasis (Weidner y Col., 1993). No obstante, aún cuando se ha sugerido

que tanto la angiogénesis como la proliferación celular cumplen un papel esencial en el desarrollo de los tumores, las interrelaciones y la contribución relativa de esos procesos en distintas regiones del tumor no se ha definido. En el presente estudio, se compararon los parámetros densidad vascular y proliferación celular en distintas regiones de tumores malignos del tracto gastrointestinal del humano (centro, periferia y metástasis), a objeto de establecer una posible asociación entre angiogénesis y proliferación tumoral. En las distintas regiones de adenocarcinomas gastrointestinales, la densidad vascular no difiere significativamente. Este parámetro es heterogéneo en el estroma del tumor. Un hallazgo similar se observó en carcinomas colorrectales del humano (Pritchard y Col., 1995), y orales de células escamosas (Dunstan y Col., 1997). Asimismo, estos tumores no muestran una disminución de la vascularización en la región del centro del tumor, similar a lo observado en el presente estudio.

En las diferentes regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales, la inmunoreacción positiva al anticuerpo anti-F-VIII permitió la identificación de estructuras que no formaron una luz (Fig. 1), similar a lo observado en carcinomas orales de células escamosas. Tal hallazgo ha permitido sugerir que estas estructuras representan brotes vasculares neoformados, las cuales podrían estar asociadas a un incremento en la actividad angiogénica en los tejidos del hospedero (Dunstan y Col., 1997). La

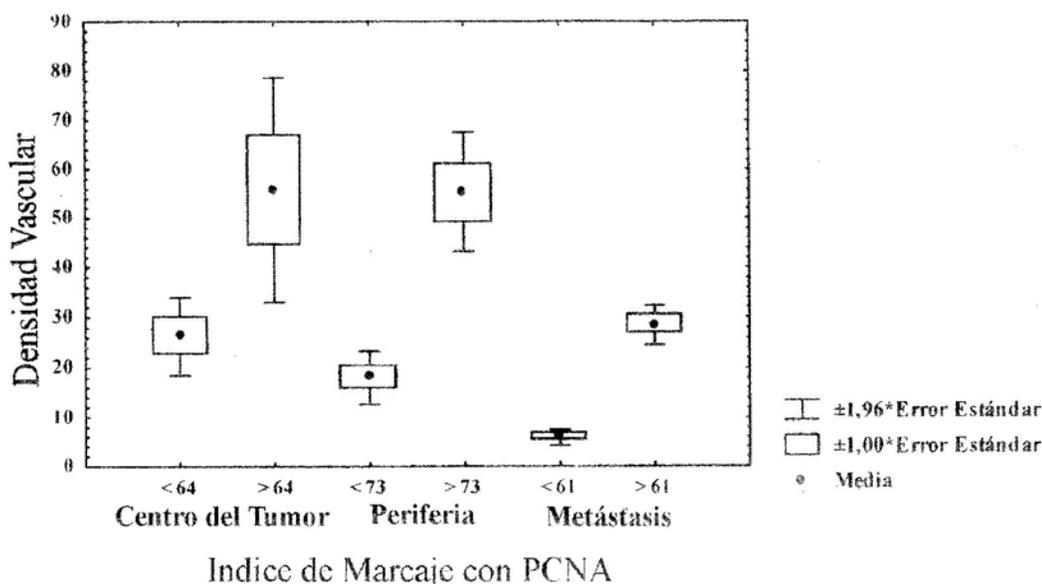


Figura 3. Relación entre la densidad vascular y el índice de marcaje con PCNA en distintas regiones de adenocarcinomas gastrointestinales.

extensión de la vascularización de una región determinada en los tumores, se ha sugerido que depende del balance entre los estimuladores e inhibidores de angiogénesis producidos por las células tumorales y las células del hospedero (Hanahan y Folkman, 1996).

El PCNA se ha empleado como un marcador de proliferación celular (Maeda y Col., 1995; 1996). La expresión del PCNA es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional y es afectada por la estabilidad del ARNm. En algunos tumores se ha observado que un incremento en la expresión del PCNA podría estar relacionado con una alteración mediada por un factor de crecimiento autocrino y paracrino (Hall y Woods, 1990).

En la presente investigación, el análisis del índice de marcaje con PCNA determinado en las distintas regiones de los adenocarcinomas gastrointestinales, muestra que la proliferación celular es variable. La mayor proliferación de células tumorales (media \pm desviación estándar, 73 ± 54 % de núcleos positivos al PCNA) se encontró en la región correspondiente a la periferia. Asimismo, se observó un incremento de la vascularización en los adenocarcinomas gastrointestinales con un mayor índice de marcaje con PCNA, en comparación a los tumores con un índice de proliferación celular menor.

La heterogeneidad de la inmunoreacción al PCNA, probablemente se relaciona con las propiedades biológicas del antígeno detectado. Se ha sugerido que el PCNA podría no estar restringido a la fase S del ciclo celular. Una serie de estudios han demostrado que la vida media del PCNA (20 horas), comparada con la duración intrínseca del ciclo celular, posiblemente es responsable por la inmunodetección positiva posterior a la fase S, lo cual podría influir en la heterogeneidad de la intensidad y los patrones de inmunotinción (Linden y Col., 1992).

La existencia de distintos patrones de proliferación en carcinomas experimentales de colon, podría estar asociada a la presencia de compartimientos del tumor con diferentes comportamientos proliferativos. Sin embargo, se ha sugerido que en esos tumores el desarrollo de capilares heterogéneos, probablemente no es responsable de las diferencias locales en la proliferación de las células tumorales (Gabbert y Col., 1982).

La actividad proliferativa celular se ha considerado como un marcador del potencial maligno de diversos carcinomas. Recientemente, una serie de estudios han demostrado que existe una relación entre la angiogénesis tumoral, la proliferación celular y el resultado clínico (Dutta y Col., 1995; Maeda y Col., 1995; 1996).

En carcinomas de colon de ratas se demostró que la proliferación de las células tumorales depende no sólo de las propiedades inherentes a la población de células tumorales, sino también de la vascularización, similar a lo que ocurre en los adenocarcinomas gastrointestinales, aún cuando en esos carcinomas experimentales no se realizó una comparación entre distintas zonas del tumor, sino únicamente en la masa tumoral.

La densidad vascular y el índice de marcaje con PCNA, constituyen factores pronósticos de la enfermedad en carcinomas gástricos del humano. Tales factores, podrían ser empleados para la identificación de pacientes con un alto riesgo de recurrencia, así como también para dirigir la terapia post-operatoria (Maeda y Col., 1995).

En conclusión, los resultados de la presente investigación sugieren que en distintas regiones de adenocarcinomas gastrointestinales del humano la densidad vascular se relaciona directamente con el índice proliferativo, similar a lo descrito en tejidos de la mucosa oral (Macluskey y Col., 2000), aunque en estos últimos se consideró únicamente la masa tumoral. La revisión de la literatura claramente indica una carencia de estudios que relacionen angiogénesis, proliferación tumoral, e incluso apoptosis, y su contribución relativa, lo que hace necesario explorar estas asociaciones en estos y otros tumores del humano y sus implicaciones en el desarrollo del tumor y la biología tumoral.

AGRADECIMIENTOS

Al Personal del Servicio de Cirugía del Hospital Oncológico Padre Machado y el Hospital Clínico Universitario. Este proyecto fue financiado por el C.D.C.H.-U.C.V. (Nº 03.035/97 y 03-10-4169-98).

LITERATURA CITADA

- ALCALDE, R.E., SHINTANI, S., YOSHIHAMA, Y. Y MATSUMURA, T.
1995. Cell proliferation and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 15: 1417-1422.
- BATTEGAY, E.J.
1995. Angiogenesis: Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.*, 73: 333-346.
- BAILLIE, C.T., WINSLET, M.C. Y BRADLEY, N. J.
1995. Tumour vasculature-a potential therapeutic target. *Br. J. Cancer*, 72: 257-267.
- DUNSTAN, S., POWE, D.G., WILKINSON, M., PEARSON, J. Y HEWITT, R.E.
1997. The tumour stroma of oral squamous cell carcinomas show increased vascularity compared with adjacent host tissue. *Br. J. Cancer*, 75: 559-565.
- DUTTA, A., CHANDRA, R., LEITER, L.M. Y LESTER, S.
1995. Cyclins as markers of tumor proliferation: Immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5286-5390.
- FOLKMAN, J.
1982. Angiogenesis: initiation and control. *Ann. NY Acad. Sci.*, 401: 212-227.
1986. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 46: 467-473.
1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. *JNCI*, 82: 4-6.
1996. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scient. Amer.*, 275: 116-119.
- FOLKMAN, J. Y KLAGSBRUM, M.
1987. Angiogenesis factors. *Science*, 235: 442-447.
- FONTANINI, G., BIGINI, D., VIGNATI, S., BASOLO, F., MUSSI, A., LUCCHI, M., CHINE, S., ANGELETTI, C.A., HARRIS, A.L. Y BEVILACQUA, G.
1995. Microvessel count predict metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J. Pathol.*, 177: 57-63.
- GABBERT, H., WAGNER, R. Y HOHN, P.
1982. The relation between tumor cell proliferation and vascularization in differentiated and undifferentiated colon carcinomas in the rat. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]*, 41: 119-131.
- GERDES, J., BECKER, M.H., KEY, G. Y CATTORETTI, G.
1992. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.*, 168: 85-86.
- HALL, P.A. Y WOODS, A.L.
1990. Immunohistochemical markers of cell proliferation. *Cell Tissue Kint.*, 23: 505-522.
- HANAHAN, D. Y FOLKMAN, J.
1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364.
- HUANG, S.C., YU, C.H., HUANG, R.T., HSU, K.F., TSAI, Y.C. Y CHOU, C.Y.
1996. Intratumoral blood flow in uterine myoma correlated with a low tumor size and volume, but not correlated with cell proliferation or angiogenesis. *Obstet. Gynecol.*, 87: 1019 - 1024.
- HSU, S.M., RAINE, L. Y FANGER, H.
1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577-580.
- LEE, J.S., KIM, H.S., JUNG, J.J., KIM, Y.B., PARK, C.S. Y LEE, M.C.
2001. Correlation between angiogenesis, apoptosis and cell proliferation of invasive ductal carcinoma of the breast and their relation to tumor behavior. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 23: 161-168.
- LEEK, R.D., HARRIS, A.L. Y LEWIS, C.E.
1994. Cytokine networks in solid human tumors: Regulation of angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 56: 423-435.
- LINDEN, M.D., TORRES, F.X., KUBUS, J. Y ZARBO, R.J.
1992. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am. J. Clin. Pathol.*, 97: 4-13.
- MACLUSKEY, M., CHANDRACHUD, L.M., PAZOUKI, S., GREEN, M., CHISHOLM, D.M., OGDEN, G.R., SCHOR, S.L. Y SCHOR, A.M.
2000. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J. Pathol.*, 191: 368-375.
- MAEDA, K., CHUNG, Y., ONOSDA, N., OGAWA, M., KATO, Y., NITTA, A., ARIMOTO, Y., KONDO, Y., ARAKAWA, T. Y SOWA, M.
1996. Association of tumor cell proliferation with lymph node metastasis in early gastric cancer. *Oncology*, 53: 1-5.
- MAEDA, K., CHUNG, Y.S., TAKATSUKA, S., OGAWA, Y., ONODA, N., SAWADA, T., KATO, Y., NITTA, A., ARIMOTO, Y., KONDO, Y. Y SOWA, M.
1995. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer*, 72: 319-323.
- MCLEOD, H.L. Y MURRAY, G.I.
1999. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 79: 191- 203.

ONODERA, H., MAETANI, S., KAWAMOTO, K., KAN, S.,
KONDO, S. Y IMAMURA, M.C.,

2000. Pathologic significance of tumor progression in locally recurrent rectal cancer: different nature from primary cancer. *Dis. Colon Rectum*, 43: 775-781.

PRITCHARD, A.J., CHATTERJEE, T., WILKINSON, M., POWE,
D.G., GRAY, T. Y HEWITT, R.E.

1995. Evidence for a weak angiogenic response to human colorectal cancers. *Br. J. Cancer*, 71: 1081-1086.

TIPOE, G.L., JIN, Y. Y WHITE, F.H.

1996. The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, 32: 24-31.

VAN DIEST, P.J, BRUGAL, G. Y BAAK, J.P.

1998. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J. Clin. Pathol.*, 51: 716-724.

WEIDNER, N.

1993. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Sem. Diag. Pathol.*, 10: 302-313.

1995. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.*, 147: 9-19.

WEIDNER, N., CARROLL, P.R., FLAX, J., BLUMENFELD, W. Y
FOLKMAN, J.

1993. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 143: 40-409.

WESSELING, P., SCHLINGEMAN, R.O., RIETVELD, F.J.R.,
LINK, M., BURGER, P.C. Y RUITER, D.J.

1995. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: An immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54: 304-310.