

Valor de la angiogénesis en relación a otros factores morfológicos en el carcinoma ductal infiltrante de mama

F. J. Torres Gómez¹, F. J. Torres Olivera²

Resumen

Introducción: Diferentes experiencias sugieren que el carcinoma ductal infiltrante es un tumor dependiente de la angiogénesis para adquirir capacidad invasora y metastásica. El valor de la angiogénesis como factor pronóstico suscita opiniones encontradas. Diversos factores se han invocado como responsables de las discrepancias en los resultados. Hemos correlacionado la angiogénesis con otros factores pronósticos consensuados, a fin de establecer su posible valor pronóstico.

Material y métodos: En 185 pacientes con carcinoma ductal infiltrante (NOS) hemos determinado la densidad vascular con un método de recuento estandarizado y la hemos relacionado con el tamaño tumoral, grado histológico, estatus ganglionar axilar, número de ganglios afectados y con cada uno de los parámetros que integran el grado histológico (formación tubular, grado nuclear e índice mitósico).

Resultados y conclusiones: Hemos obtenido correlación estadísticamente significativa entre la densidad vascular (DV) y los parámetros considerados con anterioridad.

Palabras clave: Angiogénesis. Carcinoma ductal infiltrante. Mama. Tamaño tumoral. Grado histológico, estatus ganglionar.

Oncología, 2007; 30 (3):92-99

¹ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Punta de Europa. Algeciras (Cádiz)

² Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla

Recibido: 24.10.06

Revisado: 03.01.07

Aceptado: 09.01.07

Summary

Introduction: Different experiences suggest that breast invasive ductal carcinoma depends on angiogenesis to reach invasive and metastatic properties. The value of angiogenesis as a prognostic factor encounters conflicting opinions. We studied the correlation between angiogenesis and other accepted prognostic factors in order to assess its prognostic value.

Material and methods: We calculated the vascular density of 185 patients with breast invasive ductal carcinoma using a standardized counting method to assess the correlation of angiogenesis with tumour size, histologic grade, axillary lymph nodes state, and the different features of the histological grade (tubular formation, nuclear grade, and mitotic index).

Results and conclusions: We found significant statistic correlation between vascular density and the aforementioned items.

Key words: Angiogenesis. Breast. Invasive ductal carcinoma. Tumour size. Histological grade. Lymph node state.

Introducción

La angiogénesis es un proceso necesario para que un tumor maligno adquiera potencial invasor y metastásico¹⁻⁶ y para el crecimiento del depósito metastásico en el órgano diana y su posterior proceso de diseminación⁶. Numerosas experiencias sostienen que el cáncer mamario es un tumor dependiente de la angiogénesis⁴⁻¹¹. La resonancia magnética con contraste encuentra una relación evidente entre el incremento de densidad vascular (DV) y aparición de cáncer mamario¹². La expresión de angiogénesis es precoz y detectable en el estadio intraductal¹³⁻¹⁵, observándose incremento de la DV alrededor de los ductos afectados en relación a la observada en ductos normales¹⁵. Asimismo, la DV observada alrededor de ductos con comedocarcinoma (un fenotipo de mayor agresividad biológica) es mayor que la observada alrededor de ductos con carcinoma intraductal habitual¹⁵ y también está aumentada en los márgenes infiltrativos del carcinoma mamario^{5,6,16,17}. El aumento de la DV es un indicador pronóstico significativo independiente del estatus ganglionar axilar^{4,5,6,18-23}, se relaciona con mayor frecuencia de metástasis²⁴, con un número superior de ganglios afectados²⁵ y con menor supervivencia^{21,26}. Se ha establecido una relación directa entre la DV intratumoral y el

riesgo de metástasis en el carcinoma de mama^{5,6,27,28}. Todos estos hechos sugieren la validez de la angiogénesis como factor pronóstico en el carcinoma mamario^{5,6,9,21,23,25-30} ya establecida en el melanoma³¹ y en otros órganos^{32,33}.

Otros autores encuentran relación entre DV y grado histológico tumoral, pero no con otros factores pronósticos clásicos (tamaño tumoral y estatus ganglionar)^{34,35,37-39} ni con la supervivencia⁴⁰.

La utilización de diferentes marcadores vasculares⁴¹, la heterogeneidad de los tipos histológicos tumorales estudiados^{42,43}, los diferentes métodos de elección de las áreas de mayor DV^{6,17,44,45} junto a la subjetividad y variaciones interobservadores^{6,29,37-39} contribuyen sin duda a estas importantes discrepancias.

En un estudio anterior⁴⁶ hemos tratado de estandarizar las técnicas de marcado y recuento vascular, la evaluación de las áreas de mayor DV (puntos calientes) y la homogenización del tipo histológico a valorar, con el fin de obtener una reproducibilidad aceptable de los resultados^{47,48}. En el presente trabajo hemos correlacionado la DV obtenida bajo esas premisas, con los factores pronósticos morfológicos ampliamente concensuados en el carcinoma de mama, a fin de establecer si la angiogénesis puede ser considerada como un factor pronóstico más en este tipo de neoplasia.

Material y métodos

Hemos estudiado 332 especímenes de tejido mamao y linfadenectomías axilares de 189 pacientes remitidas al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla entre los años 1996 y 2004. Se han estudiado exclusivamente los carcinomas ductales infiltrantes clásicos que no hubieran recibido tratamiento radioterápico o quimioterápico previos. Una vez fijadas las piezas en formol acuoso al 10% durante 24 horas se ha procedido a medir el diámetro máximo tumoral y a obtener secciones representativas del tumor que incluyeran el borde de crecimiento. Tras la inclusión en parafina en un procesador automático, se han obtenido los bloques de los que a su vez se obtuvieron cortes histológicos de 3 micras de espesor que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE). De cada caso se obtuvieron cortes histológicos montados sobre portas cargados eléctricamente destinados a estudio inmunohistoquímico, utilizando el anticuerpo correspondiente frente a CD31 (monoclonal, dilución 1:50, Concepta Byosystems S.A., Barcelona) en un procesador automático VENTANA ES (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), empleando el conjunto de detección Ventana Enhanced DAD (solución inhibidora de peróxido de hidrógeno, anticuerpo biotinilado antiratón, solución de peróxido de hidrógeno, DAD, solución de sulfato de cobre, hematoxilina y fondo azuleante). El desenmascaramiento antigénico se ha realizado mediante tampón citrato a Ph 6, en olla a presión durante 4 minutos. El estudio microscópico se ha realizado en un microscopio Olimpos BX 40 (Tokio, Japón).

Sobre los cortes histológicos teñidos con HE se ha establecido el grado histológico combinado de Nottingham⁴⁸. La valoración de la DV se ha establecido según el protocolo descrito anteriormente⁴⁶ y se ha correlacionado con el tamaño tumoral (TT), tamaño tumoral medio (TTM), grado histológico combinado (GH) y sus parámetros (formación tubular (FT), grado nuclear (GN) e índice mitósico (IM), estatus ganglionar axilar (EG) y número de ganglios axilares afectados. La obtención de la DV se ha realizado sin conocer previamente el GH ni el EG.

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS versión 12.0 para Windows. Los métodos utilizados han sido: a) en el caso de análisis de

variables cualitativas o cuantitativas agrupadas en intervalos, se han calculado las Tablas de Contingencia u Homogeneidad con el Test de la Chi-cuadrado o en el caso de Tablas 2 x 2 con la corrección de continuidad; b) en el caso de comparación de variables según los grupos que establece una variable cualitativa, hemos utilizado el Análisis de la Varianza (ANOVA) y en el supuesto de obtener diferencias significativas hemos utilizado el Test de Comparaciones Múltiples de Bonferroni.

Resultados

La edad media de los pacientes presenta un rango entre los 32 y 85 años (edad media 58,49 años). La mayor incidencia se encuentra en la década de los 50 (55 casos, 29,10%). La afectación de la mama izquierda (104 casos, 55,03%) es ligeramente superior a la de la derecha (85 casos, 44,97%).

El tamaño tumoral (TT) osciló entre 0,50 y 13 cms (tamaño tumoral medio (TTM) 2,65 cms. En 7 casos (3,70%) el TT ha sido inferior a 1 cm. El grupo más numeroso corresponde a las lesiones de tamaño comprendido entre 1 y 2 cms (87 casos, 46,03%), siendo casi equiparables los grupos de lesiones de tamaños comprendidos entre los 2 y 3 cms y los mayores de 3 cms (49 y 48 casos respectivamente).

20 casos (10,58%) mostraron buena diferenciación tubular (FT1), 44 (23,28%) moderada (FT2) y 125 (66,14%) escasa o nula (FT3).

41 tumores (21,69%) mostraron grado nuclear bajo (GN1), 103 (54,50%) moderado (GN2) y 45 (23,81%) alto (GN3).

95 casos (50,26%) mostraron baja actividad mitótica (IM1), 45 (23,81%) moderada (IM2) y 49 (25,93%) alta (IM3).

La densidad vascular total (DVT) obtenida en los 189 casos sobre el mejor punto caliente, en un campo microscópico a 400 x, ha sido de 8112 vasos, y la densidad vascular media (DVM) de 42,92 vasos.

La DVM obtenida en los tumores con TT hasta 2 cms es menor que las obtenidas en carcinomas de TT superior a 2 cms (Fig. 1). Cuando las DV se agrupan por intervalos se aprecia un predominio de los casos con TT superior a 2 cms a partir de un recuento vascular de 60 vasos (Fig. 2).

La DVM obtenida en los casos con FT1 es sen-

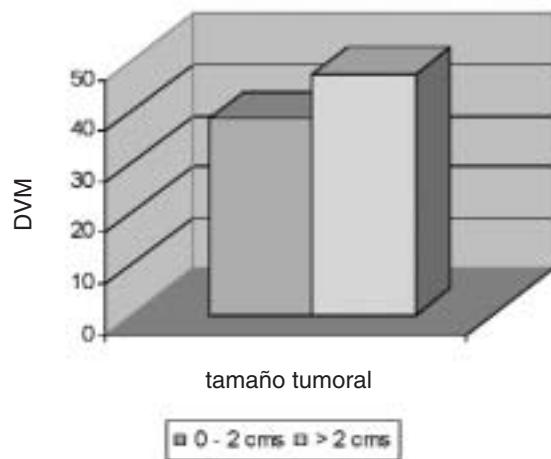


Fig. 1. Correlación entre TT y DV.

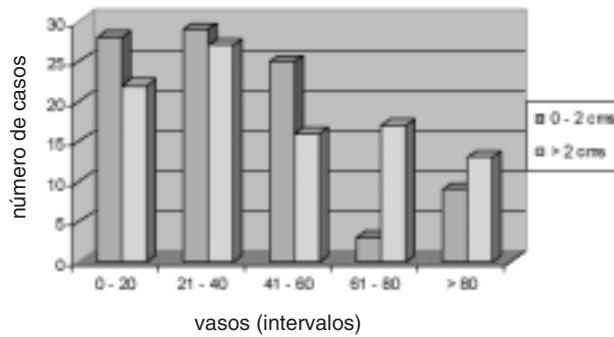


Fig. 2. Correlación entre TT y DV.

siblemente menor que las obtenidas en los casos con FT2 y FT3 (Fig. 3). Estas diferencias se mantienen cuando los recuentos se agrupan en intervalos (Fig. 4).

Las DVM obtenidas en los carcinomas con GN2 y GN3 son mayores que las obtenidas en los casos con GN1 (Fig. 5). Asimismo dichas diferencias se mantienen al agrupar los recuentos vasculares por intervalos (Fig. 6).

La DVM obtenida en los carcinomas con IM1 es menor que las obtenidas en los tumores con IM2 e IM3 (Fig. 7). Dichas diferencias se mantienen al agrupar los recuentos vasculares por intervalos (Fig. 8).

La DVM se incrementa en relación directa con el aumento del GH (Fig. 9). Esta relación se mantiene cuando se agrupan los recuentos vasculares por intervalos (Fig. 10).

La DVM obtenida en los tumores con ganglios

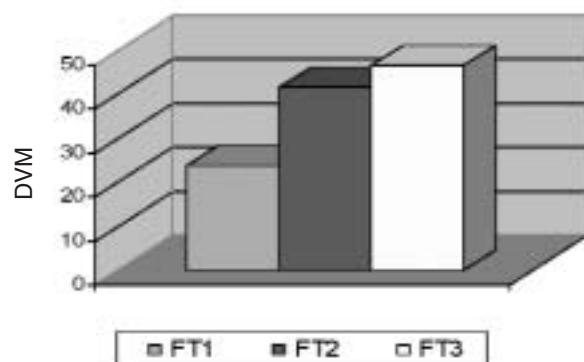


Fig. 3. Correlación entre FT y DV.

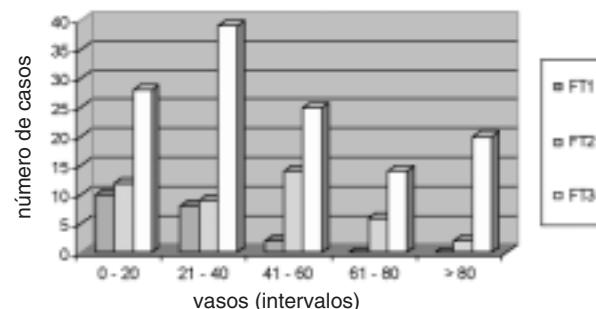


Fig. 4. Correlación entre FT y DV.

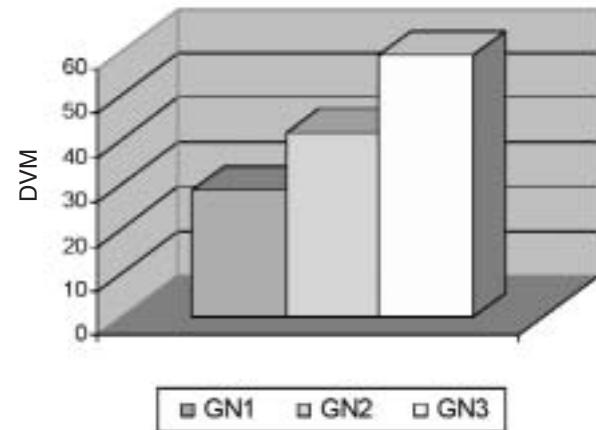


Fig. 5. Correlación entre GN y DV.

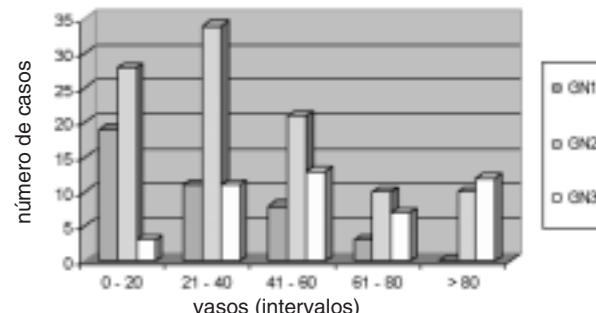


Fig. 6. Correlación entre GN y DV.

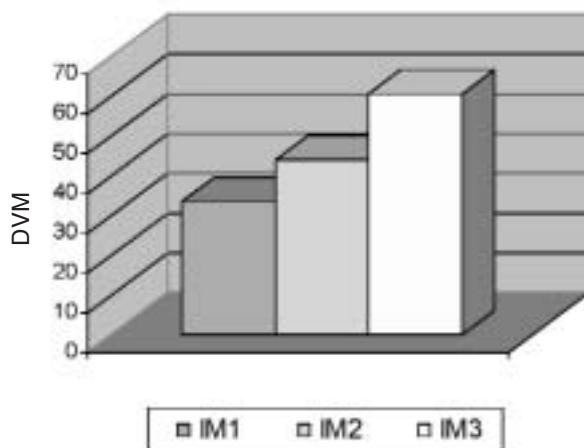


Fig. 7. Correlación entre IM y DV.

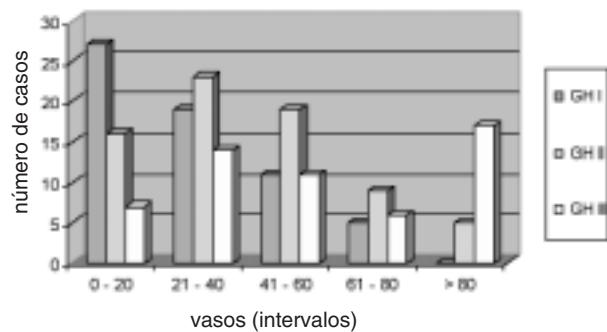


Fig. 8. Correlación entre IM y DV.

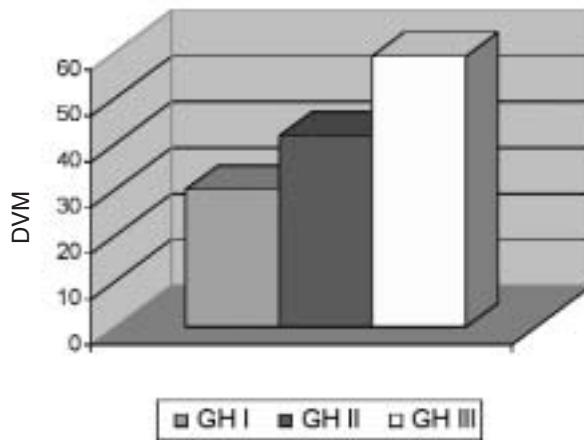


Fig. 9. Correlación entre GH y DV.

axilares metastásicos es sensiblemente mayor a la obtenida en los casos con ganglios no afectados (Fig. 11) y esta diferencia se mantiene cuando los

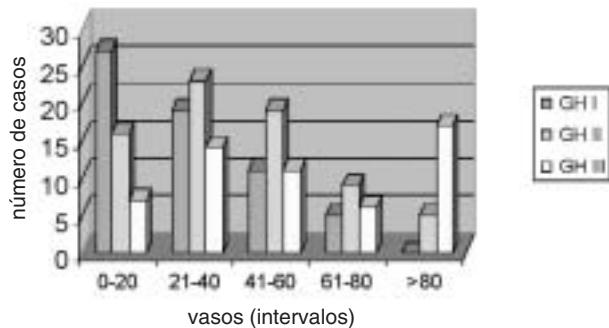


Fig. 10. Correlación entre GH y DV.

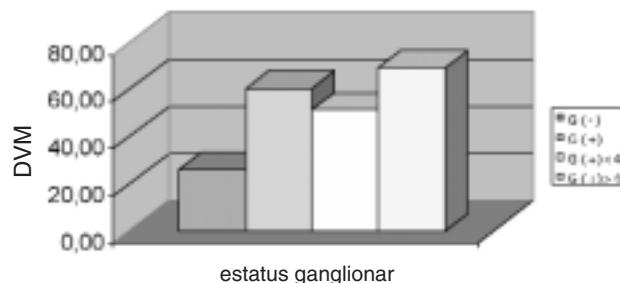


Fig. 11. Correlación entre EG y DV.

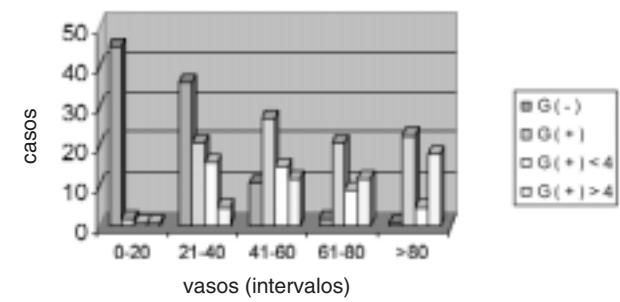


Fig. 12. Correlación entre EG y DV.

recuentos vasculares son agrupados en intervalos (Fig. 12).

Asimismo, se ha obtenido una DVM menor en los casos con menos de 4 ganglios afectados que en los casos con más de 4 ganglios metastásicos. Esta relación se mantiene al agrupar los recuentos vasculares por intervalos (Figs. 11 y 12).

Discusión

Diferentes parámetros histológicos han sido investigados, de forma singular o combinada, para determinar su valor pronóstico y/o predictivo en pa-

cientes con cáncer de mama. El tamaño tumoral, estatus ganglionar axilar, grado histológico, grado nuclear, índice mitósico, tipo histológico y la expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesteronas) han demostrado su valor pronóstico y su utilidad clínica en el tratamiento de las pacientes⁵². A pesar de la variabilidad individual y de su heterogeneidad en cada tumor, la DV parece definirse como un factor pronóstico importante^{10,30,47,48} cuya utilidad ha sido valorada en distintos órganos y demostrada en el cáncer mamario y prostático³³.

Varios autores niegan relación entre TT y DV^{6,34,36-39}. La correlación significativa entre estos dos parámetros establecida por otros (18,48) es coincidente con nuestros resultados ($p = 0,025$). La correlación es más fiable cuando se establece mediante intervalos en el recuento vascular ($p = 0,01$).

Hemos encontrado correlación significativa entre la DV y los distintos grados de FT ($p = 0,002$) que se mantiene al establecer intervalos en el recuento vascular ($p = 0,01$). Esta relación es especialmente significativa cuando se compara la DV obtenida en FT1 con los grupos restantes. Las diferencias son menos significativas al comparar los grupos FT2 y FT3.

Asimismo existen diferencias significativas entre la DV encontrada en los diferentes GN ($p = 0,000$) e IM ($p = 0,000$). No hemos encontrado referencias en la literatura a la relación entre FT y GN con la DV. En ambos grupos se mantienen las diferencias significativas cuando los recuentos vasculares se agrupan por intervalos.

La correlación entre GH y DV es altamente significativa ($p = 0,000$) y se mantiene cuando se establecen intervalos en el recuento vascular. Algunos autores sólo encuentran correlación entre la DV y este parámetro, pero no con otros factores pronósticos⁴⁰. En análisis de supervivencia con multivariantes, la DV supera en valor predictivo al TT, IM y EG⁴⁹. Otros autores sin embargo, niegan la correlación de la DV con cualquiera de los factores pronósticos clásicos^{34,36-39}.

Diferentes trabajos encuentran diferencias significativas entre las DV obtenidas en pacientes sin afectación de ganglios axilares y con metástasis en los mismos^{6,18,24,50-52}. Asimismo diversos autores encuentran una relación directa entre la DV obtenida en las áreas de mayor DV del tumor (puntos calientes) y el riesgo de metástasis ganglionar^{5,6,27,50-52} y

algunos encuentran relación entre la DV y el número de ganglios afectados²⁵. Otros sin embargo discrepan de estos resultados^{34,36-39}. Nuestro estudio encuentra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,000$) entre las DV obtenidas en las series con diferente EG. Estas diferencias se mantienen cuando se establece la comparación entre la DV de la serie con ganglios negativos y los grupos con diferente número de ganglios positivos. Estas diferencias se mantienen al aplicar intervalos al recuento vascular ($p = 0,000$). En el análisis de la DV por intervalos hemos observado un aumento progresivo del número de casos con ganglios positivos, paralelo al aumento de la DV. De forma similar el número de pacientes con ganglios negativos disminuye en razón inversa al aumento de la DV. En ambos casos el cambio de tendencia se establece de forma significativa a partir de los 40 vasos. Estos hallazgos son coincidentes con los de otros autores con diferente DV^{6,18,24,52}. Aplicando este punto de corte al resto de parámetros correlacionados con la DV hemos comprobado que se mantiene la correlación previamente establecida entre ellos. Esta correlación no es obtenida por otros autores en relación al TT ni al GH⁶.

En resumen, hemos obtenido una correlación estadísticamente significativa entre la DV, TT, TTM, con cada uno de los parámetros que integran el grado histológico combinado, con el GH, con el EG y con el número de ganglios afectados.

Correspondencia:
Dr. F. J. Torres Gómez
Plaza de la Encarnación, 32 - p1, 2B
E-41003 Sevilla
javiertorresgomez@yahoo.es

Bibliografía

1. Aonuma M, Saeki Y, Akimoto T y cols. Vascular endothelial growth factor overproduced by tumor cells acts predominantly as a potent angiogenic factor contributing to malignant progression. *Int J Exp Pathol* 1999; 80, 271-281.
2. Guinebretiere J. Angiogenesis and breast neoplasm. The pathologists point of view. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33, 140-146.
3. Huang B. Roles of main pro and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10, 467-470.
4. Vartanian R, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 1444, 1188-1194.
5. Weidner N, Semple J, Welch W y cols. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324, 1-8.
6. Weidner N. The relationship of tumor angiogenesis and metastasis with emphasis on invasive breast carcinoma. *Adv Pathol Lab Med* 1992; 5, 101-121.
7. Edel M, Harvey J, Papadimitriou J. Comparison of vascularity and angiogenesis in primary invasive mammary carcinomas and in their respective axillary lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18 (8), 695-702.
8. Folkman J, Watson K, Ingber D y cols. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339, 58-61.
9. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Oncol Hematol* 2001; 37, 97-114.
10. Guinebretiere J. Angiogenesis and breast neoplasm. The pathologists point of view. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33, 140-146.
11. Rak J, Filmus J, Kerbel R. Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells: the “angiogenic progression” hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32, 2438-2450.
12. Esserman L, Hylton N, George T y cols. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging to assess tumor histopathology and angiogenesis in breast carcinoma. *Breast* 1999; 1, 13-21.
13. Heffelfinger S, Yassin R, Miller M y cols. Vascularity of proliferative breast disease and carcinoma in situ correlates with histological features. *Clin Cancer Res* 1996; 11, 1873-1878.
14. Santinelli A, Baccarini M, Colanzi P y cols. Microvessel quantification in intraductal and early invasive breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 2, 277-284.
15. Zolota V, Geroskosta A, Melachrinou M y cols . Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in in situ ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res* : 1999 ; 19 : 3269-3274.
16. Beliën J, Somi S, De Jong J y cols. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52, 184-192.
17. Fox S, Gatter K, Bicknell R y cols. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 1993; 18, 4161-4163.
18. Fox S, Gatter K, Harris AL. Tumor angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179, 232-237.
19. Edel M, Robbins P, D-Antuono M y cols. Assement of endothelial cell proliferation in primary breast carcinoma and its association with axillary lymph node status. *Breast* 2000;9 (1), 28 - 34.
20. Fox S, Leek R, Weekes M y cols. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkey count and computer image analisis. *J Pathol* 1995; 177, 275-283.
21. Heimann R, Ferguson D, Powers C y cols. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *Br J Biomed Sci* 1998; 3, 214-220.
22. Martin L, Holcombe C, Green B y cols. Is a histological section representative of whole tumour vascularity in breast cancer ?. *Br J Cancer* 1997; 1, 40-43.
23. Wolf B. Histological grading in carcinoma of breast. *Br J Cancer* 1966; 20, 36-40.
24. Jiang X, Huang X, Li J. The correlation between tumor angiogenesis and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1997; 35, 583-585.
25. Laforga J, Aranda F. Angiogenic index: a new method for assessing microvascularity in breast carcinoma with possible prognostic implications. *Breast J* 2000; 6, 103-107.
26. Heimann R, Hellman S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2000; 36, 1631-1639.
27. Ogawa Y, Chung Y, Nakata B y cols. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer* 1995; 72, 1297-1301.
28. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is a independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55, 371-374.
29. Bossari S, Lee A, De Lellis R y cols. Microvessels quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23, 755-761.
30. Erden O, Dursun A, Loskun U y cols. The pronostic value of p53 and c-erb2 expresion, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma. *Tumori* 2005; 91, 46-52.
31. Srivastava A. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,0 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 1988; 133,419-423.
32. Frangou E, Lawson J, Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005; 3, 16.
33. Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histopro-

- nostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46, 481 - 489.
34. Goulding H, Rashid N, Roberston J y cols. Assement of angiogenesis in breast cancer: an important factor in prognosis ?. *Human Pathol* 1995; 26, 1196-1200.
35. Khanuja P, Fregene T, Gimotty P y cols. Angiogenesis does not predict recurrence in patients with primary breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12, 67.
36. Mayer M, Seshadri R, Raymond W y cols. Tumor microvascularity has no independent prognostic significance for breast cancer. *Pathology* 1998; 2, 105 - 110.
37. Pendleton N, Pazouki S, Heerkens E y cols. Relationship between different measurements of vascularity and clinicopathological parameters in breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 68, 4565 - 4568.
38. Raymond J. Tumor angiogenesis inhibitors: media and scientific aspects. *Presse Med*.1998; 27, 1221-1224.
39. Siiiton S, Haapasalo H, Rantala I y cols. Comparison of different immunohistochemical metods in the assement of angiogenesis lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinoma. *Mod Pathol* 1995; 8, 745 - 752.
40. Van Hoef M, Knox W, Dhesi S y cols. Assement of tumor vascularity as prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 8, 1141 - 1145.
41. Hansen S, Grabau D, Rose C y cols. Angiogenesis in breast cancer : a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. *Lab Invest* 1998; 78, 1563-1573.
42. Colpaert C, Vermeulen P, Benoy I y cols. Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. *Br J Cancer* 2003; 88, 718-725.
43. Lee J, Kim H Jung J y cols. Correlation between angiogenesis, apoptosis and cell proliferation in invasive ductal carcinoma of the breast and their relation to tumor behavior. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23, 161-168.
44. Arora R, Joshi K, Nijhawan R y cols. Angiogenesis as an independent prognostic indicador in node-negative breast cancer. *Analyt Quant Cytol Histol* 2002; 24, 228-233.
45. Magennis D. Angiogenesis: a new prognostic marker for breast cancer. *Br J Biomed Sci* 1998; 3, 214-220.
46. Torres Gómez FJ, Torres Olivera FJ. Estudio comparativo de diferentes métodos de valoración de la angiogénesis en el carcinoma ductal infiltrante de mama. *Rev Esp Patol* 2006; 39(2): 87 - 92.
47. De Jong J, Van Diese P, Baak J. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology* 2000; 36, 306-312.
48. Elston C, Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer; experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 403-410.
49. Fitzgibbons P, Page D, Weaver D y cols. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Concensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124, 966-978.
50. Ahlgren J, Risberg B, Villman K y cols.: Angiogenesis in invasive breast carcinoma. A prospective study of tumor heterogeneity. *Eur J Cancer* 2002; 38, 64-69.
51. Xiao J, Yu X, Xu X y cols. Relation between angiogenesis, fibrinolysis and invasión of metastasis in breast cancer. *Zonghua Zhong Lin Za Zhi* 2005; 27, 226 -228.
52. Shpitz B, Bomstein Y, Stemberg A y cols. Angiogenesis, p53 and c-erb2 immunoreactivity and clinicopathological features in male breast cancer. *J Surg Oncol* 2000; 75, 252-257.