

# Microvascularización de los tumores cerebrales y factor angiogénico en el líquido cefalorraquídeo tumoral \*

S. LÓPEZ-POUSA \*\*, I. FERRER \*\*\*, J. M. VICH \*\*\* Y J. M. DOMENECH MATEU \*\*

\*\* Facultad de Medicina. Departamento de Anatomía. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.

\*\*\* Sección de Neuropatología, Departamento de Anatomía Patológica C.S. Príncipes de España. Hospitalet de Llobregat.

\*\*\*\* Immunolab. Barcelona

\* Beca "X Congreso Internacional de Neurología de Barcelona" (1980)

## RESUMEN

Utilizando el método de tinción de la bencidina se realizó un estudio sobre las características morfológicas de la microvascularización de los tumores cerebrales; paralelamente, en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, se estudió la capacidad angiogénica del LCR de pacientes con tumores.

La densidad vascular se observó reducida en astrocitomas benignos, oligodendrogliomas y craneo-faringiomas, ligeramente aumentada en astrocitomas de grado II y meduloblastomas. Los astrocitomas malignos, glioblastomas y metástasis mostraron patrones vasculares muy aumentados. Los meningiomas están intensamente vascularizados y menos los neurinomas.

Los LCR de pacientes con tumores primitivos del SNC o a distancia mostraron actividad angiogénica en el 93% de los casos. El 27% de los LCR controles fueron positivos observándose correlación con la edad.

## SUMMARY

Using the benzidine stain a study was made of the characteristics and morphology of the microvascularization of brain tumours; parallel to this study, the angiogenic capacity of the CSF of patients with brain tumours was investigated using as a model the chorioallantoid membrane of chick embryos.

Vascular density was reduced in benign astrocytomas, oligodendromas and craneopharyngiomas, somewhat increased in astrocytomas grade II and meduloblastomas. Increased vascular patterns were observed in malignant astrocytomas, glioblastomas and their metastases. Meningiomas are intensely vascularized, and neurinomas less so.

The CSF of patients with primary CNS tumours or with distant metastases showed angiogenic activity in 93% of cases. Control CSF's were positive in 27% of cases. A positive correlations was observed with age.

## INTRODUCCION

Hasta la introducción del método de tinción de la bencidina (*Lepehne*<sup>1</sup> y *Pickworth*<sup>2</sup>) la mayoría de las investigaciones sobre vascularización cerebral y tumoral se realizaron con técnicas de inyección de contraste<sup>3,4,5,6,7</sup>. Aquel método permite una mayor facilidad en la recogida de muestras, motivo por el cual fue ampliamente utilizado<sup>8,9,10</sup> y sigue siéndolo actualmente en estudios sobre microvascularización cerebral<sup>11,12,13</sup>.

A partir de los trabajos de *Algire* y *Chalkley*<sup>14</sup> las investigaciones sobre vascularización tumoral se han polarizado hacia el estudio del Factor Angiogénico Tumoral (FAT)<sup>15,16,17</sup> presente en tumores experimentales<sup>18,19,20</sup> y humanos<sup>21,22,23,24</sup>.

En este trabajo se han estudiado, a) los aspectos morfológicos de la microvascularización cerebral tumoral y b) la posible presencia de factores angiogénicos solubles en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) y de otros órganos.

## MATERIAL Y METODOS

### a) Estudio de la microvascularización

Muestras quirúrgicas (90%) o necrópsicas (10%) fueron procesadas para estudios morfológicos y de la microvascularización (**cuadro 1**). Las piezas fueron fijadas en formol (formaldehído 10%) para los estudios histológicos y en formol saturado para el estudio de la microvascularización con el método de la bencidina. El método de la bencidina se realizó teniendo en cuenta las modificaciones que introdujo *Fazio* (1939)<sup>10</sup> al método descrito inicialmente por *Pickworth* (1934)<sup>2</sup> modificado ligeramente. Las muestras fueron recogidas en una solución hipertónica de formol saturada con sacarosa y cloruro sódico (solución acuosa de sacarosa a saturación 45 c.c., formaldehído al 35%, 15 c.c.) durante tres días. Una vez fijadas se realizaron cortes por congelación de 50 micras, que fueron recogidos en agua destilada. Posteriormente se mantuvieron durante 20 minutos a 60.° C., en

una solución formada recientemente por A) clorhidrato de bencidina 0,2 grms., ácido acético, 2 c.c. y agua destilada 100 c.c., y B) nitroprusiato sódico, 0,2 grms., y agua destilada, 100 c.c., mezcladas a partes iguales. A continuación los cortes se trasladaron a una solución acuosa al 25% de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a doce volúmenes durante 20 minutos a 60.° C. Posteriormente las muestras fueron montadas en medio sintético previa deshidratación.

### b) Estudio de la capacidad angiogénica en LCR

Muestras de LCR pertenecientes a 69 pacientes (49 varones y 20 mujeres) cuyas edades oscilaron entre 24 y 81 años (edad media 57), con patología tumoral (tumores primarios del SNC o de otros órganos) o sin ella (controles, pacientes sometidos a revisión o con accidentes vasculares cerebrales isquémicos) (**cuadro 2**) fueron recogidas por punción lumbar o ventricular (durante la intervención quirúrgica), en condiciones de máxima asépsia y ambiente estéril y almacenadas a 4.° C., hasta su esterilización (mediante filtración a través de filtros Sartorius de 0,22 micras) y liofilización en viales estériles en cantidades de 0,2 ml. Los viales liofilizados se guardaron a menos 4.° C., hasta la realización del text.

La implantación del LCR liofilizado se realizó en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (*Gallus Domesticus*) de 8 a 9 días siguiendo la metodología utilizada por otros autores<sup>23,24</sup>. La lectura se efectuó a las 48 horas, bajo estereomicroscopia y tras fijación mediante controles fotográficos.

Todas las muestras se testaron por triplicado. Se consideró positiva cuando existió intensa neovascularización (**fig. 1A**) en las tres pruebas, positiva débil cuando en algunas de las pruebas se observó poca vascularización y como negativa cuando no existió vascularización neoformada en ninguna (**fig. 1B**). La experiencia se planteó mediante la técnica de doble ciego, valorándose los resultados mediante los test estadísticos prueba de chi-cuadrado y U de Mann-Whitney.

**Cuadro 1**

<b>CLASIFICACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES *</b>	
1. Tumores de origen congénito	
—Craneofaringioma	1
2. Tumores de las meninges	
—Meningiomas	14
3. Tumores del tejido reticular	
—Reticulosarcoma primario	1
—Linfoma secundario	1
4. Tumores de los vasos sanguíneos	
—Hemangioblastoma	1
5. Tumores de origen neuroectodérmico	
5.1. Tumores de la serie glial	
—Astrocitomas	15
—Glioblastomas multiformes	10
—Oligodendrogliomas	3
5.2. Tumores de la serie neuronal	
—Meduloblastomas	2
6. Tumores de los nervios intracraneales	
—Neurinomas	6
7. Metástasis intracraneales	
—Metástasis	10
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>

\* Rubinstein, L. J. (1971)

**Cuadro 2**

DIAGNOSTICOS	N.º de casos	RESPUESTA ANGIOGENICA		
		Positiva	Positiva Débil	Negativa
Tumores primitivos SNC				
—Craneofaringiomas	1		1	
—Meningiomas	2	3		
—Hemangioblastomas	1		1	
—Astrocitomas III	1		1	
—Glioblastomas	2	2		
—Papilomas	1			1
—Neurinomas	4	1	3	
Tumores de otros órganos				
—Gastricos	2		2	
—Leucosis	1	1		
—Laringeos	2		2	
—Lengua	2		2	
—Linfomas	1	1		
—Pulmón	8	3	5	
—Prostata	1	1		
—Vesicales	1	1		
—Origen desconocido	1			1
Controles	37	1	9	27
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>14</b>	<b>26</b>	<b>29</b>
		p < 0.005		
		p < 0.001		

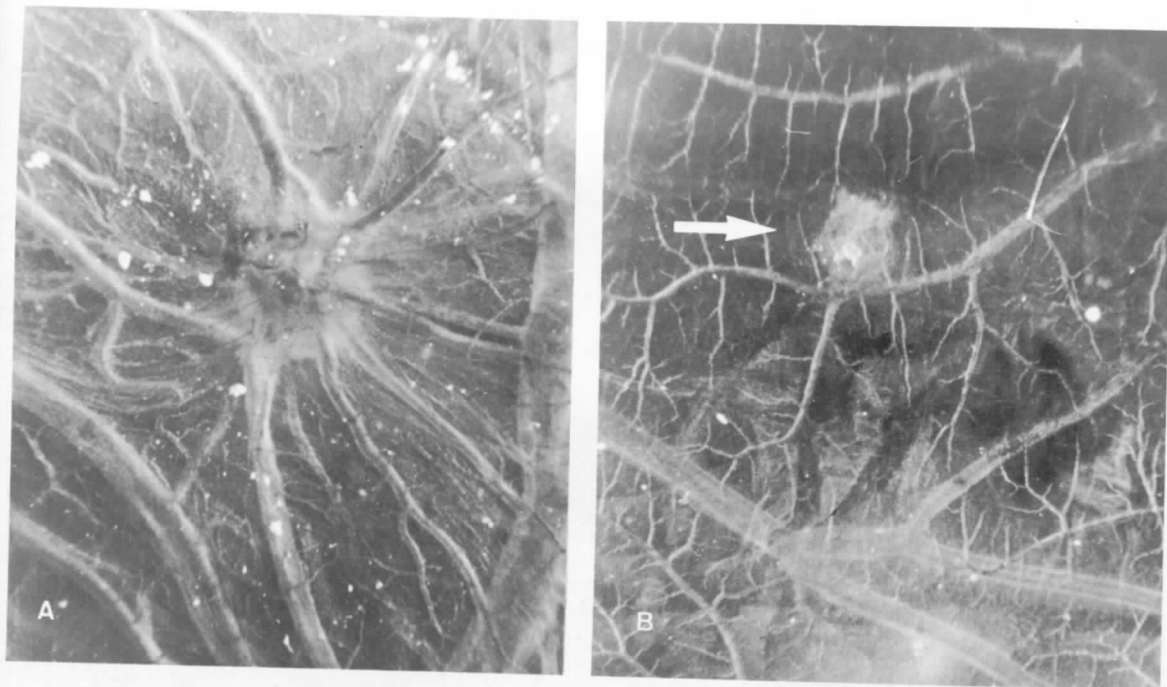


Fig. 1.— Implantación en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo de 0,2 ml. de LCR liofilizado. A) Desarrollo de neovascularización en torno a la zona de

implantación, en el caso de un glioblastoma multiforme. B) Ausencia de respuesta vascular en un control. Lectura a las 48 horas. X 20.

## RESULTADOS

### a) Microvascularización

La exposición de los resultados se realizó siguiendo la clasificación histológica propuesta por Rubestein (1971)<sup>25</sup> (cuadro 1).

#### 1. Tumores de origen congénito.

Craneofaringioma. La densidad vascular de los vasos aparece disminuida. Se observan zonas avasculares en áreas adamantionomas, que ocasionalmente pueden estar en relación con algún vaso. (fig. 2).

#### 2. Tumores de las meninges.

Meningiomas. Tanto la disposición de los vasos como su configuración externa fue muy variable. Las formas fibrilares mostraron patrones vasculares siguiendo los haces celulares. Las formas meningoepiteliales a menudo disponen sus vasos como una amplia red vascular con vasos de fino calibre y distribu-

ción irregular. Vasos de calibre superior pueden observarse en zonas periféricas del tumor. Los vasos de pequeño calibre conservan los perfiles bien delimitados, los más gruesos muestran abombamientos. Las áreas intercelulares, ocupadas por fibras de colágeno o de reticulina, son avasculares, las psamomas, pobremente vascularizadas muestran vasos elongados y de grueso calibre. (figs. 3A y 3B).

#### 3. Tumores del tejido reticular.

Los linfomas primarios reticulosarcoma—microglioma— y los linfomas secundarios presentan características similares. La microvascularización aumentada globalmente en las zonas de expansión tumoral muestra en la periferia mínimas alteraciones. Los vasos presentan formas toscas (fig. 4).

#### 4. Tumores de los vasos sanguíneos.

Hemangioblastomas. La diferenciación de los vasos mediante la técnica de la bencidina

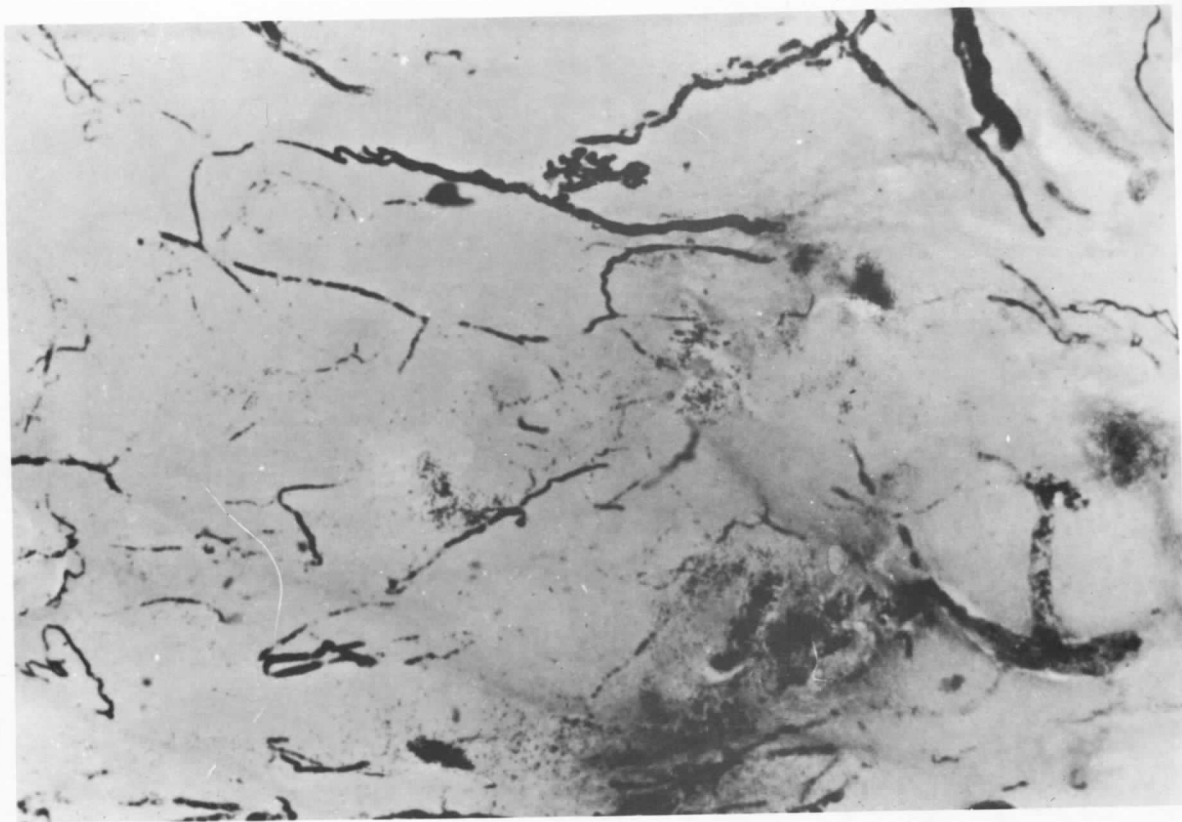


Fig. 2.— Tinción de bencidina de un craneofaringioma. Zona adamantinomatosa en la que se observa una disminución de la microvascularización. X 63.

se hace difícil, debido al abundante número de vasos, su proximidad y a sus dilataciones. Las imágenes con reticulina o con hematoxilina-eosina permiten un mejor reconocimiento de los vasos.

## 5. Tumores de origen neuroectodérmico.

### 5.1. Tumores de la serie glial.

**Astrocitomas.** En los astrocitomas de bajo grado de malignidad se observó la densidad vascular inferior a la del parénquima colindante, conservando sus vasos la configuración normal (fig. 5A).

Los astrocitomas de mayor grado de malignidad (grados III y glioblastomas) presentaron globalmente aumento de la vascularización (fig. 5B), con patrones vasculares poco uniformes, variando de una zona a otra, observándose una mayor proliferación en las zonas periféricas del crecimiento tumoral.

Los glioblastomas multiformes mostraron áreas avasculares en las zonas de necrosis y vasos paralelos a la empalizada de las áreas de pseudoempalizada (fig. 6A), el patrón vascular fue menos homogéneo que en los astrocitomas grado III, mostrando, en los vasos que nacen de las meninges, disposiciones irregulares que recuerdan imágenes arboriformes (fig. 6B).

**Oligodendrogliomas.** Los oligodendrogliomas presentaron vasos alargados, finos y con disposición trabecular, dando la impresión de pequeñas arborizaciones terminales. En los oligodendrogliomas de gran malignidad se observó junto a las imágenes descritas, otras de características semejantes a las de los glioblastomas (fig. 7).

### 5.2. Tumores de la serie neuronal.

**Meduloblastoma.** La microvascularización



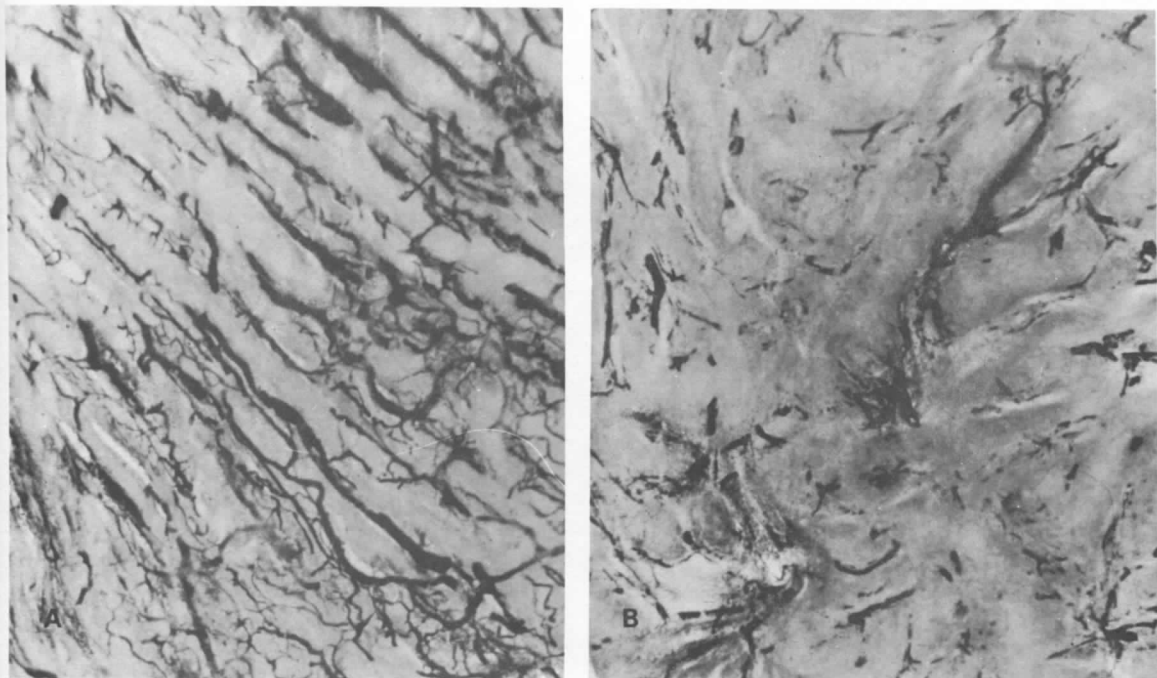
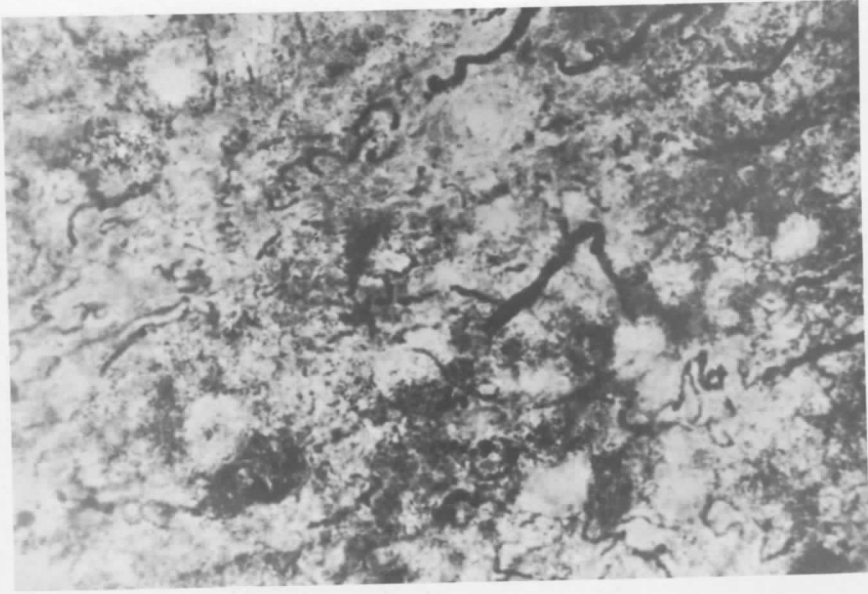


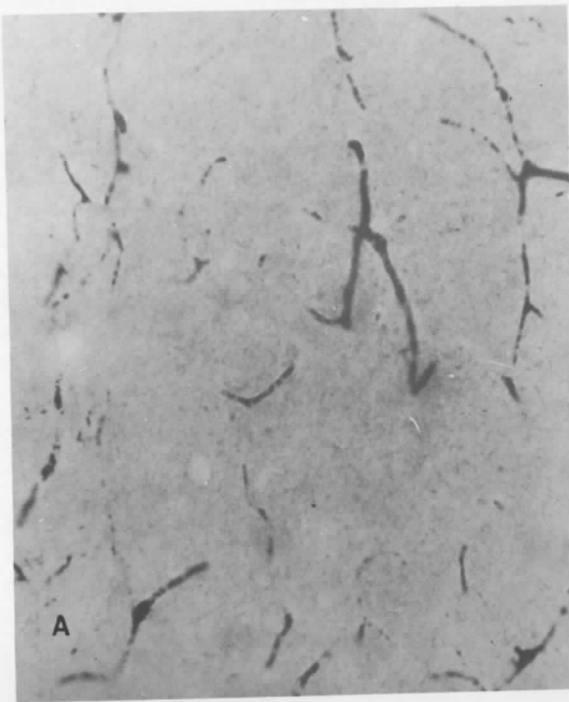
Fig. 3.— Tinción de bencidina de un meningioma. A) Patron vascular en disposición paralela a los haces celulares (m. fibrilar). B) Disposición irregular de los vasos en un meningioma meningotelial. X 80.

### Cuadro 3

DIAGNOSTICOS	N.º de casos	Respuesta angiogénica					
		Positiva		Positiva Débil	Negativa		
Tumores primitivos del SNC	13	6	46	6	46	1	8
Controles	37	1	3	9	24	27	73
	$\chi^2 11.6 \quad p < 0,001$						
Tumores de otros órganos	19	7	37	11	58	1	5
	$\chi^2 9.3 \quad p < 0,005$						
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>14</b>		<b>26</b>		<b>29</b>	
	$p < 0.0005 \quad \chi^2 = 13$						
	$p < 0.0001 \quad \chi^2 = 28.67$						



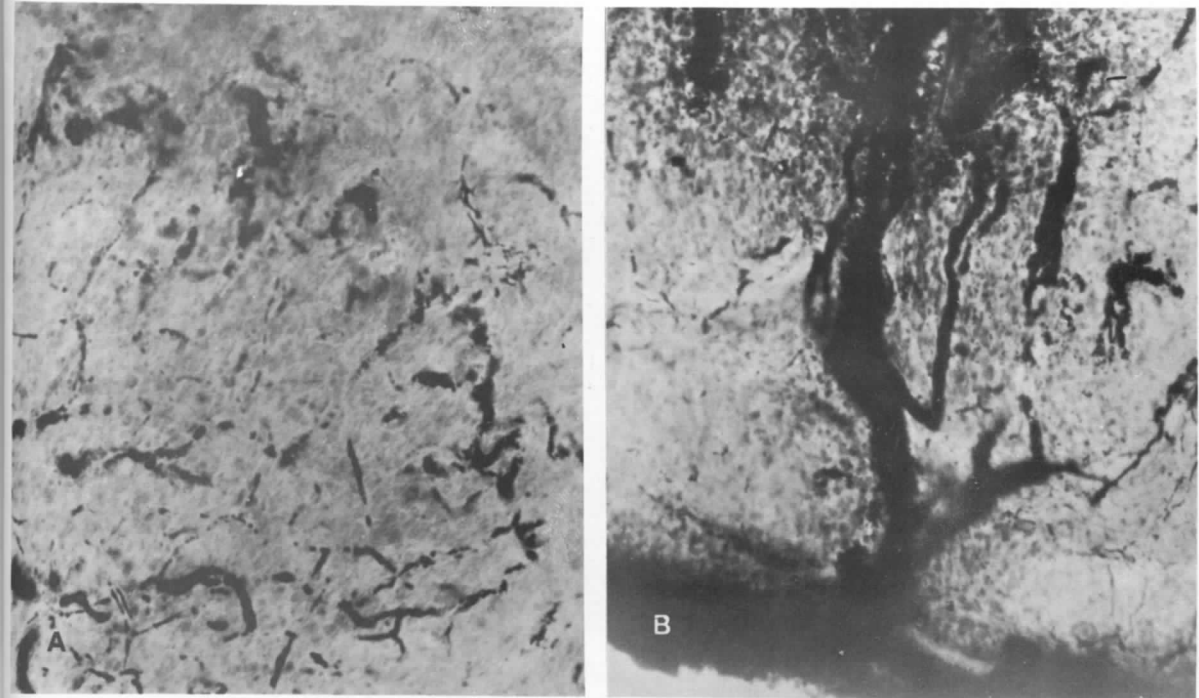
**Fig. 4.**— Tinción de bencidina de un linfoma primario de SNC en el que se pueden ver vasos gruesos, irregulares y con perfiles toscos. X 160.



**Fig. 5.**— Tinción de bencidina de tumores de la serie glial. A) Astrocitoma grado I, en el que se observan vasos de aspecto normal y en número reducido. B) Astrocitoma

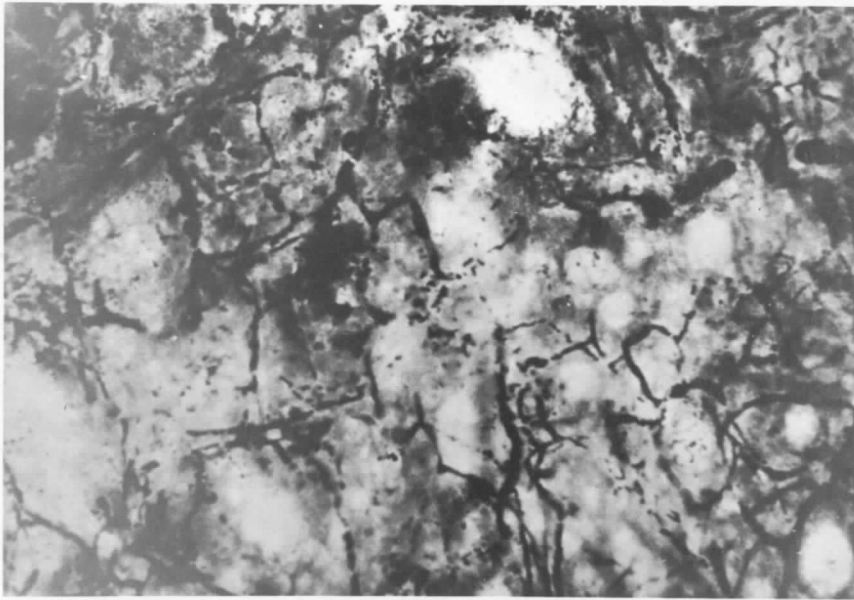
grado III, disposición irregular de los vasos cuyos perfiles son toscos, engrosados y con numerosas prolongaciones. X 160.



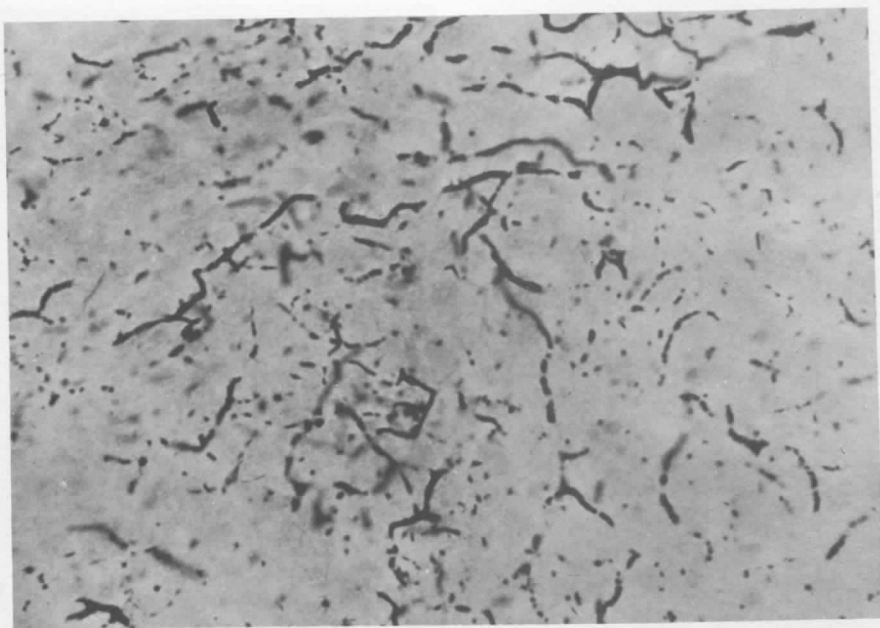


**Fig. 6.**— Tinción de bencidina de un glioblastoma multiforme. A) Disposición paralela de los vasos a una zona de empalizada. B) Tronco vascular procedente de la

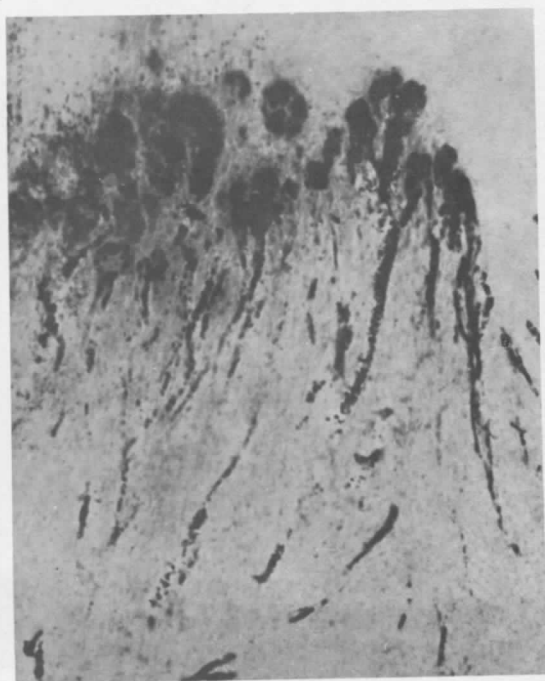
meninge que se ramifica en una distribución arboriforme. X 160.



**Fig. 7.**— Tinción de bencidina de un oligodendroglioma en la que pueden verse las ramificaciones terminales en forma de arbusto. X 160.



**Fig. 8.**— Tinción de bencidina de un medulloblastoma en la que puede observarse un incremento del número de los vasos irregularmente distribuidos. X 160.



**Fig. 9.**— Tinción de bencidina de un neurinoma en la que se observa la disposición típica de los vasos neoformados. X 80.

se observó globalmente aumentada, con vasos de perfiles toscos y tortuosos. Las imágenes observadas fueron muy similares a las de los astrocitomas de mediano grado de malignidad (fig. 8).

#### 6. Tumores de los nervios intracraneales.

**Neurinomas.** Los neurinomas mostraron la vascularización aumentada. Imágenes vasculares dispuestas a modo de un abanico fueron observadas en las zonas de contacto de los vasos con las áreas fibrilares y laxas, en las zonas vecinas los vasos se hallan desordenados (fig. 9).

#### 7. Metástasis intracraneales.

La vascularización de las metástasis depende del estadio evolutivo del proceso. En fases muy tempranas del desarrollo (pequeños nidos celulares inferiores a 1 mm. de diámetro) no se observaron alteraciones de la vascularización en el parénquima vecino, estando la metástasis sin vasos (fig. 10A).

Cuando el tamaño de la metástasis es superior, pequeños brotes vasculares, de calibres variables y con trayectos serpenteantes e intensamente anastomados, incluso formando ovillos, se dirigen a su interior. A medida que crecen las metástasis aparecen zonas avasculares que corresponden a espacios necróticos (fig. 10B). El parénquima que rodea al proceso expansivo metastásico presenta disminución de la densidad vascular y aunque algunos vasos están dilatados, da la impresión de una zona hipoperfundida.

#### b) Angiogénesis

Los LCR mostraron respuesta angiogénica positiva en el 46% de los tumores primitivos del SNC, en el 37% de los tumores a distancia y sólo en el 3% de los controles. Respuestas positivas débiles se observaron en el 46% de los tumores primitivos del SNC, en el 58% de los tumores a distancia y en el 24% de los controles. Presentaron resultados negativos

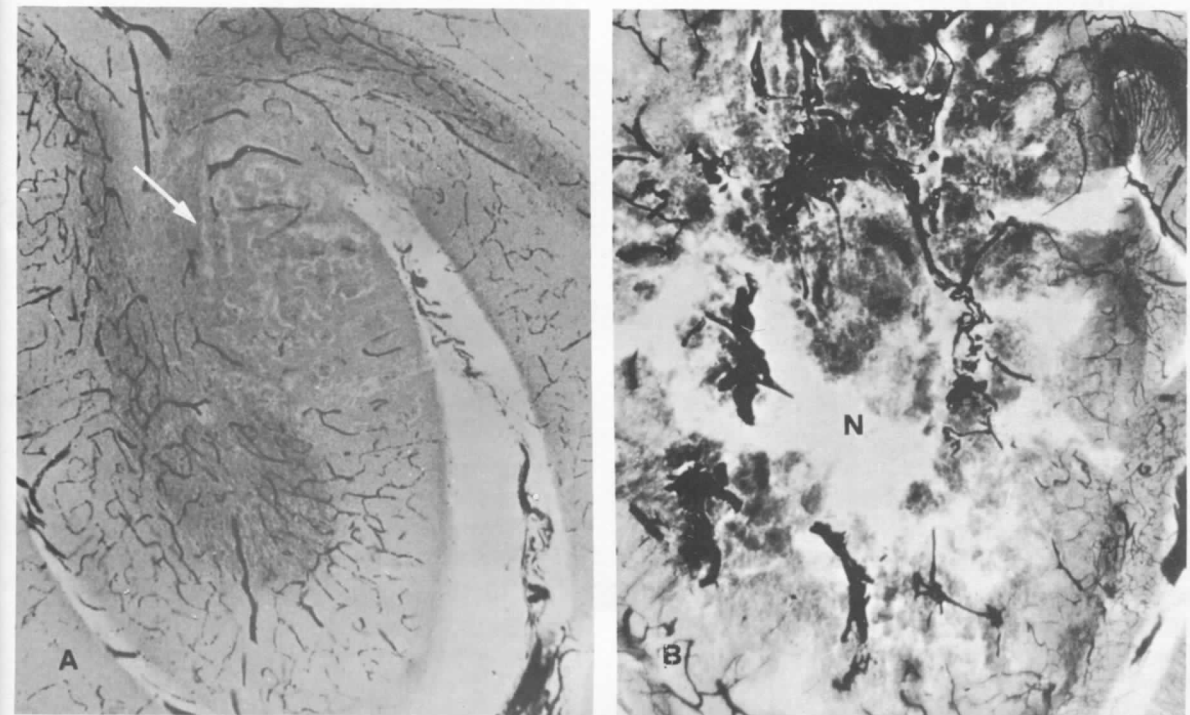


Fig. 10.— Tinción de bencidina de metástasis. A) Pequeño foco metastásico en la capa molecular cerebelosa en un estadio avascular. B) A medida que la metástasis

se desarrolla numerosos brotes vasculares se dirigen al interior de la metástasis. La zona central (N) presenta necrosis.

el 8% de los tumores primitivos del SNC, el 5% de los tumores a distancia y el 73% de los controles (**cuadros 2 y 3**).

En la comparación de los resultados positivos entre los LCR primitivos del SNC y los controles se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (chi-cuadro 11,6,  $p < 0.001$ ), que también lo fueron para los LCR de los tumores a distancia (chi-cuadro 9,3,  $p < 0.005$ ). La valoración conjunta de los resultados positivos entre pacientes con tumores y controles dio una diferencia estadísticamente muy significativa (chi-cuadro 13,  $p < 0.0005$ ) que aumentó hasta una  $p < 0.001$  cuando se agruparon los resultados positivos y positivos débiles frente a los controles (**cuadro 3**).

No existió correlación entre edad, sexo y respuesta angiogénica. De los LCR controles, los valorados negativamente presentaron una edad media inferior a la de los positivos (46 frente a 62 años) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.025$ ).

Las respuestas angiogénicas más intensas (precocidad en la aparición de los vasos y número) las mostraron los LCR de glioblastomas, meningiomas, neurinomas y los procedentes de pacientes con neoplasia de pulmón (oatts-cell).

## DISCUSION

*Sahs y Alexander* (1939)<sup>9</sup> utilizaron el método de la bencidina para el estudio de la microvascularización cerebral. Diferencias en la clasificación histológica de los tumores no permitió correlacionar sus observaciones con las muestras, aun cuando en líneas generales sus resultados son extrapolables. La afirmación realizada por estos autores en cuanto a que la inspección de las preparaciones de la bencidina sería suficiente para llegar al diagnóstico histológico, aunque útil para enfatizar un cierto grado de especificidad en los patrones de microvascularización, no puede sostenerse. Los tumores de la serie glial de baja malignidad muestran la densidad vascular reducida, incrementándose a medida que aumenta el grado de malignidad observándose grandes alteraciones en los patrones vasculares de los glioblastomas, más intensas en las

zonas periféricas de crecimiento tumoral con algunas similitudes con las metástasis cerebrales<sup>26</sup>. Los meningiomas presentan un patrón vascular rico sin que pueda establecerse una correlación entre incremento de la vascularización y su malignidad, la histología perfila la disposición de los vasos. Los neurinomas, intensamente vascularizado, aunque menos que los meningiomas, presentan áreas en las que la disposición de los vasos adoptan formas características. Los meduloblastomas tienen patrones vasculares semejantes a los astrocitomas de mediano grado de malignidad y los linfomas a los astrocitomas de mayor grado de malignidad (astrocitomas grado III), aun cuando en los linfomas la morfología vascular se conserva en las zonas periféricas con invasión tumoral. Puede establecerse que tumores con escasas alteraciones morfológicas con el método de la bencidina (astrocitomas grado I y oligodendrogliomas de baja malignidad) presentan cambios discretos a nivel ultraestructural y que cuando existen alteraciones morfológicas intensas con la tinción de bencidina se han observado alteraciones ultraestructurales que difieren de un tipo histológico a otro<sup>27</sup>.

El hallazgo de actividad angiogénica en LCR tumorales concuerda con las observaciones realizadas con humor acuoso de pacientes con tumores primarios o metastásicos oculares<sup>24</sup>. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos a partir de tejidos tumorales del SNC<sup>18,21,23</sup>. La existencia de respuestas angiogénicas, no sólo en los LCR de tumores primarios del SNC sino también en los pacientes con tumores a distancia, en los que no existió evidencia clínica ni por tomografía computarizada de metástasis cerebral hace suponer la posibilidad de que el FAT liberado por el tumor difunda a través de la sangre y pase la barrera hematoencefálica.

La distinta capacidad de respuesta angiogénica, dependiente de la histología tumoral, observada con los LCR de tumores primarios del SNC coincide con las observaciones de otros autores<sup>21,28</sup> lo que sugiere la existencia de una correlación entre la respuesta vascular "in vivo" y la potencia del FAT "in vitro", que se ve apoyado al comparar los patrones vasculares observados con la bencidina y las

respuestas angiogénicas obtenidas en la membrana corioalantoidea a partir de los LCR. Sin embargo esto no supone especificidad histológica, ni tampoco parece que pueda deberse exclusivamente a la cantidad de FAT. Reacciones vasculares de intensidad variable fueron observadas cuando se implantaron cantidades iguales de FAT procedentes de diferentes tumores<sup>20</sup>. Implantes con LCR tumoral en concentraciones diversas, realizados por nosotros, no mostraron diferencias significativas en cuanto a la respuesta angiogénica. El problema sigue estando insuficientemente

estudiado. Extractos de tejidos normales no indujeron angiogénesis<sup>17,20</sup>. Tampoco se observó con humores acuosos de pacientes controles<sup>24</sup>. LCR de pacientes controles, en los que no existió evidencia clínica de enfermedades neoplásicas mostraron actividad angiogénica de los casos, observándose una clara relación con la edad. El hallazgo de este alto % de respuestas positivas nos hace pensar en que la actividad angiogénica pueda ser debida a un factor intermediario afin a numerosos procesos, lo que se ve apoyado en investigaciones recientes<sup>29</sup>.

### Agradecimientos:

*Este trabajo ha sido realizado con la colaboración de los Servicios de Neurocirugía de las Residencias Sanitarias de Valle Hebrón y Bellvitge, y los Servicios de Neurocirugía, Medicina Oncológica y Neurología del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau.*

### BIBLIOGRAFIA

1. Lepehne, G.: Zerfall der Blutkörperchen beim Ikterus infektiosus. *Beitr. Z. Path. Anat. U. Z. Allg. Path.* 65: 163, 1919.
2. Pickworth, F.A.: A new method of study of the brain capillaries and Its application to the regional localization of mental disorder. *J. Anat.* 69: 62, 1934.
3. Duret, H.: Recherches anatomiques sur la circulation de l'encephale. *Arch. Phys. Norm. Path.* (2 ser.) 1: 60, 1874.
4. Putman, T. J.: The cerebral circulation: Some new points in Its anatomy, physiology and pathology. *J. Neurol. Psychopath.* 17: 193, 1937.
5. Suh, T. and Alexandre L.: Vascular system of the human spinal cord. *Arch. of Neurol and Psych.* 41: 659, 1939.
6. Campbell, A.C.P.: Variation in vascularity and oxidase content in different regions of the brain of the cat. *Arch. of Neurol. and Psych.* 41: 223, 1939.
7. Goldmann, E.: The growth of malignant disease in man the lower animals with special reference to vascular system. *Proc. Roy. Soc. Med.* 1: 1, 1907.
8. Campbell, A.C.P.; Alexandre, L. and Putman, T.J.: Vascular pattern in various lesions of the human central nervous system. *Arch. Neurol. Psychiat.* 42: 44, 1939.
9. Sahs, A. L. and Alexander, L.: Vascular pattern of certain intracranial neoplasms. *Arch. Neurol. Psychiat.* 42:44, 1939.
10. Fazio, G.: L'Angioarchiteltonica del midollo spinale umano e i suoi rapporti con le citomieloarchitectonica. *Riv. Par. Nerv. Ment.* 52: 252, 1939.
11. Fang, H.C.H.: The studies of cerebral arterioles and capillaries in normal and pathologic status in man. In *Pathology of cerebral microcirculation*. Edited by J. Cervos-Navarro. De Guyter. Berlin 431, 1974.
12. Fang, H.C.H.: Observations on aging characteristics of cerebral blood vessels, macroscopic and microscopic features. In *Neurobiology of Agings*. Edited by Robert D. Terry. Raven Press. New York 155, 1976.
13. Mossakowski, M.J.: Cerebral circulation: Disturbances in various hypoxic conditions. In *Pathology of cerebrospinal Microcirculation*. Edit. Cervos-Navarro. Raven Press. New York, 161, 1978.
14. Algire, G.H. and Chalkley, H.W.: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl. Cancer Inst.* 6: 73, 1945.
15. Greenblatt, M. and Shubik, P.: Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 111, 1968.
16. Folkman, J.; Meler, E.; Abernathy, C and Williams, G.: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133: 275, 1971.
17. Folkman, J. and Cotran R.: Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev. Exp. Pathol.* 16: 207, 1976.
18. Klagsbrun, M.; Knighton, D. and Folkman, J.: Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* 36: 110, 1976.
19. Roussel, F.: Activité angiogenitrice au sein des

tumeurs. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*. 173: 818, 1979.

20. Phillips, P.; Steward, J.K. and Kumar S.: Tumor angiogenesis factor (TAF) in human and animal tumours. *Int. J. Cancer*. 17: 549, 1976.

21. Kelly, P.J.; Suddith, R.L.; Hutchison, H.T.; Werrbach, K. and Haber B.: Endothelial growth factor present in tissue culture of CNS tumors. *J. Neurosurg*. 44: 342, 1976.

22. Gullino, P.M.: Natural history of breast cancer. Progression from hyperasia to neoplasia as predicted by angiogenesis. *Cancer*. 39: 2697, 1977.

23. Phillips, P. and Kumar, S.: Tumor angiogenesis factor (TAF) and its neutralisation by a xenogeneic antiserum. *Int. J. Cancer*. 23: 82, 1979.

24. Tapper, D.; Langer, R.; Bellows, A.R. and Folkman

J.: Angiogenesis capacity as a diagnostic marker for human eye tumors. *Surgery*. 86: 36, 1979.

25. Rubinstein, L.J.: Tumors of the CNS. Published by the *Armed Forces Institute of Pathology*. Washington, D.C. 20305.

26. López-Pousa, S. y Ferrer I.: Vascularización de las metástasis cerebelosas. Un estudio con el método de la bencidina. *Morf. Norm y Patol*. 3: 465 (1979).

27. Ferrer, I. y López-Pousa, S.: Microvascularización de los tumores cerebrales. Un estudio con bencidina y ultraestructura. *Morf. Norm y Patol*. 4: 13, 1980.

28. Brem, S.; Cotran, R. and Folkman, J.: A quantitative method for histological grading. *J. Natl. Cancer Inst*. 48: 347, 1972.

29. Brown, R.; Weiss, J.B.; Tomlinson, I.W.; Phillips P. and Kumar S.: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumours. *Lancet* 29: 682, 1980.