

Studio sull'angiogenesi nei tumori colici Dukes'B

D. Pantalone, M. Ziche¹, L. Messerini², M. Pazzagli³, L. Morbidelli⁴, A. Parenti⁴, S. Donnini⁴, A.R. Palomba², C. Tricarico³, R. Paolucci, F. Taruffi e F. Andreoli

Patologia Chirurgica II, Istituto di Clinica Chirurgica Generale e D.C., Università degli Studi di Firenze, ¹Istituto di Farmacologia, Università degli Studi di Siena, ²Istituto di Istologia ed Anatomia Patologica, Università degli Studi di Firenze, ³Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fistopatologia Clinica, Università degli Studi di Firenze, ⁴Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi di Firenze, Italia

Riassunto

Obiettivo: In questa ricerca abbiamo studiato l'angiogenesi nelle neoplasie coliche Dukes'B.

Pazienti e Metodi: Lo studio si è svolto in due fasi: una fase retrospettiva (60 pz.) (età 39-75 anni) e una fase prospettica (25 pz.) (età 52-70 anni). Nello studio retrospettivo è stata effettuata la valutazione del grado di angiogenesi su materiale paraffinato e lo studio dei parametri istopatologici convenzionali. Lo studio prospettico, in corso da tre anni, utilizza campioni di tessuto tumorale e di mucosa normale prelevato a fresco, sul quale si effettuano misure quantitative dell'espressione dell'angiogenesi (VEGF).

Risultati: L'angiogenesi si conferma un fattore prognostico importante sia per la comparsa di metastasi sia ai fini della sopravvivenza. L'angiogenesi quindi viene valutata sia come fattore prognostico sia sotto il possibile risvolto terapeutico che l'analisi di questi dati preliminari suggerisce.

Parole chiave: Angiogenesi, cancro del colon VEGF

Introduzione

L'angiogenesi rappresenta uno dei meccanismi attraverso il quale un tumore, anche di pochi millimetri di volume, modifica la sua crescita da silente a esponenziale e diviene capace di immettere cellule neoplastiche nel torrente circolatorio e di colonizzare gli organi bersaglio (1).

L'induzione del processo angiogenico è mediata da più fattori che vengono rilasciati nel microambiente cellulare sia dalle cellule tumorali stesse, sia da cellule dell'ospite. L'angiogenesi viene quindi promossa, oltre che dalle cellule tumorali, dalla matrice extracellulare o da altre cellule fisiologicamente presenti, quali, ad esempio, i macrofagi (2-11).

Abstract

Purpose: To evaluate the angiogenesis in Duke'B colon cancer.

Patients and Methods: In 60 patients (age, 39-75 years), the microvessel density and the relationship between the angiogenesis and other histologic features were retrospectively evaluated. In an ongoing prospective study, 25 patients have been enrolled to determine the possible therapeutic implications of VEGF quantitative analysis.

Results: The retrospective portion of this study confirms the prognostic value of the angiogenesis in terms of recurrences and survival. At present, no conclusions can be drawn from the prospective portion of the study.

Key words: Angiogenesis, colonic cancer, VEGF (vascular endothelial growth factor)

Esiste una lista crescente di fattori coinvolti nel processo angiogenico (Fig.1)

Tra i fattori promuoventi meglio conosciuti si includono: il vascular endothelial grow factor (VEGF)(12-14), il basic fibroblastic growth factor (bFGF)(15-18), il platelet derived endothelial growth factor (PDEGF) (19), e il tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa).

In particolare il VEGF attiva recettori di superficie delle cellule endoteliali che si modificano, assumono un fenotipo proliferante, aumentano la secrezione di enzimi e acquistano la capacità di migrare. Altre molecole, diverse dal VEGF, sono state chiamate in causa come promotrici della proliferazione e invasione: integrine (20, 21), selectine, immunoglobuline, molecole di adesione, e enzimi proteolitici, altri meccanismi nei quali sono

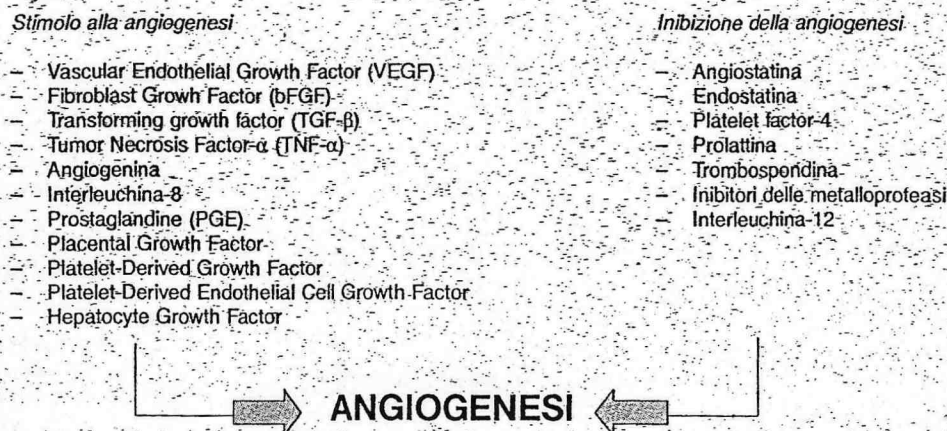


Fig. 1. Alcuni dei fattori più noti coinvolti nel processo dell'angiogenesi

coinvolte le metallo-proteasi della matrice e le proteasi delle serine (22, 23).

Poiché la maggior parte dei pazienti che muoiono per carcinoma coloretale giungono all'exitus per la presenza di metastasi, in questo studio abbiamo voluto valutare l'angiogenesi in relazione al carcinoma del colon. La nostra scelta si è orientata su questo tipo di tumore perché è quello di cui sono maggiormente conosciuti i meccanismi di trasformazione neoplastica (24-26) e per il quale esistono in letteratura numerosi lavori che attribuiscono alla angiogenesi il ruolo di "fattore prognostico" (27-36).

Lo studio si è articolato in una prima fase retrospettiva e in una seconda fase prospettica di cui presentiamo i risultati preliminari. Per lo studio retrospettivo abbiamo selezionato pazienti portatori di una neoplasia colica in stadio B di Dukes che rappresenta il gruppo più eterogeneo ai fini della prognosi; infatti i pazienti con linfonodi positivi che sono segno di malattia in una fase più avanzata, hanno un andamento sfavorevole più prevedibile e meglio codificato ai fini terapeutici. Abbiamo inoltre escluso i tumori del retto perché, per la sede anatomica e per le vie di diffusione, la loro "storia" va considerata a parte rispetto a quella del colon.

Materiali e Metodi

Studio retrospettivo

La prima fase retrospettiva è stata condotta su materiale paraffinato (60 pazienti). Nello studio sono stati arruolati 26 donne e 34 uomini (età media rispettivamente di 64.8 ± 8.3 anni e di 63.1 ± 7.8) portatori di una neoplasia del colon allo stadio Dukes'B. Le sedi della neoplasia erano: colon ascendente (12 casi), trasverso (6 casi) colon discendente (14 casi), sigma (28 casi). Lo studio dell'angiogenesi (MVD: micro-vessels density) è stato effettuato con metodo immunostochimico. I blocchetti selezionati erano quelli relativi al fronte di crescita tumorale al

limite con la mucosa indenne. Le sezioni ($4 \mu\text{m}$ di spessore) sono state trattate con due anticorpi: monoclonale QB-END10 per l'antigene endoteliale CD34 e l'anticorpo policlonale F-VIII per il fattore VIII. Per ogni tumore è stata individuata l'area a maggiore densità di angiogenesi ad un ingrandimento $\times 100$; successivamente è stato contato il numero dei vasi neoformati in tale area ad ingrandimento maggiore ($\times 250$) (37,38). Il valore medio della densità dei neovasi neoformati (MVD) era $35,4 \pm 11,2$.

In base a questo parametro abbiamo suddiviso i pazienti in 2 gruppi:

- casi ad elevata espressione di angiogenesi ($>36,4 \pm 11,2$)
- casi a bassa espressione di angiogenesi ($<36,4 \pm 11,2$).

I risultati sono poi stati correlati con altri parametri istopatologici "convenzionali" (grading, istotipo, invasione venosa, tipo di crescita). Le curve di sopravvivenza sono state stimate secondo il metodo di Kaplan Meier (39) e la significatività con il log-rank test per il confronto di sopravvivenze (Mantel Haenszel) (40).

Studio prospettico

Selezione dei pazienti

Lo studio prospettico prevede un protocollo di prelievo in base ai seguenti criteri:

- età < 75 anni,
- localizzazione del tumore: colon.
- stadiazione preoperatoria Dukes'B
- il prelievo dei campioni di tessuto da immergere in azoto liquido prelievo di un campione di mucosa sana al limite superiore del pezzo operatorio, un campione di mucosa a 2 cm dal tumore, un prelievo di tessuto tumorale al margine con la mucosa macroscopicamente indenne contigua (fronte di crescita), un prelievo di tumore nella zona centrale ("core tumorale").
- conferma istologica dello stadio sul pezzo operatorio.
- In questo studio sono stati arruolati al momento 25 pazienti.

Isolamento dell'RNA messaggero per il Vascular Endothelial Growth Factor

L'RNA messaggero di frammenti tumorali e di mucosa sana precedentemente congelati è stato isolato mediante omogenizzazione ed estrazione standard con guanidina tiocianato-fenolo-cloroformio.

Retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica "in vitro" che permette la sintesi esponenziale e quindi l'amplificazione di un frammento specifico di DNA a partire da uno stampo di DNA (PCR) o RNA (RT-PCR) per ottenere informazioni di carattere quantitativo sull'espressione di RNA messaggero del fattore di crescita VEGF. Nel nostro studio è stata utilizzata una nuova RT-PCR quantitativa che è basata sul sistema "TaqMan". Tale dosaggio di RNA messaggero prevede l'impiego di sonde fluorogeniche che permettono la rivelazione in tempo reale di prodotti specifici di amplificazione. La misura del segnale specifico viene eseguita attraverso un particolare sistema fluorometrico (ABI PRISM 7700-Perkin Elmer).

In questo metodo nella miscela di reazione della PCR viene introdotta una quantità fissa di un probe scelto in modo da ibridizzare con la sequenza target.

Il probe di rivelazione consiste in un oligonucleotide fluorogenico che porta alle sue estremità una molecola di reporter ed una di quencer. La vicinanza delle due specie limita la produzione di segnale fluorescente da parte del reporter a causa del principio di trasferimento di energia secondo il modello di Forster. Quando invece il reporter viene dissociato per azione dell'attività esonucleasica della Taq, si trova da solo in soluzione e quindi il segnale fluorescente aumenterà in maniera proporzionale alle sue concentrazioni.

Risultati

Studio retrospettivo

Per quanto riguarda il grading, i tumori avevano una maggiore percentuale di G₂, ma non c'erano differenze significative nella presenza o meno della angiogenesi in relazione a questo parametro (Fig.2).

Per quanto riguarda i parametri considerati per lo score di Jass, la presenza di angiogenesi si correlerebbe meglio con la crescita di tipo "infiltrante" (presente nel 50% dei casi) (Fig.3).

Per la invasione dei vasi venosi peritumorali (Fig.4) la presenza di microangiogenesi sarebbe ben correlabile con l'invasione dei vasi venosi da parte delle cellule tumorali (41% dei casi).

Metastasi e sopravvivenza

La comparsa di metastasi ben si correla con i casi ad elevata espressione di MVD. Infatti dei pazienti che hanno sviluppato metastasi (ovariche: 2, epatiche: 20, epatiche e polmonari 2)(40%), 21 pz. (87,5%) avevano una elevata MVD e solo 3 pz. (12,5%) presentavano

GRADING	MDV+	MVD-
G1	1,6%	1,6%
G2	41,6%	38,3%
G3	1,6%	1,6%
MUCINOSO	10%	3,3%

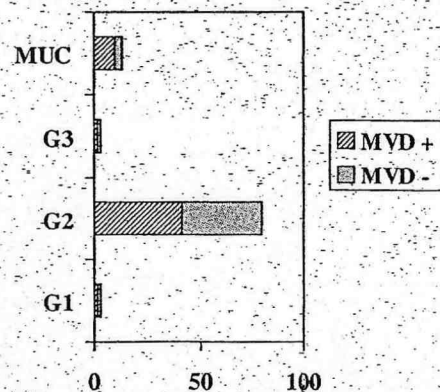


Fig. 2. Relazioni tra il grading e l'angiogenesi (MVD+: elevata espressione di angiogenesi, MVD-: bassa espressione di angiogenesi)

JASS SCORE

	MDV+	MVD-
Crescita espansiva	5%	26,6%
Crescita infiltrativa	50%	18,3%

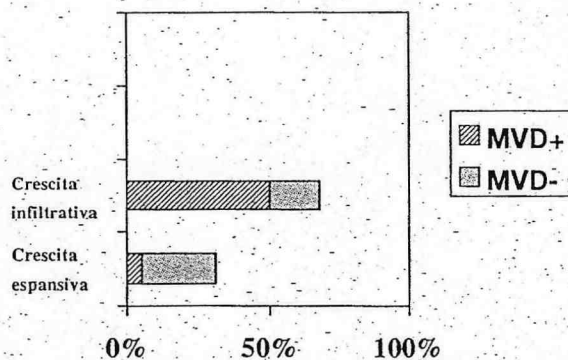
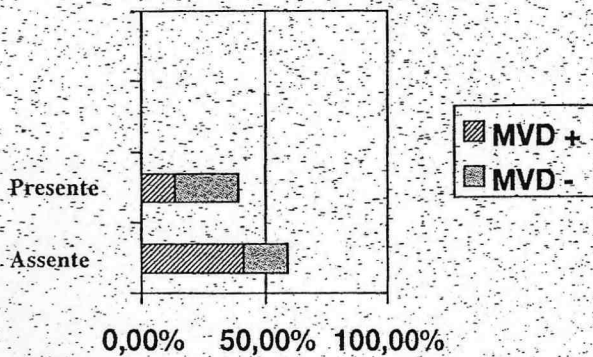


Fig. 3. Relazioni tra le caratteristiche del fronte di crescita tumorale e l'angiogenesi (MVD+: elevata espressione di angiogenesi, MVD-: bassa espressione di angiogenesi)

una bassa MVD. La sopravvivenza globale in 36 pazienti è stata del 60%. Le curve di sopravvivenza secondo Kaplan Meier calcolate in base alla presenza di una elevata e di una bassa espressione di angiogenesi sono riportate in fig 5. Da notare la caduta della curva di sopravvivenza dopo i 2 anni dall'intervento nei pazienti con una elevata espressione di MVD. Differenza che ri-



INVASIONE VENOSA

	MDV+	MVD-
Presente	41,6%	18,3%
Assente	13,0%	26,6%

Fig. 4. Relazioni tra l'invasione dei vasi peritumorali e l'angiogenesi (MVD+: elevata espressione di angiogenesi, MVD-: bassa espressione di angiogenesi)

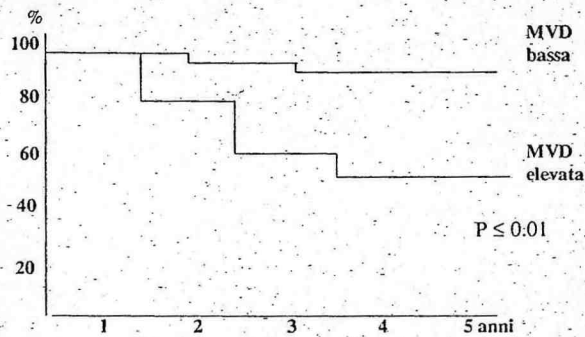


Fig. 5. Curve di sopravvivenza sec. Kaplan Meier a 5 anni. Livello di significatività secondo il test di log-rank

sulta statisticamente significativa (test di Mantel-Haenszel) ($p < 0,01$).

Quindi i nostri dati si allineano con quelli presenti in letteratura confermando alla quantificazione dei vasi neoformati (MVD) il ruolo di fattore prognostico negativo correlabile alla predizione di metastasi e ad una scarsa sopravvivenza.

Studio prospettico

È presente un consistente aumento nell'espressione di RNA messaggero per il VEGF nel tessuto tumorale rispetto alla mucosa sana. Tale aumento è maggiore quando confrontato con l'espressione dell'RNA messaggero della mucosa sana. La differenza più importante si veri-

fica, però, tra l'espressione dell'RNA messaggero nel "core" del tumore e quella rilevata al margine del tumore stesso con la mucosa macroscopicamente sana. Da notare a questo livello che la variazione nella espressione del mRNA per il VEGF è 100 volte maggiore rispetto al "core tumorale" poiché si esprime su base logaritmica. In Tab. 1 sono riportati gli esempi più significativi dei valori ottenuti.

Discussione

Dallo studio retrospettivo si conferma che l'angiogenesi è una discriminante negativa per la prognosi dei pazienti. Essa è indice di una elevata capacità di dare metastasi e di una scarsa sopravvivenza. Questi dati sono già ben codificati in letteratura (41-47): nei nostri casi una alta quota di MVD si correla con la presenza di metastasi (nel 87,5% dei nostri pz. metastatici) e con una bassa sopravvivenza (è presente nel 80% dei pz. deceduti). Per quanto riguarda le correlazioni con i parametri istopatologici presi in esame essa si correla con la presenza di infiltrazione dei vasi peritumorali (41% dei casi) e con un fronte di crescita tumorale di tipo infiltrativo (50% dei casi). Questi elementi sarebbero già sufficienti per modulare il trattamento di tali pazienti sia per la terapia adiuvante postoperatoria sia per il follow-up mirato alla individuazione precoce dei foci metastatici.

Tuttavia il ruolo della angiogenesi non si arresta solo all'aspetto prognostico, la sua applicazione più importante è nell'ambito terapeutico in monoterapia e in associazione alle terapie complementari convenzionali (48-57).

Tabella 2. Alcuni esempi dei risultati dello studio prospettico. Le differenze si esprimono su base logaritmica. L'espressione dell'mRNA per il VEGF, risulta così 100 volte maggiore al livello del margine tumorale rispetto alla mucosa indenne e al "core" tumorale.

Esempi	Regione esaminata	VEGF mol/microg RNA totale
1	Tumore margine	$1,2 \times 10^9$
	Tumore centrale	$8,2 \times 10^8$
	Mucosa lim.sup.	$1,4 \times 10^7$
	Mucosa distale	$1,2 \times 10^7$
2	Tumore margine	$1,5 \times 10^9$
	Tumore centrale	$5,0 \times 10^8$
	Mucosa lim.sup.	$4,0 \times 10^7$
	Mucosa distale	$7,8 \times 10^7$
3	Tumore margine	$4,2 \times 10^7$
	Tumore centrale	$6,2 \times 10^6$
	Mucosa lim.sup.	$3,2 \times 10^7$
	Mucosa distale	$4,4 \times 10^7$
4	Tumore margine	$3,6 \times 10^7$
	Tumore centrale	$6,4 \times 10^6$
	Mucosa lim.sup.	$5,6 \times 10^6$
	Mucosa distale	$5,7 \times 10^6$

L'obiettivo della terapia antiangiogenica è quello di mantenere o di ridurre il tumore ad un gruppetto di cellule in stato di quiescenza ("dormancy") (44,51) di renderle più sensibili agli attacchi della immunità cellulo-mediata e vulnerabili all'azione di agenti chemioterapici e radioterapici.

Sul ruolo del VEGF nella angiogenesi sono presenti numerosi studi (12-14,58,59); anche molte altre sostanze sono coinvolte nella comparsa e modulazione di questo fenomeno (60-65) ma l'espressione del VEGF è indicativa della neovascolarizzazione indotta dal tumore. Lo studio tuttora in corso condotto su questo parametro avviene mediante l'analisi quantitativa della RT-PCR. La severa selezione dei pazienti (Duker's B) è mirata a rendere più omogenea possibile, la popolazione neoplastica studiata.

I risultati preliminari fino ad ora ottenuti sui campioni presi in esame indirizzano la nostra attenzione sul fronte di crescita tumorale più che sul "core" del tumore. La differenza di mRNA per il VEGF nel "core" tumorale rispetto ai valori rilevati nella mucosa sana (sia essa prelevata a 2 cm del tumore sia al margine di sezione), è indice di una maggiore attività angiogenica a livello della parte centrale del tumore, dove è presente un forte stimolo ipossico. L'ipossia infatti rappresenta uno dei fattori promuoventi l'angiogenesi (66-69); quando un contingente di pochi millimetri di cellule tumorali vira dalla fase di quiescenza alla fase proliferativa infatti, aumentano sia la richiesta di ossigeno e sia quella di nutrienti. Tuttavia la presenza più elevata di mRNA per il VEGF nei campioni del margine macroscopico del tumore, anche rispetto al prelievo di tumore nella zona centrale, suggerisce che questa sia la zona a maggior attività proliferante, capace di liberare in circolo pattuglie di cellule neoplastiche in grado di dare metastasi. A sostegno di questi risultati stanno gli studi di fase III già in corso: infatti i farmaci antitumorali "convenzionali" agiscono su una popolazione di cellule con contenuto genetico instabile che sono in grado di sviluppare mutazioni che generano una farmaco-resistenza. La terapia antiangiogenica, invece, agirebbe su cellule endoteliali normali, con contenuto genetico stabile e, quindi non inclini a sviluppare fenomeni di resistenza. L'associazione di due diversi agenti, proprio perché destinata a interessare popolazioni cellulari diverse, svilupperebbe un effetto sinergico e rappresenterebbe così un ulteriore progresso nel trattamento della malattia neoplastica.

Bibliografia

1. Folkman J: Tumour angiogenesis: diagnostic and therapeutic clinical applications. In: Salomon S.E. Adjuvant therapy of cancer VII (ed), JB Lippincott company, 1993, pp. 27-33
2. Bussolino F, Albini A, Camussi G, et al.: Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 32A(14): 2401-2412, 1996
3. Tomlinson IPM and Bodmer WF: Modelling the consequences of interactions between tumour cells. *Br J Cancer* 75(2):157-180, 1997
4. Stetler-Stevenson WG: Dynamics of matrix turnover during pathologic remodelling of extracellular matrix. *Am J Pathol* 148: 1343-1350, 1996
5. Polverini PJ: How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent disease. *Eur J Cancer* 32A(14): 2430-2437, 1996
6. Sage HE, Bornstein P: Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 266: 14831-12834, 1991
7. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, et al.: Localization of matrix metallo-proteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α 5 β 3. *Cell* 85: 683-693, 1996
8. Koch AE, Halloran MN, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ: Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376: 517-519, 1995
9. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, et al.: Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-22, 1994
10. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al.: Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036-2044, 1994
11. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, et al.: Nitric Oxide Synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99: 2625-2634, 1997
12. Ferrara N: Vascular Endothelial Growth Factor. *Eur J Cancer* 32A(14): 2413-2422, 1996
13. Ferrara N: The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 36:127-137, 1995
14. Marme D: Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* 14: 166-174, 1996
15. Rifkin DB, Moscatelli D: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109:1-6, 1989
16. Gualanis A, Runati M, Belleri M, et al.: Basic fibroblast growth factor overexpression in mouse endothelial cells: an autocrine model of angiogenesis and angioproliferative disease. *Cell Growth Diff* 147-160, 1996
17. Jakson CL, Reidy MA: Basic fibroblast growth factor: its role in the control of smooth muscle cell migration. *Am M J Pathol* 143:1024-1031, 1993
18. Gross JL, Herblin WF, Dvorak BA, et al.: Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. *J Natl Cancer Inst* 85:121-131, 1993
19. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, et al.: Platelet derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 88:1146-1151, 1996
20. Brooks PC: Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 32A (14): 2423-2429, 1996
21. Hynes RO: Integrins. Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992
22. Rak J, Filmus J and Kerbel RS: Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: "Angiogenesis Progression" Hypothesis. *Eur J Cancer* 32A(14): 2438-2450, 1996
23. Folkman J, D'Amore PA: Blood vessel formation: what is its molecular basis. *Cell* 87: 1153-1155, 1996
24. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 340-357, 1990
25. Lynch HT, Lynch JF: Genetics of colonic cancer. *Digestion* 59: 481-492, 1998

26. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IPM, et al.: Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Surg* 35(3): 335-351, 1999
27. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, et al.: Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32A(14): 2513-2519, 1996
28. Takahashi Y, Tucker SL, Kitada Y, et al.: Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 132:541-546, 1997
29. Ellis CJ, Bennet ST, Chambers AF, et al.: Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *Am J Surg Pathol* 20 (10): 1260-1265, 1996
30. Frank R, Saclarides TJ, Leurgans S, et al.: Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann Surg*: 222(6): 695-699, 1995
31. Kang SM, Maeda K, Onoda N et al.: Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumour vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer* 74, 502-507, 1997
32. Saclarides TJ: Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1: 253-260, 1997
33. Vermeulen PB, Roland L, Mertens I, et al.: Correlation of intratumoral microvessel density and p53 protein overexpression in human colorectal adenocarcinoma. *Microvascular research* 51: 164-174, 1996
34. Takahashi Y, Bucana CD, Clearly KR, et al.: P53 vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 79: 34-38, 1998
35. Mooteri MD, Rubin D, Leurgans S: Tumor angiogenesis in primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 39(10): 1073-1080, 1996
36. Fidler IJ: Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: De Vita VT, Hellman S Jr, Rosenberg SA Editors. *Cancer: Principles and practice of oncology* (Fifth ed). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997
37. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al.: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A(14): 2474-2484, 1996
38. Barbareschi M, et al.: Microvessel density quantification in breast carcinomas: assessment by manual vs. a computer-assisted image analysis system. *Appl Immunohistochem* 3: 74-84, 1995
39. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Ass* 58: 457-481, 1958
40. Mattheus DE, Farewell VT: *Statistica Medica: Log-rank test o test di Mantel-Haenzel per il confronto di sopravvivenze*. Ed Minerva Medica, 1988
41. Bresalier RS: The biology of colorectal cancer metastasis. *Gastroenterol Clin North Am* 25(4): 805-820, 1996
42. Weidner N: Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 184: 119-122, 1998
43. Norton JA: Tumor angiogenesis, Editorial. *Ann Surg* 222(6): 693-694, 1995
44. Meyer T and Hart IR: Mechanism of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 34(2): 214-221, 1998
45. Ellis LM and Fidler IJ: Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 32A(14): 2451-2460, 1996
46. Tanigawa N, Amaya H, Matsumara M, et al.: Tumour angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 57(15): 1043-1046, 1997
47. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, et al.: Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 77: 1722-8, 1996
48. Bicknell R and Harris AL: Anti-cancer strategies involving the vasculature-vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Seminars Cancer Biol* 3: 399-407, 1992
49. Zimmerman MA, Craig HS, Harken AH: Surgical implications of therapeutic angiogenesis. *Surgery* 125(3): 243-249, 1999
50. Winlaw DS: Angiogenesis in the pathobiology and treatment of vascular and malignant disease. *Ann Thorac Surg* 64: 1204-1211, 1997
51. Mc Namara DA, Harney JH, Walsh TN, et al.: Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg* 85, 1044-1055, 1998
52. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328, 1994
53. Fidler IJ and Ellis LM: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79: 185-188, 1994
54. Konno H, Tanaka T, Kanai T, et al.: Efficacy of an angiogenesis inhibitor, TPN-470, in xenotransplanted human colorectal cancer with high metastatic potential. *Cancer* 77: 1736-1740, 1996
55. Folkman J: New perspective in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 32A(14): 2534-2539, 1996
56. Fontanini G, Del Mastro L and Bevilacqua G: Determination of angiogenesis in human neoplasm: current prognostic and therapeutic implications. *Forum Trends Exp. and Clin. Med* 8: 1228-142, 1998
57. Hanahan DA: A flankin attack on cancer. *Nat Med* 4:13-14, 1998
58. Asahara T, Bauters C, Zheng LP et al: Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92: 365-371, 1995 (Suppl 2)
59. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, et al.: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasm: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer* 75(9): 1221-1227, 1997
60. Angiolillo AI, Kanegane H, Sgadari C, et al.: Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem. Biophys. Res Commun* 233: 231-237, 1997
61. Donovan D, Harney JH, Toomey D, et al.: Transforming growth factor beta-1 regulation of vascular endothelial growth factor production by breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* 4: 621-7, 1997
62. Gleave ME, Hsieh JT, Wu HC, et al: Epidermal growth factor receptor-mediated autocrine and paracrine stimulation of human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 53: 5300-5307, 1993
63. Goldman CK, Kim J, Wong WL, et al.: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4: 121-33, 1993
64. Hanahan D, Christofori G, Naik P et al.: Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 32A(14): 2386-2393, 1996

65. Moghaddam A, Zhang HT, Fan T, et al: Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 998-1002, 1995
66. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996
67. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al: Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270(31): 189-95, 1995
68. Brogi E, Shatterman G, Wu T, et al.: Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 97: 469-76, 1996
69. Harmey J, Dimitriadis E, Redmond HP, et al.: Macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) is differentially regulated by hypoxia and transforming growth factor beta1. *Ann Surg Oncol* 5: 271-8, 1998