

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Área de Concentração em Cirurgia

**FATOR TECIDUAL E DENSIDADE
MICROVASCULAR COMO FATORES
PREDITIVOS DE METÁSTASES
GANGLIONARES NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Gerson Schulz Maahs

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários para obtenção de título de
Doutor em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Porto Alegre

2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M111f Maahs, Gerson Schulz

Fator tecidual e densidade microvastular como fatores preditivos de metástases ganglionares no carcinoma epidermóide de boca / Gerson Schulz Maahs; orient. Gustavo Franco Carvalho; Porto Alegre: PUCRS, 2008.

84f.: gráf. il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Cirurgia

1. ANGIOGÊNESE. 2. AGENTES INDUTORES DA ANGIOGÊNESE. 3. FATOR TECIDUAL. 4. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 5. NEOPLASIAS BUCAIS / Cirurgia. 6. MICROCIRCULAÇÃO/ patologia. 7. NEOVASCULARIZAÇÃO PATOLÓGICA. 8. IMUNOISTOQUÍMICA. 9. PROGNÓSTICO. 10. ESTUDOS DE COORTES. I. Carvalho, Gustavo F. II. Título.

C.D.D. 616.99431

C.D.U. 616.31-006:576.385.5(043.2)

N.L.M. WU 280

Dedicatória

Aos meus pais Norberto e Nailê exemplos de caráter e de vida. Modelos de minha formação pessoal.

À minha esposa Marcia que sempre me incentivou e que com sua admiração e amor foi uma constante para transpor meus obstáculos.

Aos meus filhos Gerhard e Thomas que são parte deste desafio.

Aos meus familiares que, embora distantes, sempre me confortaram.

Agradeço aos meus colegas do curso de doutorado pela convivência afetiva, pelo estímulo e solidariedade durante as disciplinas cursadas.

Aos professores que atuaram de forma profissional, séria e estimulante para o objetivo de ensinar.

Ao meu orientador, professor Dr. Gustavo Carvalhal que de forma serena objetivou esta tese.

Ao professor Vinícius Duval da Silva que disponibilizou o equipamento e foi mestre no ensino para a leitura dos resultados.

Ao Dr. Mario Wagner, pelas sugestões e auxílio na análise estatística.

Às funcionárias da Pós-Graduação em Medicina, Sônia e Eloá, sempre zelosas no auxílio aos trâmites administrativos.

Ao médico patologista Dr. Jorge Zanol e aos Serviços de Patologia e Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS por disponibilizar o material de minha pesquisa.

Aos meus amigos e colegas médicos pelo estímulo e solidariedade.

Aos meus pacientes que a sua saúde me confiaram.

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Epidemiologia e fatores de risco.....	4
3.2 Diagnóstico do câncer de boca.....	5
3.3 Estadiamento.....	8
3.4 Progressão do tumor.....	10
3.5 Exames complementares.....	12
3.6 Fatores de prognóstico.....	13
3.6.1 Fatores clínicos de prognóstico.....	13
3.6.1.1 Localização do tumor na boca.....	14
3.6.1.2 Tamanho do tumor – Classificação T.....	14
3.6.1.3 Espessura do tumor.....	15
3.6.1.4 Aspecto da lesão no local primário.....	16
3.6.1.5 Metástases linfáticas – Classificação N.....	16
3.6.2 Fatores histológicos de prognóstico.....	21
3.6.3 Fatores moleculares de prognóstico.....	24
3.6.3.1 Densidade microvascular e câncer.....	27
3.6.3.2 Fator tecidual, angiogênese e câncer.....	33
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	42
4.1 População e amostra.....	42
4.2 Coleta de dados.....	43
4.2.1 Aspectos clínicos e variáveis demográficas.....	43
4.2.2 Aspectos histológicos.....	44
4.2.3 Imunoistoquímica.....	44
4.3 Análise da Imunoistoquímica.....	45
4.4 Análise Estatística.....	49
4.5 Ética.....	50
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Aspectos clínicos e variáveis demográficas.....	52
5.2 Aspectos histológicos.....	54
5.3 Densidade Microvascular e Fator Tecidual.....	55
5.4 Características clínico-patológicas, fator tecidual, densidade microvascular e metástase cervical.....	57
5.5 Sobrevida em função da expressão do fator tecidual, densidade microvascular e a presença de metástase.....	59

6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	71
8. LISTA DE ABREVIATURAS.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sinais e sintomas do câncer de boca.....	07
Tabela 2	Classificação TNM para câncer de boca- AJCC.....	09
Tabela 3	Estadiamento clínico do câncer de boca.....	10
Tabela 4	Níveis de drenagem linfática do pescoço.....	11
Tabela 5	Substâncias endógenas que apresentam efeito angiogênico.....	27
Tabela 6	Distribuição dos pacientes na classificação T pré e pós-operatória.....	52
Tabela 7	Distribuição dos pacientes na classificação N pré e pós-operatória.....	53
Tabela 8	Distribuição dos pacientes conforme a localização do tumor.....	53
Tabela 9	Distribuição dos pacientes conforme o grau de diferenciação celular.....	55
Tabela 10	Expressão do fator tecidual em espécimes de carcinoma epidermóide de boca.	56
Tabela 11	Comparação entre os grupos com metástase e sem metástase quanto a variáveis demográficas, características clínicas, histológicas, fator tecidual e densidade microvascular	58
Tabela 12	Modelo de regressão logística multivariável ajustando o efeito do fator tecidual [alta expressão] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de metástases.....	59
Tabela 13:	Modelo de regressão de Cox multivariável ajustando o efeito do fator tecidual [alta expressão] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de óbito.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos anti-CD 34 em secção de tumor (magnificação de 200X).....	47
Figura 2	Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 200X).....	48
Figura 3	Baixa expressão do fator tecidual em carcinoma epidermóide de boca (magnificação de 200x).....	48
Figura 4	Alta expressão do fator tecidual em carcinoma epidermóide de boca (magnificação de 200x).....	49
Figura 5	Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência geral de óbitos pela doença.....	54
Figura 6	Correlação entre a expressão do FT e a densidade microvascular.....	57
Figura 7	Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada pela presença ou não de metástases.....	60
Figura 8	Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada por grupos de baixa e alta expressão do fator tecidual.....	60
Figura 9	Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada por grupos de baixa e alta densidade microvascular.....	61

RESUMO

A presença de metástase cervical é o fator prognóstico mais relevante no carcinoma epidermóide de boca. Fatores clínicos e histológicos estão associados com o desenvolvimento da metástase cervical, porém a pesquisa de fatores moleculares está sendo amplamente realizada nos últimos anos. O objetivo deste estudo é avaliar a associação da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular como fatores de risco para a presença de metástase cervical nestas neoplasias.

A expressão do fator tecidual e a densidade microvascular foram aferidas pela técnica de imunohistoquímica e suas associações com a presença de metástase cervical foram estudadas em 53 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de boca tratados cirurgicamente pelo autor. Características clínicas e histológicas também foram pesquisadas e associadas com a presença de metástase cervical.

Somente três casos não expressaram o fator tecidual. A alta expressão do fator tecidual, mais de 50% das células tumorais intensamente coradas, foi encontrada em 13 pacientes (24,5%). A densidade microvascular por paciente variou entre 4 e 47,8 vasos, com uma média de 18,47 vasos. A alta densidade microvascular (mais de 20 vasos por paciente) ocorreu em 21 pacientes (39,6%). O estadiamento clínico, a infiltração neuronal e as embolizações vasculares foram os fatores preditivos de metástase de maior relevância.

Este estudo descreve pela primeira vez a expressão do fator tecidual como fator prognóstico de metástase e de óbito no carcinoma epidermóide de boca. Os resultados indicam que a expressão do fator tecidual e a densidade microvascular não estão associados com a presença de metástase cervical. Estudos adicionais são necessários para determinar novos marcadores moleculares capazes de melhorar a acurácia do prognóstico,

comparados aos fatores clínicos e histológicos de prognóstico do carcinoma epidermóide de boca já estabelecidos.

ABSTRACT

Presence of cervical metastases is the most important prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC). Recently, other clinical and molecular factors have been sought in order to improve prognostic capabilities in this disease. The aim the present study is to evaluate the impact of tissue factor (TF) expression and microvessel density (MVD) as predictors of cervical metastases in these neoplasms.

Immunohistochemistry techniques were used to assess the expression of TF and to quantify MVD (through expression of CD34) in 53 patients with OSCC who were treated surgically by the author. These findings, as well as other clinical and pathological variables, were correlated with the presence or absence of cervical metastases.

TF was expressed in all but three cases; it was highly expressed (more than 50% of tumor cells showing intense expression) in 13 patients (24.5%), but TF expression was not correlated with the presence of cervical metastases. MVD ranged from four to 47.8 vessels per high power field (200X) in selected hot spots, with an average of 18.47 vessels. Increased MVD (more than 20 vessels) was present in 21 patients (39.6%), but also did not correlate with the presence of positive cervical nodes. Clinical stage, neuronal infiltration and intravascular embolization were the most important predictors of cervical metastases.

This study focuses, for the first time, the expression of TF as a prognostic factor in OSCC. Its expression was not a significant predictor of cervical metastases in OSCC. Likewise, MVD was not correlated with cervical metastases. Further studies are needed to determine new molecular markers capable of improving prognostic accuracy of conventional clinical and pathologic prognostic factors in OSCC.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a população mundial tem apresentado um aumento contínuo da expectativa de vida o que acarreta uma maior incidência de pacientes com neoplasias malignas. À medida que a população envelhece aumenta o risco de um indivíduo desenvolver câncer, resultando em maior número e média de idade de indivíduos com a doença¹.

O paciente portador de câncer de boca, apesar da alta especialização do tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, apresenta sobrevida de 50% em cinco anos^{2,3}. Quando o diagnóstico de câncer é estabelecido, vários fatores prognósticos são observados como preditivos de cura e de sobrevida. Podem ser destacados fatores de prognóstico clínicos, histológicos e, mais recentemente, um terceiro grupo denominado de fatores de prognóstico biológicos ou moleculares. Até o presente momento, o fator de prognóstico mais importante no câncer de boca é a presença de metástases cervicais.

As metástases cervicais são identificadas pelo exame físico e por exames complementares, que falham em diagnosticar a doença em cerca de 20 a 35% dos pacientes clinicamente negativos^{2,3}. Este falso negativo é considerado elevado, o que justifica o tratamento preventivo do pescoço, cuja seleção é realizada fundamentalmente pelas características clínicas do tumor quanto ao seu tamanho e localização. Quanto ao tamanho, o tumor extenso, independente da localização, apresenta alta probabilidade de metástase cervical e deve ter o pescoço ipsilateral tratado. Quanto à localização, o tumor situado em locais específicos, como na língua, deve receber este tratamento independente de suas dimensões. As características histopatológicas, como grau de diferenciação celular

e espessura do tumor, também auxiliam nesta seleção, porém ainda apresentam falhas significativas. Sendo assim, o tratamento preventivo do pescoço clinicamente negativo é determinado por critérios limitados, resultando na necessidade de meios que selecionem melhor estes pacientes³.

Atualmente a biologia molecular do câncer está sendo intensamente pesquisada. Os marcadores moleculares de angiogênese têm sido investigados como possíveis indicadores do comportamento biológico de tumores. A angiogênese se caracteriza pela formação de novos vasos, sendo considerada necessária para o crescimento, invasão e metastatização de tumores sólidos. A neovascularização é estimulada por fatores denominados pró-angiogênicos dentre os quais destaca-se o fator tecidual⁴.

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína transmembrana cuja função primordial é o desencadeamento da coagulação sanguínea, mas que também está envolvida em processos celulares como a proliferação celular e a angiogênese⁵.

No presente estudo, é revisada a literatura sobre conceitos fundamentais do carcinoma epidermóide de boca. Adicionalmente são pesquisadas suas características clínicas, histológicas, a expressão do fator tecidual e a angiogênese, verificando possíveis correlações entre estes fatores, a presença de metástases ganglionares e a ocorrência de óbito.

2. OBJETIVOS

Geral

Verificar a correlação entre a expressão do fator tecidual e a densidade microvascular com a presença de metástases cervicais no carcinoma epidermóide de boca.

Específicos

Verificar a correlação entre as características clínicas e histológicas do tumor primário com a ocorrência de metástases cervicais.

Verificar a correlação entre a expressão do fator tecidual, densidade microvascular e a ocorrência de metástases cervicais com a sobrevida dos pacientes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia e fatores de risco

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer, do Ministério da Saúde, para o ano de 2006, foi de 13880 novos casos de câncer de boca em todo o país. A incidência no Rio Grande do Sul é de 14,89 casos para cada 100.000 homens e 3,93 para cada 100.000 mulheres⁶.

A sobrevida do câncer de boca é de 50% em cinco anos modificando conforme o estadiamento da doença. Quando a doença é local, a sobrevida é de 79%, na doença loco-regional é de 42% e para doença com metástases distantes de 19%^{7,8}. Infelizmente em 65% dos casos, a doença é identificada em fases avançadas, o que determina o óbito de três mil pessoas ao ano no país⁶.

Durante décadas, a incidência do câncer de boca apresentou uma predominância significativamente maior no sexo masculino, com uma relação de 10:1 entre homens e mulheres. Atualmente, esta relação se modificou e está em 4:1. Acredita-se que isto seja devido ao incremento do fumo e álcool entre as mulheres e, em menor grau, pelo envelhecimento da população feminina^{7,9}.

Em 1964, 42% dos americanos eram fumantes e atualmente este número é de 27%. O consumo do álcool também diminuiu, porém não nos mesmos níveis que o do fumo^{10,11,12}. Passados 40 anos, a incidência de câncer na boca e orofaringe não diminuiu na mesma proporção. Conclui-se, então, que outros fatores além de álcool e fumo estejam relacionados com a gênese do câncer nestas regiões^{10,13,14}. O risco de desenvolver câncer de boca é 5-9 vezes maior em fumantes que não fumantes e 19 vezes maior em fumantes pesados (80 cigarros /dia)¹⁵.

A prevenção e o tratamento do câncer de boca ocorrem pela compreensão dos mecanismos de causa e efeito, da modificação dos riscos associados, do reconhecimento e controle das lesões pré-cancerosas e do estabelecimento de um diagnóstico e tratamento precoce¹⁶.

Pacientes com câncer de boca apresentam um risco vinte vezes maior de desenvolver um segundo câncer na boca e também em outras regiões como hipofaringe, laringe, estômago e pulmão^{16,17}. O tipo histológico mais freqüente é o carcinoma epidermóide e embora sejam originários no epitélio de revestimento, os pacientes são freqüentemente diagnosticados com tumores avançados⁹. A prevenção exige uma compreensão dos fatores desencadeantes da doença e são necessárias estratégias de ação. A idade é um fator no qual não é possível interferir, já o fumo e o álcool devem ser abandonados. Aspectos nutricionais, substâncias que atuam sobre o epitélio, mecanismos de ação dos vírus sobre o epitélio e o estudo dos oncogenes são importantes nestes pacientes^{10,11}. Lesões pré-cancerosas como a leucoplasia e eritroplasia devem ser diagnosticadas precocemente e marcadores moleculares que permitam conhecer a futura evolução destas alterações são necessários. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são os pontos críticos para se reduzir a morbidade e a mortalidade da doença¹⁸⁻²¹.

3.2 Diagnóstico do Câncer de Boca

A forma efetiva de prevenção secundária do câncer de boca é a combinação de diagnóstico precoce e tratamento apropriado. O carcinoma epidermóide se manifesta como uma lesão de superfície que no estágio inicial pode ser confundida com uma lesão benigna. O tratamento clínico ou expectante deve fazer regredir uma lesão benigna no

período de 14 dias, caso contrário é necessária análise histológica da mesma. O diagnóstico definitivo é feito por meio de biópsia tecidual que poderá ser incisional ou excisional. A biópsia incisional deve remover uma amostra representativa da lesão, já a excisional consiste na completa remoção da lesão com margem de tecido normal ao redor e em profundidade. Sempre que houver lesões suspeitas num mesmo paciente elas devem ser biopsiadas, pois tumores sincrônicos podem ocorrer. Procedimentos adjuvantes como citologia esfoliativa e punção com agulha fina também contribuem para o diagnóstico^{16,17,20,22}.

O carcinoma de boca pode ainda manifestar-se clinicamente como lesão proliferativa superficial, ulceração, lesão de aspecto exofítico ou como lesão infiltrativa. A forma ulcerativa é a mais freqüente, geralmente acompanhada por borda irregular e pelo endurecimento das partes moles subjacentes. Por outro lado, as lesões exofíticas podem apresentar crescimento irregular em forma de couve-flor ou lesões proliferativas planas róseas. Em algumas situações, a lesão plana pode ser a manifestação de um carcinoma *in situ* ou superficialmente invasivo. Os carcinomas que produzem excessivamente queratina apresentam-se como lesões ceratóticas brancas, são de difícil diagnóstico histológico e devem ser biopsiados em profundidade. As lesões endofíticas têm caráter infiltrativo com área de endurecimento observada pela palpação do tumor. Sempre que a biópsia for negativa e as características clínicas forem contrárias, o médico deve repetir o procedimento^{23,24}.

Os sinais e sintomas podem ser divididos em precoces e tardios conforme a Tabela 1. Aspectos sociais, familiares, história médica, consumo de álcool, tabagismo, história familiar de câncer de cabeça e pescoço e a história clínica da doença devem ser investigados. No exame físico do paciente o médico deve realizar o exame otorrinolaringológico completo. A inspeção da mucosa oral e faríngea com adequada

iluminação, a palpação digital dos linfonodos cervicais, palpação bimanual da língua e palpação do assoalho da boca, proporcionam o diagnóstico clínico. A laringoscopia indireta é necessária para visualizar a região póstero-lateral da língua e a sua base permitindo avaliar a extensão do tumor para a faringe²⁵.

O câncer de boca apresenta ainda características variáveis de acordo com o local de apresentação. A língua é a região mais frequentemente acometida, sendo a borda lateral e o ventre lingual as áreas em que mais frequentemente incide o carcinoma, enquanto que o dorso e a linha média da língua são raramente acometidos. No estágio precoce o câncer é assintomático. Otalgia reflexa, dificuldade para falar, disfagia e perda de peso surgem tardiamente com o crescimento da lesão.

Quanto à localização o câncer de língua é o que apresenta o maior risco de metástases regionais^{26,27}.

Tabela 1 – Sinais e sintomas do câncer de boca

Precoces	Tardios
Lesão branca ou vermelha Ulceração Crescimento progressivo Modificação da superfície da lesão Mobilidade dentária sem causa definida Sangramento	Área Endurecida Parestesia da língua ou lábios Otalgia Trismo Disfagia Adenopatia cervical Dor persistente ou dor reflexa Alteração visual

O assoalho bucal é a segunda região mais acometida em frequência e juntamente com a língua, é a região que mais está em contato com os agentes carcinogênicos. É

comum os pacientes com carcinoma no assoalho bucal apresentarem história de consumo excessivo de álcool²⁸⁻³⁰.

O câncer de gengiva manifesta-se com sintomatologia dentária e a mobilidade de um dente deve ser investigada quanto à etiologia neoplásica. O carcinoma, quando envolve a gengiva, compromete de forma precoce o tecido ósseo principalmente em pacientes edentados. A lesão geralmente tem início na superfície superior e é mais rara na face bucal ou lingual^{20,25,31}.

O câncer da região jugal pode se manifestar por uma ulceração ou endurecimento da região e freqüentemente é precedido por leucoplasias locais. A lesão poderá infiltrar profundamente a musculatura e a pele da bochecha e o crescimento em direção posterior poderá comprometer a região retro-molar cursando com trismo e dor²⁶.

A região retro-molar, embora seja um local da boca, apresenta carcinomas com comportamento clínico semelhante aos tumores da orofaringe. Já a região do palato duro, raramente apresenta carcinoma do tipo epidermóide e não faz parte deste estudo.

3.3 Estadiamento

Para a discussão de alternativas de tratamento e comparação de resultados, os pacientes com tumores malignos são agrupados de acordo com o diagnóstico histológico, o local de origem e a extensão do tumor. O estadiamento descreve a extensão do tumor e é dependente de uma série de fatores, incluindo o tamanho da lesão com sua extensão local, a presença de linfonodos e a presença de metástases a distância³².

A classificação tumor-nódulos-metástases (TNM) é baseada em três aspectos clínicos: o T (Tumor) corresponde ao tamanho do tumor em centímetros; o N (Nódulos) corresponde à presença, número, tamanho e extensão das metástases para os linfonodos

regionais; e o M (Metástases) refere-se à presença ou à ausência de metástases à distância. O risco de metástases à distância é baixo para os tumores da boca, sendo maior nos tumores com maior extensão local e com metástases linfáticas³³. A classificação TNM pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação TNM para câncer de boca – AJCC

T – Tumor

T1- Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
 T2- Tumor entre 2 e 4 cm em sua maior dimensão
 T3- Tumor maior que 4 cm em sua maior dimensão
 T4- Tumor invadindo cortical óssea, musculatura extrínseca da língua em profundidade, invasão de seio maxilar e invasão de pele

N – Nódulo Linfático

N0 - Ausência de linfonodos metastáticos
 N1 - Metástase em um linfonodo ipsilateral menor que 3 cm.
 N2a - Metástase em um linfonodo ipsilateral entre 3 e 6 cm
 N2b - Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais nenhum maior que 6 cm.
 N2c - Metástases bilaterais ou contra-laterais, nenhuma maior que 6 cm.
 N3 - Metástase maior que 6 cm

M- Metástases distantes

M0 – Ausência de metástases à distância
 M1 – Presença de metástase à distância

Os parâmetros clínicos da classificação TNM são agrupados em estádios conforme a Tabela 3 e são importantes para definição de prognóstico da doença.

Tabela 3 - Estadiamento clínico do câncer de boca

Estádio clínico	Tumor	Nódulo	Metástase
Estadio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0 ou N1	M0
Estádio IV	T4	N0 ou N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

3.4 Progressão do Tumor

O crescimento do tumor depende de seu sítio de localização, de sua agressividade e de fatores do hospedeiro²⁵. O tumor de boca apresenta inicialmente crescimento local para posteriormente comprometer os linfonodos regionais (do pescoço), região mais frequente de metástases. O linfonodo, quando inicialmente comprometido, encontra-se móvel e, à medida que as células tumorais invadem a sua cápsula, começa a ficar fixo e endurecido. No pescoço, o sítio primário de drenagem linfática da boca corresponde à região submandibular e jugulo-carotídea alta^{26,33}. Didaticamente, as cadeias linfáticas cervicais são divididas em níveis de drenagem conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Níveis de drenagem linfática do pescoço

Níveis	Região anatômica – grupos de linfonodos
I	Grupo submentoniano e submandibular
II	Grupo jugular superior
III	Grupo jugular médio
IV	Grupo jugular inferior
V	Grupo do triângulo posterior

Os tumores do lábio e do assoalho bucal apresentam drenagem preferencial para o nível I, enquanto os demais sítios da boca drenam para o nível II³⁴.

Cerca de 21% dos pacientes apresentam linfonodo cervical metastático na primeira consulta^{2,27,34}. A disseminação hematogênica de células tumorais pode ocorrer, embora não seja freqüente, o risco aumenta em pacientes com doença local e regional avançada, sendo pulmão, fígado e osso os locais mais freqüentes de metástases^{26,33,35}.

Aproximadamente 30% dos pacientes são classificados em T1 e T2 na primeira consulta. Estes pacientes são tratados com intenções curativas por meio de cirurgia, radioterapia ou ambos. Pacientes T3, T4 e com metástases cervicais, independentes do T, são também tratados com intenções curativas. Neste grupo é maior o risco de recidiva loco-regional que geralmente ocorre nos primeiros dois anos de tratamento.

O risco do paciente com câncer de boca apresentar um segundo tumor primário na via aero-digestiva é de 16 a 36%^{16,17,36}. Quando dois tumores são diagnosticados simultaneamente são denominados de sincrônicos, e quando diagnosticados em períodos diferentes de metacrônicos. Existe uma tendência dos pacientes desenvolverem um segundo carcinoma na via aero-digestiva pela prolongada e difusa exposição a carcinogênicos, especialmente o fumo e o álcool³⁶.

3.5 Exames Complementares

Os exames de imagem são a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM), as radiografias convencionais e a ecografia com ou sem punção para exame citopatológico. A TC e a RM avaliam a extensão da lesão loco-regionalmente e a extensão em profundidade, bem como a doença metastática^{37,38}. A TC detecta mais precocemente a invasão óssea e os linfonodos metastáticos, já a RM é melhor para avaliar a extensão da doença localmente e também proporciona uma visão tridimensional³⁹.

Para avaliar a extensão do envolvimento ósseo de um tumor junto à mandíbula são necessários estudos radiológicos apropriados. A ausência de achados radiográficos não descarta a invasão óssea, porém a destruição óssea observada em uma radiografia significa invasão do tumor. Cintilografias ósseas costumam ser positivas antes do aparecimento radiográfico, porém raramente fornecem informações exatas. O risco de falso-positivo também ocorre, pois lesões inflamatórias podem simular neoplasias. A radiografia panorâmica de mandíbula oferece uma visão da relação do osso com a parte dentária e sua relação com a invasão do tumor^{40,41}.

A TC e a RM são incapazes de avaliar o crescimento na superfície de um tumor. A RM oferece maior contraste de imagem e geralmente demonstra melhor resolução que a TC na avaliação de partes moles. A tomografia somente evidencia lesões maiores que dois centímetros de diâmetro. Para tumores T1 e T2 o estadiamento clínico tem uma acurácia de 90% enquanto a TC é de 53%. Já em tumores T3 e T4 o estadiamento clínico é de 34% enquanto a TC é de 91%^{32,40,41}.

A TC pode ser empregada para avaliar o comprometimento ósseo, porém raras vezes modifica a suspeita clínica de doença óssea. A tomografia tridimensional oferece aspectos interessantes especialmente para o estudo da reconstrução do arco mandibular. Já a RM é interessante para o estudo das partes moles, como o espaço para-faríngeo e os tumores endofíticos da língua^{26,40}.

A ecografia não oferece contribuição para o estudo do tumor primário³⁸. O uso de exames de imagem para avaliar adenopatia cervical será discutido posteriormente.

3.6 Fatores de prognóstico

3.6.1 Fatores clínicos de prognóstico

O câncer de boca apresenta aspectos clínicos em sua localização que são até o momento utilizados pelos cirurgiões de cabeça e pescoço para definir a melhor forma de tratamento e também para predizer o grau de agressividade que o tumor exerce sobre cada paciente. Características como o tamanho e a espessura do tumor, sua localização e apresentação na boca e a presença de metástases regionais ou à distância, permitem ao médico definir o melhor tratamento, bem como indicam um prognóstico de sobrevida. São denominados como fatores de prognóstico clínicos e devem ser sempre considerados pelo médico. O fator de prognóstico mais valorizado é a presença de metástase ganglionar⁴⁰⁻⁴³.

Os mais importantes são os seguintes:

3.6.1.1 Localização do tumor na boca

Conforme a localização do tumor, o carcinoma pode apresentar diferentes evoluções clínicas. Os sítios mais freqüentes de localização de um carcinoma epidermóide de boca são, por ordem: a língua, o assoalho bucal, o lábio, a gengiva retro-molar, a bochecha e o palato duro. Quanto ao local, tumores com igual estadiamento apresentam prognósticos diferentes. O câncer de bochecha apresenta melhor sobrevida que os carcinomas situados na língua, assoalho bucal e gengiva²⁶. Num período de cinco anos, pacientes com carcinoma de bochecha apresentam sobrevida média de 70%, enquanto que os que possuem tumores no assoalho da boca têm 55% e na língua entre 41 a 44%^{2,27}. A língua é o sítio de localização mais freqüente e representa o local de maior agressividade do carcinoma epidermóide de boca. Acredita-se que a língua, por ser um órgão muscular e com grande mobilidade, tenha a capacidade de desenvolver um maior número de metástases. O movimento intenso da língua faria uma espécie de bombeamento de células carcinomatosas para o interior dos coletores linfáticos, justificando assim o elevado índice de linfonodos comprometidos em uma fase inicial da doença^{25,26}.

3.6.1.2 Tamanho do Tumor – Classificação T

As dimensões da lesão em seu sítio primário também exercem importância no prognóstico. Os tumores T1 e T2 apresentam maior probabilidade de cura que os T3 e T4. O controle local do tumor primário guarda relação com o tamanho do tumor, pois lesões extensas estão associadas a maior risco de recidiva^{26,27}.

A incidência de metástases cervicais aumenta conforme o tamanho do tumor. Os tumores T1 e T2 apresentam uma chance de 23% de desenvolver metástases cervicais, enquanto que em relação aos tumores T3 e T4 a chance é de 59%³⁵.

3.6.1.3 Espessura do tumor

A avaliação do tumor em sua extensão profunda mostrou ser um ótimo fator de prognóstico, especialmente em tumores do assoalho da boca e da língua. Estudos têm demonstrado que a espessura do tumor é melhor fator preditivo de metástase do que o tamanho do tumor, avaliado pelo T da classificação TNM^{45,46}. Tumores com espessura acima de 1,5 milímetros apresentam maior probabilidade de desenvolver metástases cervicais, provavelmente pela presença de vasos linfáticos mais calibrosos. Os tumores primários com menos de 1,5 milímetros de espessura apresentam metástases em 2% dos casos, os que têm entre 1,6 e 3,5 milímetros, desenvolvem metástase em 33% dos casos e os que têm acima de 6 milímetros de espessura, apresentam metástases cervicais em 60% dos casos⁴⁴. Kurokawa e colaboradores⁴⁷ definem que tumores acima de quatro milímetros estariam associados a um alto risco de metástases; Yuen e colaboradores⁴⁸ concluem que tumores entre três e nove milímetros teriam 50% de chance de metástase enquanto que Hosal e colaboradores⁴⁹ definem risco para tumores acima de nove milímetros. A dificuldade para dimensionar o grau de infiltração é alvo de crítica, visto que a mensuração somente poderá ser definida após a ressecção do tumor, além disso os trabalhos não conseguem definir o ponto de corte de qual espessura deveria ser utilizada para definir risco de metástase⁵⁰. Assim, a análise da espessura não contribui para definição do tipo de tratamento, mas é útil como fator prognóstico após a exereses do tumor⁴².

Outro aspecto se refere à espessura do tumor e ao sítio de localização. Woolgar⁴⁵ relata que no assoalho da boca o potencial de metástases aumenta em espessuras acima de seis milímetros, já na língua, define o tamanho de 10 milímetros. Outro cuidado na análise dos estudos reporta quanto à forma de mensuração que difere no tamanho em 33% quando comparada à congelação e à parafina.

3.6.1.4 Aspecto da lesão no sítio primário

Como descrito anteriormente, os tumores de boca poderão se apresentar de distintas formas: vegetantes, infiltrativos e ulcerados. Quanto maior o grau de infiltração, mais agressivo é o tumor. Os tumores ulcerados freqüentemente apresentam infiltrado linfocitário nas suas bordas, caracterizando um processo inflamatório de defesa do organismo contra o câncer. Já os tumores vegetantes tendem a ser mais diferenciados e são de comportamento menos agressivo quando comparados às outras duas formas de apresentação^{20,25}.

Woolgar⁴⁵ pesquisou os aspectos histológicos e seu potencial metastático e demonstrou que tumores ulcerados desenvolveram mais metástases que os exofíticos.

3.6.1.5 Metástases Linfáticas – Classificação N

A presença de metástase cervical é o fator de prognóstico mais importante no tratamento do carcinoma epidermóide de boca⁴⁰⁻⁴³.

A- Conceito de metástase

Um linfonodo pode estar comprometido por células de carcinoma na forma de células isoladas, de micrometástases e de macrometástases⁵¹.

A células neoplásicas que acometem um linfonodo isoladamente não caracterizam linfonodo metastático. Elas ocorrem na forma de nichos celulares e não pode ser estabelecido o momento no qual estas células irão se implantar no linfonodo. A simples presença de células carcinomatosas no lúmen sinusal não evidencia implantação do tumor no linfonodo⁵².

A micrometástase se caracteriza pelo comprometimento de um linfonodo cujo tamanho da metástase é de dois milímetros e independe da dimensão do linfonodo⁵³. O linfonodo comprometido com uma micrometástase é invariavelmente classificado como N0 visto que os métodos clínicos e de imagem são incapazes de detectar este tipo de metástase^{54,55}. Na realidade, estes pacientes são positivos (N+) e para estas situações são definidos como portadores de metástases ocultas. A localização da micrometástase ocorre no seio subcapsular do linfonodo e não em seu centro⁵⁵. Na histopatologia, a detecção de uma micrometástase de forma convencional pela técnica de hematoxilina-eosina não é capaz de diagnosticar todos os linfonodos comprometidos. Geralmente são feitas uma ou duas lâminas de cada linfonodo e os cortes podem não contemplar a presença de uma metástase. O estudo histopatológico de forma mais abrangente aumenta a sensibilidade da identificação das micrometástases, porém as múltiplas secções necessárias tornam o método trabalhoso e com custos elevados⁵⁶. Atualmente, métodos de imunoistoquímica também proporcionam melhor identificação de linfonodos com micrometástases. O índice de micrometástases não detectáveis pela forma convencional, mas identificados com métodos histológicos mais detalhados e pela imunoistoquímica varia, de 5 a 8%⁵⁷. Este

acréscimo na identificação de linfonodos positivos não modifica a estratégia de tratamento e o prognóstico dos pacientes^{53,54,57}.

As macrometástases são aquelas nas quais as células carcinomatosas comprometem todo o linfonodo. Na macrometástase, o linfonodo poderá ou não estar com a sua cápsula invadida e clinicamente poderá ou não ser diagnosticado, portanto pode ser negativo (N0 ou N-) ou positivo (N+)⁵².

B- Diagnóstico de Metástase

O paciente, ao receber o diagnóstico de um carcinoma epidermóide de boca deverá ser investigado quanto à presença de metástase cervical. São comuns as metástases para os níveis I, II e III, geralmente ipsilaterais ao tumor³⁴. Tumores de língua e de assoalho de boca que se situam próximos à linha média podem desenvolver metástases contra-laterais. A palpação do pescoço é o método inicial de investigação. A precisão da palpação dependerá do local onde se encontra o linfonodo, do tipo de pescoço, da consistência do linfonodo e de seu tamanho. O limite de palpação é de 0,5 centímetro na região submandibular e de um a dois centímetros nos outros níveis do pescoço, que são naturalmente áreas mais profundas⁵⁸. Um linfonodo palpado na região cervical será considerado positivo e deverá ser confirmado com estudos anátomo-patológicos, que poderão apresentar 20% de falsos positivos. Em contra-partida, linfonodos positivos podem também não ser palpados em 20% a 35% das situações^{2,34,39,58}. A suspeita de um linfonodo positivo também poderá ser investigada por meio de uma punção biópsia, porém este também é um método que apresenta falsos negativos, além de ser invasivo. Estudos mostram que a punção aumenta a sensibilidade e especificidade do método^{59,60}.

Quanto aos métodos de imagem, destacam-se a ecografia cervical, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Os exames de imagem utilizam especialmente o tamanho do linfonodo que, quando estiver acima de 10 milímetros, têm valor preditivo de 44%. Porém, existem metástases em linfonodos menores de cinco milímetros, o que torna o anátomo-patológico o exame padrão-ouro para o diagnóstico. A ecografia é um exame de baixo custo e não invasivo, que oferece vantagens na identificação de um linfonodo positivo quando comparado com a palpação. Van den Brekel⁶⁰ relata uma acurácia de 70% para diagnosticar um linfonodo metastático, sendo a sensibilidade de 60% e a especificidade de 77%. O critério ecográfico para definir um linfonodo metastático é pelo seu comprimento axial ou pela identificação de três ou mais linfonodos limítrofes ecograficamente. A ecografia permite dimensionar um linfonodo, identificar sua relação com estruturas adjacentes e analisar sua consistência, porém, estes aspectos não permitem definir se um linfonodo é metastático. Um linfonodo aumentado não poderá ser diferenciado pela ecografia como hiperplásico ou metastático⁵⁹. A ecografia é mais sensível que a palpação na localização de linfonodos. Nas regiões profundas ou em alguns tipos de pescoço difíceis de palpar, como por exemplo, os pacientes obesos, a palpação é possível para linfonodos com um diâmetro acima de dois centímetros e nestas situações a ecografia proporciona melhor acurácia^{37,38,60}. Linfonodos com necrose são característicos de comprometimento pelo tumor, porém geralmente apresentam dimensão maior que dois centímetros, já as adenopatias metastáticas menores que dois centímetros não apresentam características específicas na análise ecográfica.

O exame ecográfico poderá ser utilizado como auxílio nas punções de linfonodos. Nos linfonodos com mais de cinco milímetros, a ecografia com punção identifica 96% dos linfonodos. A punção poderá ser realizada em linfonodos com diâmetro maior que cinco milímetros, porém a dificuldade está em reproduzir

tecnicamente a punção e a interpretação cito-patológica de linfonodos de pequenas dimensões^{50,59}.

A tomografia computadorizada é o método de imagem que melhor contribui para o diagnóstico de linfonodos metastáticos. Linfonodos com diâmetro menor que dois centímetros, nos quais a tomografia identifica área de necrose, são sugestivos de metástases, porém áreas hipovascularizadas e a metaplasia de tecido adiposo podem ser equivocadamente interpretadas como áreas de necrose. A tomografia falha na detecção de metástases em 15% dos casos⁵³. A região submandibular e subdigástrica podem apresentar artefatos oriundos de restaurações odontológicas e dificultar a interpretação do exame⁶⁰.

A ressonância magnética também pode ser empregada para identificar linfonodo metastático. Face ao prolongado tempo de exposição para realizar o exame, os artefatos oriundos dos movimentos do paciente são mais frequentes. Esta técnica também é utilizada para demonstrar a relação do linfonodo com estruturas vizinhas, especialmente ao feixe vâsculo-nervoso do pescoço. O exame por RM pode ser estendido à região cervical para o estudo do tumor primário, como nos casos de tumores infiltrativos da língua. A RM apresenta falsos resultados em torno de 16%⁶¹. A RM e a TC apresentam acurácia semelhante para detectar ou excluir linfonodos metastáticos e são mais sensíveis do que a palpação cervical⁶⁰.

O diagnóstico de metástase linfonodal pela palpação cervical e por exames de imagem não permite a identificação de todos os pacientes com doença cervical, ocorrendo considerável número de falsos positivos e falsos negativos⁵⁰. Muitos pacientes, nestas situações, recebem tratamento para o pescoço sem necessidade, o que caracteriza um tratamento excessivo. A necessidade de um método que permita diferenciar um paciente com doença metastática cervical positiva ou negativa ainda é uma carência a ser superada.

C- Características das metástases linfáticas

Isoladamente, a presença de metástase cervical reduz consideravelmente o prognóstico. A presença de metástase reduz em 50% a sobrevida dos pacientes. Características como o tamanho da metástase, o nível do pescoço comprometido, a presença de invasão da cápsula, a invasão de feixe vículo-nervoso e o número de linfonodos comprometidos, são importantes para o prognóstico do paciente⁵³. A invasão da cápsula é a característica mais importante, sendo determinante para recorrência do tumor no pescoço e para a diminuição da sobrevida. A invasão da cápsula ocorre geralmente em linfonodos maiores que dois centímetros, embora possa ocorrer nos linfonodos menores que 0,5 centímetros⁴⁹. A invasão da cápsula de um linfonodo com dois milímetros de diâmetro também foi relatada³⁹.

O prognóstico também resulta do nível da metástase no pescoço. A sobrevida em cinco anos é de 45% para nível I e cai para 18% quando atingir o nível IV⁴⁰. O número de linfonodos comprometidos também modifica significativamente o prognóstico.

3.6.2 Fatores histológicos de prognóstico

Os aspectos histológicos dos carcinomas epidermóides de boca também auxiliam no prognóstico da doença. A classificação de Broders⁶² divide os carcinomas em quatro grupos, de acordo com a proporção de células anaplásicas: bem diferenciado (0-25%), moderadamente diferenciado (25-50%), pouco diferenciado (50-75%) e indiferenciado (75-100%). Um tumor com maior grau de diferenciação celular apresenta menor

agressividade e menor índice de metástases, já tumores mais indiferenciados são de crescimento mais rápido e com maior potencial metastático³⁵.

Thomson⁶³ simplificou a classificação de Broders em três estágios denominados de: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. Esta classificação é usualmente utilizada nos dias de hoje.

Hibbert e colaboradores⁴¹ encontraram em seu estudo que carcinomas bem diferenciados desenvolvem menor número de metástases do que aqueles com grau de diferenciação moderado e pouco diferenciado, porém sem diferenças estatísticas significativas.

Henk e Langdon²⁶ relataram 40% de sobrevida em cinco anos para pacientes com carcinomas bem diferenciados enquanto que nos moderadamente este índice caiu para 26% e para 12% nos pouco diferenciados.

Carter³⁴ fez uma crítica à valorização da classificação de Broders, face aos variados graus de diferenciação encontrados conforme o número de cortes histológicos realizados no tumor primário.

Woolgar⁴⁵ estudou 45 pacientes com câncer de língua e assoalho de boca e relatou que o grau de diferenciação celular não foi importante e observou que a invasão vascular e a de bainha nervosa são freqüentemente simultâneas. Os pacientes com metástases no pescoço (N+) apresentaram 78% de invasão vascular e 70% de invasão de bainha nervosa, já os pacientes sem metástases no pescoço (N-) apresentaram 11% de invasão vascular e 30% de invasão de bainha nervosa.

Em ressecções mais amplas, a infiltração nervosa ocorre em 30% dos casos. Sua suspeita no pré-operatório pode ocorrer quando o paciente relata dor ou parestesias. As células neoplásicas ao alcançarem a bainha nervosa têm a possibilidade de crescer à

distância. O comprometimento de nervo e a presença de embolizações vasculares são associados à recorrência loco-regional e diminuição da sobrevida⁶⁴.

Crissman⁶⁵ observou que, de acordo com todos os parâmetros histológicos, somente o número de mitoses e a espessura do tumor estão correlacionados com prognóstico.

Outro aspecto histológico é o grau de invasão celular (ICG) ou classificação de Bryne. É um sistema multifatorial e semiquantitativo baseado nas seguintes características morfológicas: grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses, forma de invasão e infiltração linfoplasmática. Para cada aspecto é designado um índice de 1 a 4 podendo totalizar um escore de 5 a 20. Pacientes com o valor de 5 e 8 apresentam bom prognóstico; de 9 a 12, moderado; de 13 a 15, severo e de 16 a 20, péssimo prognóstico. Este sistema tem a vantagem de possibilitar sua utilização em biópsias^{66,67}.

Russolo e colaboradores³ descrevem resultados altamente significativos na pesquisa de metástases em pescoço clinicamente N0, onde 90% dos pacientes falsos negativos apresentavam escore acima de 13 e 74% dos verdadeiramente negativos abaixo deste valor.

Woolgar⁶⁸ usou o escore do grau de invasão celular mais a invasão vascular e diagnosticou corretamente 87% dos pacientes.

Hogmo introduziu um sistema de classificação do grau de malignidade onde avalia características celulares e características do tumor, porém embora seja um método bastante divulgado exige grande demanda de tempo⁶⁷.

São descritas diferentes formas de avaliar aspectos histológicos para identificar a presença de metástase cervical, porém não são freqüentemente utilizados por patologistas e cirurgiões e nos estudos só demonstram ser efetivos na análise univariada⁵⁰.

3.6.3 Fatores moleculares de prognóstico - Angiogênese

São conhecidos 35000 gens, sendo que até o momento 588 produzem proteínas relacionadas com o câncer⁶⁹. O desenvolvimento do câncer é o resultado de acúmulos de erros genéticos em um mesmo tecido onde está implicada a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Estudos sugerem que ocorra de 6-10 alterações moleculares para o desenvolvimento do câncer⁷⁰. O processo de metástase é o resultado da modificação nas propriedades das células neoplásicas e sua interação com outras células. Para desenvolver uma metástase, a célula prolifera, perde contato com células vizinhas, migra pela matriz intersticial, invade vasos sanguíneos e linfáticos e se multiplica em linfonodos e órgãos distantes. As células metastáticas apresentam características para exercer esta ação que são determinadas por modificações de seus genes. O conhecimento destas propriedades moleculares da célula neoplásica procura identificar o potencial de gerar metástase regional⁷.

Durante os últimos 15 anos, diversos marcadores moleculares têm sido investigados como possíveis indicadores do comportamento biológico de tumores. Existem marcadores celulares e tissulares que podem proporcionar informações adicionais aos aspectos clínicos e histológicos do tumor, e podem ser classificados em:

- a. Marcadores de crescimento tumoral
- b. Marcadores de resposta antitumoral
- c. Marcadores de queratinização anômala
- d- Marcadores de invasão tumoral e potencial de metástase
- e- Marcadores celulares de superfície
- f- Marcadores intracelulares

g- Marcadores de angiogênese

John Hunter em 1787 cunhou o termo angiogênese para descrever o crescimento de novos vasos⁴. Durante o desenvolvimento embrionário, os vasos são formados a partir de tecido mesenquimal em processo chamado de vasculogênese⁷¹. O processo de formação de novos ramos vasculares, a partir desses vasos já formados, é chamado de angiogênese. Tal processo é verificado fisiologicamente no desenvolvimento fetal, na hiperplasia endometrial durante o ciclo menstrual e na cicatrização de feridas⁵⁰. Além dessas situações, a angiogênese está envolvida em uma série de condições patológicas nas quais os processos de inflamação e de isquemia estão presentes.⁵⁷ O conceito de que o crescimento tumoral e o processo de formação de metástases sejam dependentes do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi consolidado por Folkman^{72,73,74}, no início da década de 70. Inúmeros estudos a partir dessa data têm confirmado as hipóteses de Folkman e demonstrado a importância do processo de angiogênese no desenvolvimento dos tumores. Gullino em 1976, apud Carmeliet, mostrou que células pré cancerosas adquirem capacidade angiogênica para desenvolverem um câncer⁷⁵.

A capacidade de difusão e oxigenação das células humanas é de 100 a 200 micras, o que impossibilitaria o crescimento de uma neoplasia⁷⁵. A angiogênese é o crescimento de novos capilares a partir de células endoteliais do hospedeiro. Isto permite o crescimento do tumor além de 2-3 milímetros, pela efusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, ao invés de simples difusão no espaço extracelular que manteria o tumor restrito, e com uma pequena população celular^{76,77}. A angiogênese depende de um balanço entre fatores que promovem o crescimento e de fatores inibidores. Nos tecidos normais os vasos estão quiescentes e as células secretam baixos níveis de

indutores e altos níveis de inibidores da angiogênese⁷⁸. As células do tumor secretam fatores angiogênicos para atrair células endoteliais que produzem fatores de crescimento para o tumor, já as células normais secretam baixos níveis de indutores e altos níveis de inibidores de neovascularização. A célula quando progride para malignização modifica este equilíbrio dos fatores angiogênicos⁷⁸. A angiogênese se inicia pela ativação das células endoteliais de vasos normais que secretam enzimas degradando a membrana basal. Proteinases e ativadores do plasminogênio são secretados por células do tumor e dissolvem a matrix extracelular. As células endoteliais ativadas proliferam, migram e desenvolvem novos capilares, sintetizam nova membrana basal e maturam os vasos com a formação de lúmen⁸⁰. Os vasos se formam por intussuscepção a partir de um vaso e não há uma homogeneidade no endotélio dos vasos. Os vasos do tumor são estruturalmente e funcionalmente diferentes com uma vascularização altamente desorganizada, são vasos tortuosos, dilatados, formando braços e *shunts*.

A permeabilidade vascular e a angiogênese dependem do tipo do tumor e do órgão acometido, visto que cada órgão tem o estroma diferente do outro, com fatores pró e anti angiogênicos diferentes⁸⁰.

Existem cerca de 40 indutores e inibidores endógenos da angiogênese^{80,81} sendo que os principais estão listados na tabela 5. O mais potente e específico fator angiogênico conhecido é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é secretado por quase todos os tumores sólidos⁸². Descoberto em 1983, foi descrito como um fator de permeabilidade vascular, e em 1989 foi definido como fator mitogênico da célula endotelial⁴. As células endoteliais apresentam dois receptores de VEGF denominados VEGFR1 e VEGFR2, enquanto os linfáticos apresentam o VEGFR3⁴. Dentre os fatores que inibem a angiogênese, o mais importante parece ser a trombospondina-1⁸¹. A comprovação da existência de agentes antiangiogênicos, que promovem a inibição do

crescimento tumoral, revela a importância da identificação dessas substâncias e as novas possibilidades criadas para o tratamento do câncer⁸³. O tumor primário parece produzir fatores que inibem a angiogênese da metástase. Isto é observado quando após a retirada do tumor primário as metástases que estavam dormentes começam a se desenvolver^{84,85}. Um dos fatores antiangiogênicos conhecidos é a angiostatina^{74,86,87}. Evidências experimentais demonstram que a angiogênese também contribui com o processo metastático, pois à medida que há expansão da vascularização, maior é a superfície para o escape de células tumorais na circulação, o que também pode ser facilitado pela imaturidade dos vasos formados⁸⁸. O papel da angiogênese na progressão do tumor primário e sua associação com metástases hematogênicas e sobrevida, tem sido extensamente estudado principalmente em neoplasias da mama, pulmão, trato gastrointestinal e genitourinário, demonstrando associação estatisticamente significativa entre a intensa neovascularização e pior prognóstico⁸⁸⁻⁹¹.

Tabela 5 – Substâncias endógenas que apresentam efeito angiogênico

Fatores pro-angiogênicos	Fatores antiangiogênicos
Fatores de crescimento de fibroblastos Fator de crescimento do endotélio vascular Fator de crescimento derivado de plaquetas TGF- α , TGF- β Prostaglandinas E-1 e E-2 Interleucina-8 Cicloxigenase-2 Tissue Factor Óxido Nítrico Angiogenina	Interferon α e β Interleucina-12 Trombospondina-1 e 2 Fatores derivados de cartilagem Endostatina Angiostatina Vasostatina Angiopoetina 2 Inibidor de crescimento do endotélio vascular

3.6.3.1 Densidade microvascular e câncer

A imunistoquímica possibilita identificar e quantificar a microcirculação do tumor o que não é permitido com as técnicas convencionais de microscopia. A densidade

microvascular (DMV) é o método mais utilizado para mensurar a angiogênese. As pesquisas que estudam a angiogênese, além de seguir um delineamento uniforme dos estudos, necessitam seguir critérios padronizados para a identificação e quantificação microvascular. Inicialmente foram propostos por Weidner e colaboradores⁸⁸ e, posteriormente, uniformizados em dois Consensos Internacionais de metodologia e critérios de avaliação da angiogênese em tumores sólidos publicados em 1996 e 2002^{92,93}. Vários estudos demonstram que a DMV se correlaciona com o crescimento do tumor e ocorrência de metástases a distância⁹². Para a marcação dos vasos na imunoistoquímica são utilizados anticorpos, sendo o anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 e anti-FVIII os mais utilizados⁹³. O anti-CD31 foi inicialmente amplamente utilizado, entretanto atualmente a preferência é pelo anti-CD34 pois o anti-CD31 apresenta reação cruzada com células plasmáticas que são comuns em áreas inflamatórias do tumor ocasionando falsos positivos^{87,94,95}. O anti-FVIII tem a capacidade de identificar vasos maduros e imaturos⁹⁶. O anti-CD105 parece ser um marcador promissor, porém poucos estudos o utilizam⁹³.

Wiedner e colaboradores⁸⁸, estudaram 49 pacientes com carcinoma de mama e foram os primeiros pesquisadores a demonstrar associação entre a contagem de microvasos e o potencial de desenvolver doença metastática. Na pesquisa os vasos corados foram contados nas áreas de maior concentração vascular, denominados *hot spots*, pois devido a heterogeneidade intratumoral a quantificação microvascular total implicaria na avaliação de extensas áreas do tumor. Conforme critérios propostos, a seleção de áreas representativas na secção histológica inicia-se por microscopia óptica, em pequeno aumento, à procura de áreas com intensa neovascularização, ou *hot spots*, que se localizam principalmente na margem tumoral invasiva.^{88,90,97} A contagem microvascular é realizada nas áreas hipervasculares, pois estas se originam de clones celulares tumorais com o mais alto potencial angiogênico e conseqüentemente, com maior probabilidade de

acesso à circulação sistêmica e de metastatização⁹³. Uma vez que tais áreas são identificadas, a quantificação é realizada em grande aumento, sendo o resultado expresso pela média entre as áreas hipervasculares^{90,97}. Recentemente, incrementos técnicos com a análise digital de imagem tem sido introduzidos. A análise digital representa um método mais objetivo de quantificação microvascular e permite a redução da variação interobservador encontrada na contagem manual analógica convencional⁹⁸.

Seguiram-se pesquisas avaliando a densidade microvascular e sua correlação com o prognóstico de outros tumores como o carcinoma de pulmão,⁸⁹ de próstata⁹⁰ e melanoma⁹⁹.

As publicações que relacionam a densidade microvascular (DMV) e neoplasias de diferentes áreas mostram que o significado clínico da DMV apresenta ampla variação quanto a sua importância prognóstica. A maioria dos estudos incidem nas neoplasias gastro-intestinais e mostram que a neovascularização é fator de prognóstico importante, porém alguns resultados negativos colocam dúvidas a este respeito.

No câncer de esôfago três estudos japoneses demonstram que a DMV é fator adverso para o prognóstico¹⁰⁰⁻¹⁰² sendo que dois deles consideram fator de prognóstico independente quando comparado a outros parâmetros convencionais. Contrários a estes estudos, Torres e colaboradores avaliando 45 pacientes com adenocarcinoma de Barret e 22 pacientes com carcinoma epidermóide concluem que a DMV não se corelaciona com a sobrevida dos pacientes, entretanto observaram que nos tumores extensos havia grande densidade de vasos¹⁰³. Chou e colaboradores¹⁰⁴ em 51 pacientes com câncer de esôfago demonstraram que a alta densidade vascular é fator independente de prognóstico para a presença de metástase linfonodal com pior sobrevida para estes pacientes.

No câncer gástrico seis estudos de quatro grupos de pesquisadores japoneses consistentemente demonstram significativa influência da DMV no prognóstico dos

pacientes^{91,105-109}. Outros dois trabalhos afirmam que a DMV seria preditivo de metástase linfática no câncer gástrico precoce¹¹⁰⁻¹¹².

O valor prognóstico da DMV no câncer colo-retal tem sido extensamente estudado. Frank e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a alta densidade vascular está associada a mau prognóstico em pacientes submetidos a ressecção de tumores N negativos¹¹³. Um outro estudo, com análise multivariada, reporta que a alta densidade vascular é preditivo de recorrência em pacientes submetidos a cirurgia também N negativos¹¹⁴. Ohe e colaboradores avaliando a densidade vascular na profundidade do tumor cólo-retal concluem que a alta densidade é fator preditivo independente para a formação de metástase linfonodal¹¹⁵. Vários outros trabalhos demonstram correlação entre a alta densidade vascular e mau prognóstico¹¹⁶⁻¹²⁰. Contrário a estes autores, dois estudos não encontraram associação entre a DMV e valor prognóstico em pacientes com câncer cólo-retal N-^{121,122}.

Weidner e colaboradores⁸⁸ estudando 49 pacientes com câncer de mama invasor foram os pioneiros a demonstrar que a contagem de microvasos foi maior nos pacientes que desenvolveram doença metastática, sugerindo que a DMV seria fator preditivo independente para o desenvolvimento de metástases. O número de vasos por campo (magnificação de 200 vezes) foi de 45 para pacientes sem doença metastática e de 101 para os pacientes com metástase.

Até 2007 foram publicados 16 trabalhos de densidade microvascular em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e poucos correlacionando a DMV com a metástase. Os estudos mostram que a DMV representa um fator de prognóstico independente onde a atividade angiogênica teria impacto negativo na evolução destes pacientes. Gasparini e colaboradores¹²³ relataram um número maior de vasos que Gallo e colaboradores¹²⁴, sendo mais elevado em doentes com metástases, já alguns estudos não

fazem diferença entre pacientes com ou sem metástases. A média de número de vasos é diferente entre os trabalhos publicados sendo impossível estabelecer um ponto de corte entre tumores de baixa e alta expressão para metástases, até o presente momento⁹⁴. Shpitzer e colaboradores pesquisaram 20 pacientes com carcinoma de boca T1 sendo 10 metastáticos e encontraram resultado significativo quanto a maior DMV em pacientes metastáticos. Também afirmaram que a DMV é heterogenea e preconizam que os *hot spots* devem ser escolhidos na área das extremidades do tumor¹²⁵. Williams e colaboradores¹²⁶ demonstraram o valor prognóstico da DMV em pacientes com carcinoma epidermóide de boca T1-T3N0. Ascani e colaboradores em 64 pacientes com câncer de boca encontraram correlação significativa entre a DMV e o grau de diferenciação do tumor e a presença de metástase linfática cervical⁸. Shintani e colaboradores¹²⁷ e Penfold e colaboradores¹²⁸ também encontraram correlação entre a DMV e a metástase cervical e mau prognóstico em câncer de boca. Kyzas e colaboradores¹²⁹ em 69 pacientes com câncer de cabeça e pescoço utilizando o CD31 e o CD34 não observaram diferenças entre estes dois marcadores e concluíram que a alta densidade microvascular está associada aos estadiamentos T3 e T4, presença de linfonodo e a menor sobrevida dos pacientes. Na análise multivariada somente o linfonodo foi considerado fator independente de prognóstico. Em outro estudo Kyzas e colaboradores¹³⁰ utilizando o CD105 em 108 pacientes com câncer de cabeça e pescoço demonstraram que a DMV está associada a presença de metástase cervical sendo considerado fator de prognóstico independente para sobrevida quando comparado com o T e a presença de metástase. Martone e colaboradores¹³¹ também usando o CD105 em 127 pacientes com câncer de cabeça e pescoço encontraram associação da DMV com a presença de metástase cervical e sobrevida dos pacientes. Murray e colaboradores em 51 pacientes com câncer de laringe encontraram associação da DMV com a presença de metástase e mau prognóstico¹³².

Lopez-Graniel e colaboradores¹³³ em 33 pacientes com câncer de cabeça e pescoço pesquisados e Chien e colaboradores¹³⁴ em 73 pacientes de hipofaringe encontraram associação da DMV com a presença de metástase e recorrência neoplásica.

Hannen e colaboradores¹³⁵ identificaram um número maior de vasos possivelmente por ter sido o único a usar análise digital. Esta pesquisa encontrou uma densidade elevada de vasos em pacientes que não apresentavam metástases, resultado similar foi encontrado em carcinoma de rim por Herbst e colaboradores¹³⁶. Estes resultados são contrários ao que Weidner e Folkman publicaram^{87,88}. Em seu trabalho Hannen também avaliou o diâmetro dos vasos e observou que nos tumores metastáticos os vasos eram maiores e menores nos não metastáticos⁹⁴.

Gleich e colaboradores¹³⁷ não encontraram correlação entre a DMV avaliada com CD31 e o prognóstico de 19 pacientes T1 com câncer de boca. Concluem que é difícil diferenciar microvasos de neovascularização e que a área de estudo selecionada pode não representar a angiogênese do tumor, comentam também o número exíguo de pacientes estudados. Em um segundo estudo, Gleich e colaboradores¹³⁸ em 31 pacientes com tumores T2-T4 de boca utilizando dois marcadores de angiogênese, o CD31 e fator VIII, não encontraram associação com a presença de metástase e com a sobrevida e acreditam que os tumores de boca são menos angiogênicos que neoplasias de outros órgãos. Leedy e colaboradores¹³⁹ em 57 pacientes T1 e T2 com câncer de língua não observaram correlação entre a angiogênese e a presença de metástase cervical. Amar e colaboradores em carcinomas de língua também concluíram que não havia correlação dos vasos no sítio primário e a incidência de metástases, além disso não encontraram correlação da DMV com o tipo histológico e tamanho do tumor¹⁴⁰. Moriyama e colaboradores em 44 pacientes com câncer de boca não encontraram associação da DMV com o sítio do tumor, o tamanho do tumor, grau de diferenciação e com a presença de

metástase cervical. Nos pacientes com metástase observaram menor número de vasos porém sem significância estatística¹⁴¹.

Até a presente data não há uma prova entre a densidade vascular e metástase. Frente a esses achados conflitantes na literatura, a busca de outros fatores associados à angiogênese tumoral, além da contagem dos vasos, parece fundamental para que se possa compreender melhor a biologia das lesões.

3.6.3.2 Fator tecidual, angiogênese e câncer

A ocorrência de fenômenos trombo-embólicos em pacientes com câncer foi inicialmente relatada por Trousseau em 1865 definindo a síndrome que leva o seu nome. Anormalidades na coagulação estão presentes em 90% dos pacientes com doença metastática e os fenômenos trombo-embólicos representam a segunda causa de óbito relacionadas ao câncer^{142,143}. Pacientes com câncer tem 10 vezes mais risco de fenômenos tromboembólicos¹⁴⁴. A fisiopatologia dos fenômenos trombo-embólicos no paciente com câncer é complexa e está relacionada a propriedades pró-coagulantes do tumor, a células endoteliais da própria neoplasia e a processos inflamatórios¹⁴⁵. Contribuem também a estase venosa, os defeitos vasculares e a diminuição de fatores inibidores ao processo de fibrinólise que são mecanismos normais de defesa, os quais predisõem o paciente com câncer a um estado de hipercoagulabilidade¹⁴⁶.

Os pacientes com trombose venosa profunda tem risco nove vezes maior de apresentarem um diagnóstico de câncer nos próximos doze meses¹⁴⁵. Os fenômenos trombo-embólicos em pacientes com câncer de mama estão relacionados ao estadiamento da doença, sendo 0,1% no estadiamento I e 18% nos estadiamentos III e IV¹⁴⁶. A partir da década de 90, Sorensem e colaboradores¹⁴⁷ demonstraram que os pacientes com

diagnóstico de câncer e com episódios de trombose venosa apresentavam estadiamentos mais avançados da doença e tinham pior prognóstico. Zacharski⁵ em trabalho prospectivo randomizado concluiu que o uso de anticoagulantes em pacientes com tumores de pulmão apresentavam maior sobrevida.

O processo normal de coagulação resulta da interação entre diversos fatores: protrombina, cálcio, fibrinogênio e um quarto fator conhecido como tromboplastina ou, fator tecidual (FT)¹⁴⁸.

FT é uma glicoproteína transmembrana de 47 kd com 295 aminoácidos. É o principal regulador da angiogênese oncológica e não parece ser homólogo a outras proteínas. O fator tecidual é uma proteína expressa na superfície das células endoteliais com a função de manter a homeostase¹⁴⁹. É chamado de fator III ou tromboplastina tecidual com distribuição não uniforme nos tecidos. Apresenta altos níveis no cérebro (glia), pulmão, fibroblastos dos grandes vasos, queratinócitos da epiderme e placenta; distribuição intermediária no coração, rim, intestino e útero e baixa distribuição em timo, músculo esquelético, baço e fígado^{148,150,151}. FT é encontrado na adventícia de grandes vasos, células de órgãos capsulados, epiderme, endométrio e epitélio mucoso. As células epiteliais da cavidade uterina também expressam TF presumivelmente para proteger a mãe de sangramentos durante a gestação¹⁵⁰. As células extravasculares expressam o FT, já o endotélio vascular não, evitando coagulação intravascular. As células intravasculares como as plaquetas, leucócitos e células endoteliais podem expressar FT quando submetidas a situações específicas, como: injúria vascular, defeitos estruturais dos vasos (ruptura do endotélio), alteração funcional do endotélio (ativação ou estímulo angiogênico), entrada na circulação de células que expressam FT (células inflamatórias, cels neoplásicas) ou por vesículas contendo FT na circulação⁸⁶. A importância fisiológica do FT intravascular é desconhecida porém sabe-se que pode desregular a homeostase¹⁵².

O aumento da expressão do FT está relacionado com o fenômeno de trombose especialmente em pacientes com câncer e também com infecção e arteriosclerose.

O FT modifica as propriedades das células tumorais alterando a produção de moléculas de crescimento e atua na angiogênese induzindo a produção de trombina estimulando a célula endotelial a se dividir¹⁵³. A interação do FT com o fator VIIa acarreta aumento na síntese de fatores pró-angiogênicos. O FT atua como pró-angiogênico por duas vias fisiopatológicas, uma dependente da coagulação e outra não.

A primeira resulta da ativação da trombina pela ligação do FT ao fator VII. O fator VIIa apresenta-se em baixos níveis na circulação, porém sua atividade proteolítica só é ativada quando em contato com o FT, que ocorre por exemplo, quando há ruptura de um vaso¹⁵⁴. O FT ativa o fator VIIa formando o complexo FT/Fator VII. Este transforma o fator X em Xa que converte a protrombina em trombina. A trombina induz a transformação do fibrinogênio em fibrina iniciando a formação do coágulo^{150,153,155}. A presença de trombina resulta em lise dos fibrinopeptídeos A e B a partir da molécula do fibrinogênio, o que determina a conversão deste em fibrina. Níveis plasmáticos elevados de fibrinopeptídeo A foram relacionados ao crescimento do tumor¹⁴⁴. A presença de trombina também promove ativação de plaquetas, que se unem à fibrina formando o coágulo. Fatores pró-angiogênicos liberados pelas plaquetas, dentre eles o VEGF, contribuem para a migração e a proliferação de células endoteliais¹⁵⁶. O VEGF, por sua vez, induz o aumento da permeabilidade vascular que determina escape de proteínas plasmáticas, especialmente a fibrina, as quais formarão uma matriz ao redor das células tumorais¹⁵⁷. A partir desta matriz, que serve como base de migração de células endoteliais e angiogênese tumoral, existe a liberação de novos agentes que estimulam a proliferação vascular, contribuindo para manutenção e aumento do estímulo angiogênico¹⁵⁸.

Yu e colaboradores⁸⁶ descreveram a segunda via de incremento a angiogênese não diretamente relacionada a cascata da coagulação. O processo envolve a fosforilação da porção citoplasmática do FT e induz a formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes, entre eles, o fator de crescimento vascular endotelial, resultando em um potente estímulo angiogênico. O FT tem importância na angiogênese fisiológica e patológica. A deficiência de FT em ratos transgênicos ocasiona mortalidade do embrião devido à formação vascular insuficiente¹⁵⁹. Embriões com deficiência de VEGF também apresentam lesões semelhantes, sugerindo que o FT e o VEGF regulam funções similares^{160,161}. A ativação do FT aumenta a transcrição do VEGF, levando à inibição da trombospondina e potente estímulo angiogênico¹⁶².

O VEGF é o fator pró-angiogênico predominante⁸². Diferentes estudos indicam que o fator tecidual apresenta a capacidade de estimular a expressão do VEGF estimulando a angiogênese^{163,164,165}.

A alteração da atividade do processo de angiogênese resulta de desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos. O FT participa desse processo estimulando a produção de VEGF e pela supressão da trombospondina, um peptídeo com atividade antiangiogênica⁸¹. Amirkhosravi e colaboradores¹⁶⁶ demonstraram que o VEGF e o fator tecidual aumentam suas expressões em situação de hipóxia do tumor. A atividade pró-angiogênica do FT é confirmada pela associação positiva entre sua expressão e o aumento da DMV em várias neoplasias malignas como próstata¹⁶⁷, mama¹⁶⁸, pulmão¹⁶⁹, e carcinoma colorretal¹⁷⁰.

A partir da identificação do FT como participante importante do processo tumoral em diversas neoplasias malignas, vários estudos foram desenvolvidos para identificar a sua expressão e correlacioná-la com fatores prognósticos usualmente utilizados.

Alterações da expressão e exposição do fator tecidual acarretam crescimento do tumor por aumento da angiogênese e maior chance de metástases¹⁴⁹. O FT é mais comumente observado em tumores metastáticos¹⁶⁴.

Seto e colaboradores¹⁷⁰, analisando 67 pacientes com tumores colo-retais, demonstraram aumento da incidência de metástases hepáticas e pior sobrevida aos três anos nos tumores com expressão mais elevada do fator tecidual. Utilizaram uma diluição 1:100 e a leitura da expressão foi em quatro categorias: ausente, pouco, moderado e alta expressão. Consideraram positivo moderado e alta. Houve correlação com o tipo histológico e TNM. Estadiamento e FT foram fator de prognóstico independente para metástase hepática. Foi também significativa a relação do FT com a sobrevida¹⁷⁰. Nakasaki e colaboradores¹⁷¹, também avaliando adenocarcinomas de cólon e reto, demonstraram que houve relação entre o estadiamento em graus mais avançados da neoplasia e a expressão do FT. Yu J e colaboradores demonstraram em carcinomas de cólon que há relação da expressão do FT com a sobrevida e está correlacionado com metástases linfáticas e hepáticas. Também demonstraram sua alta expressão com a densidade vascular e VEGF^{86,142}.

Versteeg H e colaboradores referem que o FT está expresso em 57% dos pacientes com cancer de cólon e em 88% dos pacientes com cancer de cólon e doença hepática metastática¹⁵².

Poon e colaboradores¹⁷² avaliaram 58 casos de carcinoma hepatocelular, comparando a expressão do FT com densidade microvascular e outros fatores prognósticos, encontraram associação positiva do FT à maior DMV e expressão de VEGF. A expressão positiva para FT se relacionou com tumores mais invasivos e estágios clínicos mais avançados, sendo fator prognóstico independente.

Kaido e colaboradores¹⁷³, da mesma forma, encontraram importância prognóstica em relação ao FT em casos de carcinoma hepatocelular. Indivíduos com tumores que expressavam o FT apresentaram uma maior frequência de trombose neoplásica da veia porta, metástases intra-hepáticas, hipoalbuminemia, e invasão capsular. A sobrevida livre de doença foi significativamente maior em pacientes com pequena expressão do FT, o que, nesta amostra, demonstrou que o mesmo é um fator prognóstico negativo independente.

Khorana e Fine¹⁷⁴, em artigo de revisão, relataram a incidência de fenômenos trombo-embólicos em 17% a 57% dos pacientes com câncer de pâncreas e constataram que as células dessa neoplasia ativam plaquetas e diversos outros fatores pró-coagulantes, sendo o FT um dos principais. A ativação da coagulação poderia estar relacionada ao crescimento tumoral e à angiogênese. Kakkar e colaboradores¹⁷⁵, em estudo de 55 casos de carcinomas ductais pancreáticos, demonstraram que tumores mais indiferenciados apresentam maior expressão do fator tecidual.

Além dos órgãos do trato gastrointestinal, existem diversos relatos do FT como importante fator prognóstico em outras neoplasias. Hamada e colaboradores¹⁷⁶, estudando 44 espécimes de gliomas, mostraram relação entre a intensidade da expressão do FT e o grau de diferenciação tumoral. Em seu estudo, todos os gliomas expressaram o FT, porém, enquanto apenas 10% dos gliomas benignos (graus I e II) foram intensamente positivos para FT, 86% dos astrocitomas anaplásicos (grau III) e 95% dos glioblastomas (grau IV) expressaram de forma moderada ou intensa essa proteína.

No adenocarcinoma de próstata, Abdulkhadir e colaboradores¹⁶⁷ e Carvalhal¹⁷⁷ demonstraram que a atividade do FT apresentou associação direta com níveis mais elevados de PSA e com a DMV. Quando quantificada a densidade microvascular nestas lesões, os índices mais elevados foram observados nos casos positivos para FT, levando

os autores a concluir que a sua expressão poderá servir como um marcador da agressividade dos tumores prostáticos, assim como um indicador de angiogênese aumentada. Os mesmos resultados foram confirmados por Akashi e colaboradores¹⁷⁸, os quais relataram que os pacientes com doença metastática apresentaram alta expressão do FT.

Koomagi e Volm¹⁶⁹ demonstraram a relação entre expressão do FT, intensidade do VEGF e densidade microvascular em neoplasias de pulmão do tipo não pequenas células. Os pacientes com maior intensidade de expressão do FT tiveram pior prognóstico e sobrevida menor. O FT foi comparado com a resistência do tumor à droga doxorubicina “*in vitro*”, e os pacientes que não expressavam a proteína foram mais resistentes à droga do que os que a expressavam. Os autores sugerem que o FT possa ser utilizado como fator prognóstico e preditivo para o tratamento dessa neoplasia.

Contrino e colaboradores¹⁷⁹ identificaram alta expressão do FT em carcinomas de mama e encontraram também relação prognóstica, não encontrando tais achados em pacientes com doenças benignas. Vrana e colaboradores¹⁶⁸ encontraram associação significativa entre a presença do FT e a progressão para o carcinoma de mama invasivo. Um estudo em câncer de mama mostrou que o FT plasmático tem valor prognóstico¹⁸⁰.

Nos tumores ovarianos de origem epitelial, Wang e colaboradores¹⁸¹ relataram a importância do fator tecidual na evolução clínica destes pacientes. O aumento da atividade de genes relacionados a proteínas de coagulação apresenta correlação com atividade proliferativa celular, potencial de invasão, angiogênese, produção de ascite e metástases. Os autores também propuseram que estudos sobre o bloqueio das rotas de coagulação e inflamação poderão propiciar novas alternativas para terapêutica nesses tumores.

Poucos estudos foram realizados contemplando a relação entre o fator tecidual e o câncer de estômago. Um relato esporádico sugeriu que a produção do FT pode estar relacionada com complicações pulmonares em paciente com adenocarcinoma gástrico¹⁸². Jiao e colaboradores,¹⁸³ demonstraram em 80 pacientes que a positividade para o FT, VEGF e DMV é significativamente maior nos pacientes com neoplasia maligna. Avaliação *in vitro* de espécimes de câncer gástrico humano mostrou que nem todas as linhagens tumorais apresentam expressão elevada de FT, porém as associadas com maior expressão de FT e VEGF podem ser manipuladas e o bloqueio do excesso de vascularização pode ser obtido¹⁸⁴.

A expressão seletiva do FT em células tumorais e no endotélio vascular torna-o alvo interessante para tratamentos dirigidos. Hu e Garen¹⁸⁵ desenvolveram um tratamento molecular capaz de seletivamente localizar e destruir, em ratos, células tumorais que expressavam o FT em modelo de melanoma humano. Nilsson e colaboradores¹⁸⁶ obtiveram trombose seletiva e morte de células tumorais em modelos de teratocarcinoma, adenocarcinomas de cólon e sarcomas de ratos, pelo uso de anticorpos específicos. Tal estratégia de tratamento produziu diminuição significativa dos tumores, embora o tecido residual tenha permitido recidiva tumoral.

Poucos trabalhos estudam a associação do FT com metástase e sobrevida em câncer de cabeça e pescoço. Callander e colaboradores em 1991 pesquisaram a presença do fator tecidual em tumores sólidos de diferentes órgãos. No câncer de cabeça e pescoço pesquisaram em sete pacientes e encontraram expressão em todos e afirmaram que embora seja expresso em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são raros os fenômenos trombo-embólicos nestes pacientes¹⁸⁷. Wojtukiewicz e colaboradores pesquisaram a expressão do fator tecidual em carcinomas de laringe e encontraram

expressão em todos os casos. A expressão foi maior em áreas com células imaturas e também foi observada a expressão em áreas de epitélio normal¹⁸⁸.

Frente a estes achados o estudo das interações entre o fator tecidual e o câncer, especialmente no que se refere aos seus mecanismos de ação, pode abrir um campo alternativo de tratamento das neoplasias malignas, envolvendo não só o controle da expressão de substâncias pró-angiogênicas, mas também dos sistemas regulatórios da coagulação sanguínea.

A compreensão da biologia molecular no câncer de cabeça e pescoço objetiva a melhora do tratamento e também a detecção de novos tumores. O uso de marcadores biológicos moleculares pode contribuir para o conhecimento do prognóstico, no estudo histológico das lesões, nos protocolos de tratamentos e na avaliação da resposta a agentes terapêuticos⁶⁹. Os marcadores de angiogênese como o fator tecidual e a densidade microvascular abrem um campo interessante de pesquisa na busca da compreensão dos mecanismos de evolução do câncer possibilitando estratégias inovadoras de tratamento.

Este é o primeiro estudo pesquisando o fator tecidual como fator prognóstico no câncer de boca.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 População e amostra

Para a realização do presente trabalho, foi desenvolvido estudo de coorte histórico, com componentes contemporâneos, que incluiu 53 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca, tratados cirurgicamente pelo autor, no período de janeiro de 1991 a dezembro de 2005. Os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor em seu local de origem e dos linfonodos cervicais. A cirurgia dos linfonodos cervicais incluiu pacientes que clinicamente não apresentavam metástases (N-), e de pacientes que clinicamente foram diagnosticados como metastáticos (N+).

A pesquisa da expressão do fator tecidual e densidade vascular foi realizada em lâminas histológicas obtidas do tumor primário. Foram revisados os prontuários com coleta de dados clínicos pré-cirúrgicos, coleta de dados do exame anátomo-patológico da peça cirúrgica e a evolução pós-cirúrgica quanto a sobrevida dos pacientes.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam uma ou mais das seguintes situações:

- Cirurgia sem intenção curativa.
- Espécimes de anatomia patológica sem condições para as análises histológicas apropriadas
- Outras neoplasias concomitantes ou história de tumores prévios.
- Terapia neo-adjuvante (quimioterapia e radioterapia).
- Pacientes cujos dados de prontuário estavam incompletos.

- Impossibilidade de definir o estadiamento clínico

4.2 Coleta de dados

4.2.1 Aspectos clínicos e variáveis demográficas.

A coleta de dados sobre os pacientes foi retrospectiva, com a revisão de prontuários da clínica privada do autor.

Os dados clínicos e fatores de risco coletados foram:

- Sexo – masculino e feminino
- Idade – Considerada a idade do paciente na data do tratamento cirúrgico.
- Localização do tumor – língua, assoalho, lábio, gengiva, trígono retro-molar e mais de uma localização na boca, ou extensão para orofaringe, ou outra área de localização na boca como bochecha e palato duro.
- Classificação T e N, pré e pós-cirúrgica. Conforme a classificação TNM da Tabela 2. Agrupados em T1-T2 e T3 -T4 quanto ao T e em N- e N+ quanto ao N.
- Sobrevida – Medida em meses entre a data da cirurgia e a última consulta. Foi observado o óbito pela doença ou o óbito por outra etiologia. Para os pacientes em acompanhamento e os pacientes que não compareceram mais às

revisões foi considerado o número de meses até a última consulta.

4.2.2 Aspectos histológicos

Os dados histológicos foram:

- Grau de diferenciação celular – definido pelo exame anátomo-patológico em bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) e pouco diferenciado (G3).
- Invasão vascular – sim ou não.
- Infiltração de bainha nervosa – sim ou não.

4.2.3 Imunoistoquímica

Foram obtidos os blocos de parafina que continham os tumores primários dos pacientes investigados. Cortes do bloco principal de cada tumor foram feitos com uma espessura de 4 μm . As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20 mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando-se solução de peridrol a 3% (H_2O_2 em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução salina a 5% em tampão PBS (“Phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal

de rato anti-Fator Tecidual humano tipo 1 (Mouse anti-human tissue factor, type 1 US Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1) com diluição de 1:30 e anticorpo monoclonal de rato anti-CD34 (CD34 classe II, Clone QBEnd 10 Dakocytomation) com diluição de 1:400. O sistema de detecção utilizado foi o Kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados usando-se cromógeno 3,3-diaminoazobenzidina (DAB) e tampão PBS em solução a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contracolorados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e, finalmente, montados com bálsamo e lamínula.

4.3 Análise Imunoistoquímica

O sistema de análise digital utilizado foi composto por microscópio óptico (Zeiss Axioskop 40, Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de videocâmera (Roper Scientific, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura (Image Pro Capture kit, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Para a análise digital das imagens, foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5. Esse programa permite a captura da imagem digital com a possibilidade da inserção de grade de correção, marcação e contagem das áreas de interesse. As imagens foram capturadas no formato .TIFF (True Image Format File). O processo de captura das imagens foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas de Porto Alegre.

A contagem dos microvasos foi realizada em secções de tecido neoplásico dos blocos de parafina, em cortes imediatamente adjacentes aos usados para identificação da área tumoral e dos usados para avaliação do fator tecidual. Foram realizados controles

negativos em tecido da boca, úvula, não-neoplásico, que não expressaram os antígenos do estudo. Controles positivos em tecido de carcinoma prostático confirmaram a reatividade dos marcadores. A identificação da microvascularização foi realizada através da seleção dos pontos mais vascularizados, preferencialmente na região periférica do tumor, examinadas com magnificação baixa (50X). Essas áreas hipervascularizadas, denominadas *hot spots*, são representativas dos locais de maior densidade microvascular. Após a sua identificação, foi realizada a captura da imagem em vinte campos diferentes para a contagem dos vasos com uma magnificação de 200X, correspondendo à área de $0,7386 \text{ mm}^2$. Qualquer célula ou grupamento celular demonstrando coloração positiva (coloração acastanhada), claramente isolada de vasos maiores adjacentes, células tumorais e outros elementos do tecido conjuntivo, com ou sem lúmen e /ou eritrócitos foi considerado um microvaso contável (figura 1). Áreas de fibrose, hemorragia, necrose, inflamação, microvasos esparsos e vasos com parede muscular foram excluídos da contagem^{88,92}. Não foi necessária a visualização da luz vascular ou a presença de hemácias, pois o diâmetro médio dos capilares é de 10 a 12 micrômetros, semelhantes ao maior diâmetro de uma hemácia. Tanto células isoladas quanto vasos maiores, porém sem parede muscular ou adventícia, foram incluídos na contagem. A inserção de uma grade de correção resultou em campo com amplitude de $600 \times 440 \text{ pixels}$, correspondendo à área de $0,66 \text{ mm}^2$. Somente foram contados os vasos dentro da área da grade, ou que tocassem a linha de demarcação pontilhada (Figura 2) como preconizado por Gundersen e colaboradores¹⁹⁰. A contagem foi realizada em uma escala ordinal e, posteriormente, foi realizada a média aritmética dos vinte campos selecionados em cada paciente.

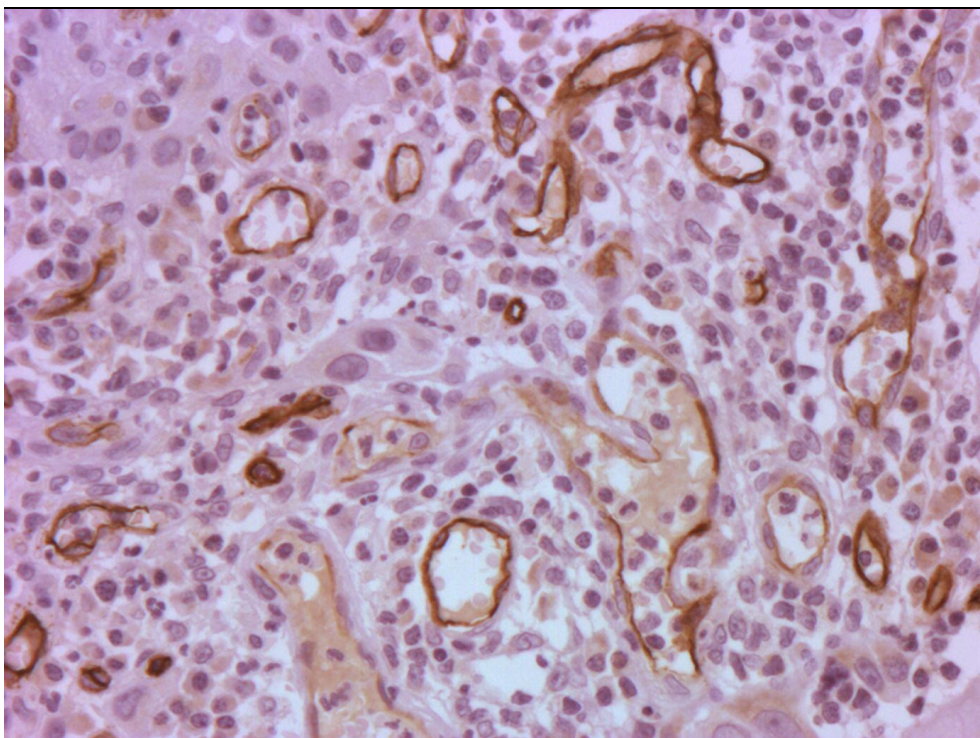


Figura 1. Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos anti-CD 34 em secção de tumor (magnificação de 200X)

A quantificação da expressão do FT foi avaliada pela reatividade do anticorpo, utilizando-se para aferição uma lente objetiva com magnificação de 100x. A expressão do FT foi classificada em quatro categorias: 1 (0 a 25% das células com carcinoma coradas), 2 (26% a 50% das células com carcinoma coradas), 3 (51% a 75% das células com carcinoma coradas) ou 4 (76% a 100% das células com carcinoma coradas)^{177,180}.

Esta variável foi avaliada independentemente por dois observadores treinados, não havendo discordância entre os dados computados para este quesito. As figuras 3 e 4 exemplificam a classificação acima proposta respectivamente com lesões na categoria 1 e 4.

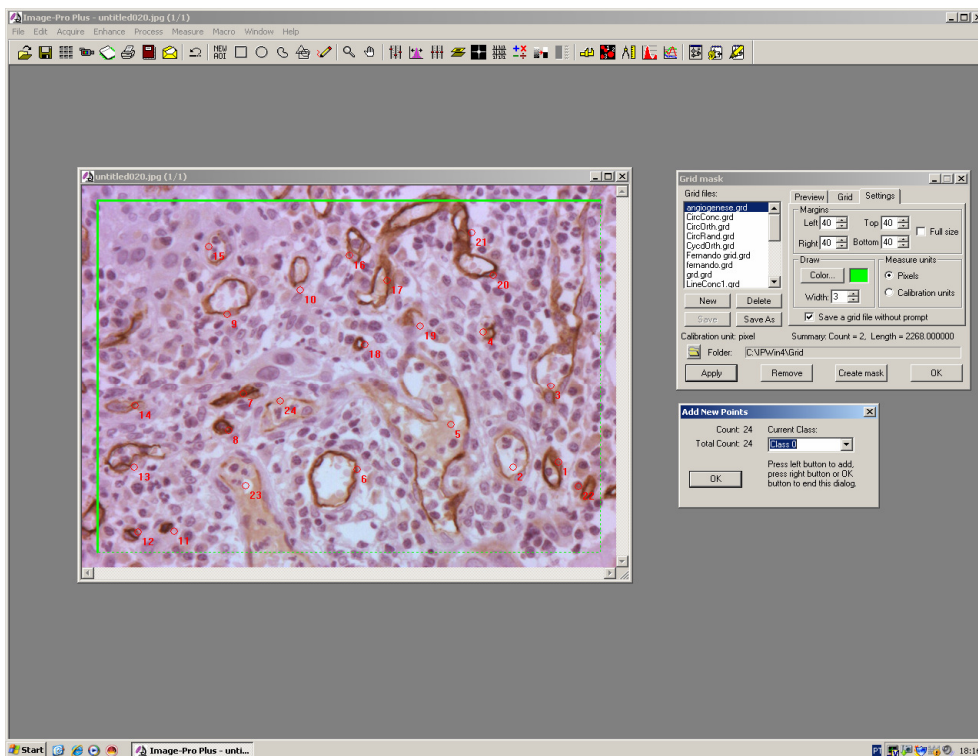


Figura 2. Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 200X)

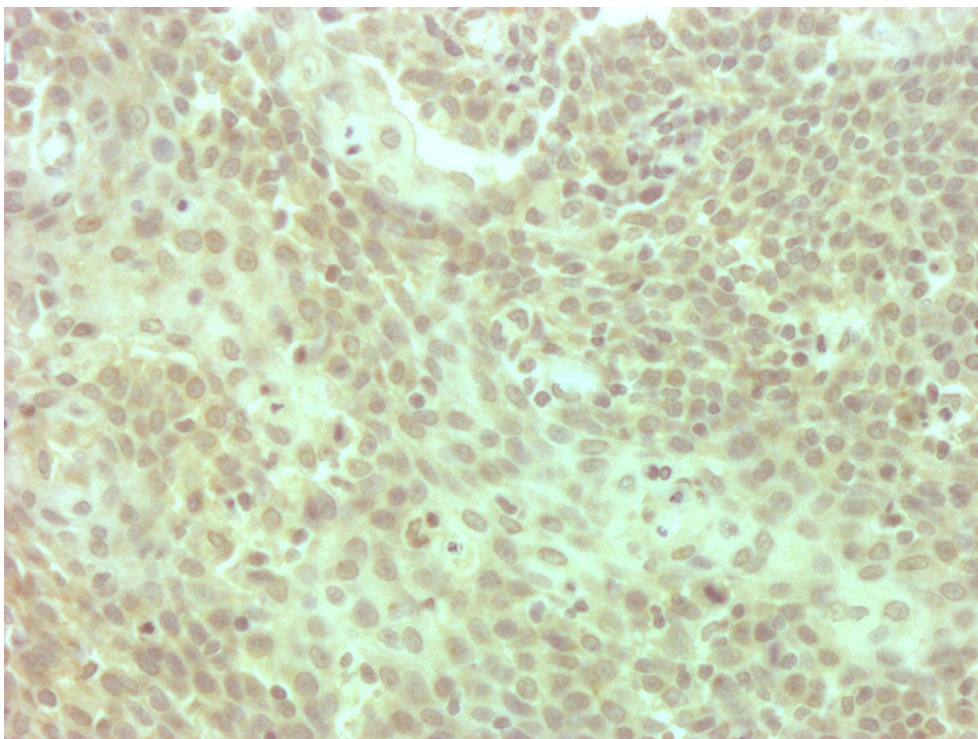


Figura 3. Baixa expressão do fator tecidual em carcinoma epidermóide de boca (magnificação de 200x)

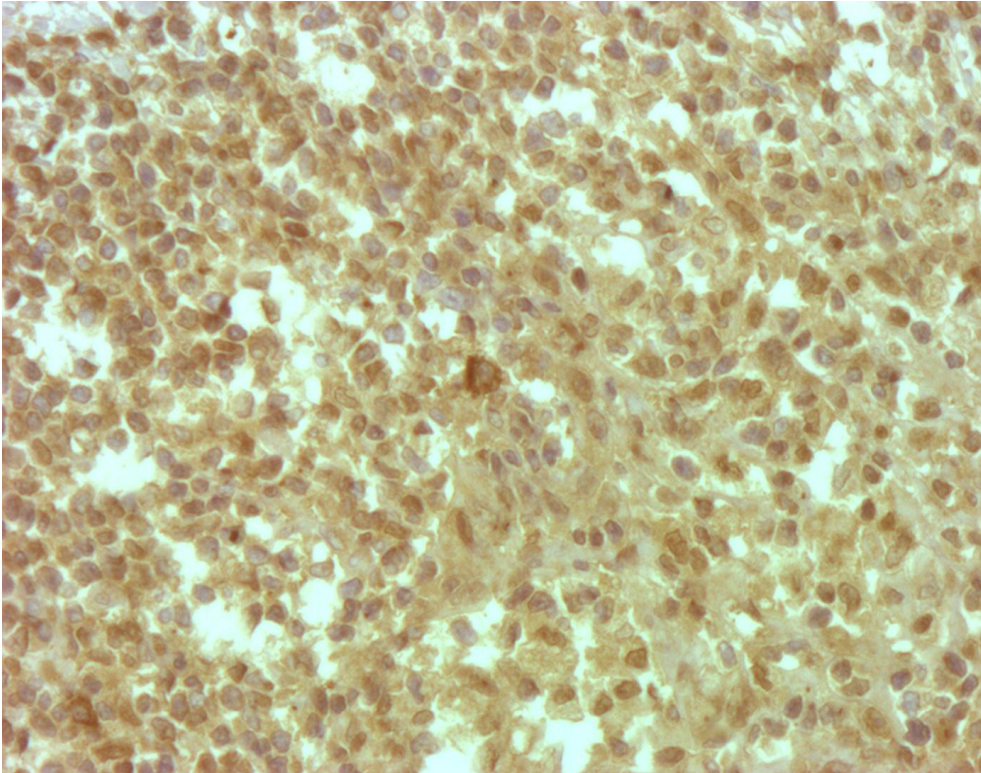


Figura 4. Alta expressão do fator tecidual em carcinoma epidermóide de boca (magnificação de 200x)

4.4 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão, enquanto que para as variáveis qualitativas utilizaram-se percentuais. A comparação das variáveis quantitativas nos grupos foi realizada pelo teste t de Student e no caso das variáveis qualitativas pelo teste do Qui-quadrado. Medidas de associação como o *odds ratio* e o risco relativo com seus respectivos intervalos de confiança foram complementarmente realizados. Para ajustar a associação entre fator tecidual, densidade microvascular e metástase frente a diversos potenciais fatores de risco, utilizou-se a regressão logística multivariada.

As curvas de sobrevivência foram calculadas com o método de Kaplan- Meyer. As mortes que não foram decorrentes do tumor primário ou suas metástases não foram

consideradas como falha de tratamento e sim como observações censuradas. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste *log rank*. Para ajustar simultaneamente os efeitos dos diversos fatores considerados e sua relação com a ocorrência de óbito, foi utilizada a regressão de Cox. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para a análise estatística, os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 11.0 e Excel 2003.

4.5 Ética

O estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993).

Foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1996), mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Protocolo número 298/01 - CEP).

As análises realizadas neste estudo não implicaram em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum foram introduzidas coletas adicionais. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos aos pacientes, pois toda a pesquisa foi realizada em material biológico que necessariamente tinha sido retirado como parte do tratamento. Por ser um estudo retrospectivo e não havendo risco, a assinatura de um termo

de consentimento foi considerada não aplicável a este projeto. Entretanto, se tivesse ocorrido alguma descoberta que pudesse modificar positivamente o tratamento e acompanhamento das pacientes, estes poderiam ter sido localizados e informados a respeito nos casos em que o Comitê de Ética em Pesquisa tivesse julgado procedentes.

5. RESULTADOS

No período de janeiro de 1991 e dezembro de 2005 foram tratados 96 pacientes pelo autor. Foram selecionados 53 pacientes que preencheram os critérios de inclusão para o presente estudo. As principais causas de exclusão foram problemas com blocos de parafina, dificuldade quanto ao estadiamento e tratamentos oncológicos prévios.

A distribuição dos 53 pacientes quanto à pesquisa do FT, DMV, características clínicas, variáveis demográficas, características histológicas e sobrevida pode ser observada nos anexos 1 e 2.

5.1 Aspectos clínicos e variáveis demográficas.

A distribuição dos pacientes quanto ao sexo foi de 41 pacientes do sexo masculino (77,4%) e 12 pacientes do sexo feminino (22,6%). A faixa etária compreendeu pacientes entre 46 e 87 anos com uma mediana de 60,2 anos.

As proporções da classificação T e N no pré e pós-cirúrgico está representado na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes na classificação T pré e pós-operatório (pT).

Categoria	Número de pacientes	(%)
T1 e T2	24	45,3
T3 e T4	29	54,7
pT1 e pT2	20	37,7
pT3 e pT4	33	62,3

A distribuição da classificação N pré e pós-cirúrgica dos pacientes apresentou distribuição de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição dos pacientes conforme a classificação N pré e pós operatória

Classificação N pré e pós-cirúrgica	Número de pacientes	(%)
N-	30	56,6
N+	23	43,4
N1	14	26,4
N2	5	9,4
N3	4	7,6
pN-	28	52,8
pN+	25	47,2
pN1	7	13,2
pN2	14	26,4
pN3	4	7,6

O estadiamento clínico I e II foi observado em 15 pacientes enquanto que 38 pacientes foram classificados em estádios III e IV.

A distribuição da localização dos tumores está demonstrada na Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição dos pacientes conforme a localização do tumor.

Localização	Número de pacientes	(%)
Língua	20	37,7
Assoalho	2	3,8
Gengiva	7	13,2
Lábio	1	1,9
Trígono retro-molar	5	9,4
Mais de uma localização, outra localização na boca ou extensão para orofaringe	18	34

A sobrevida foi estudada nos 53 pacientes e pode ser observada na Figura 5. O óbito pela doença ocorreu em dez casos. Os pacientes vivos sem doença totalizaram 27,

sendo que um paciente estava vivo com a doença até a redação deste trabalho e quinze pacientes abandonaram o acompanhamento.

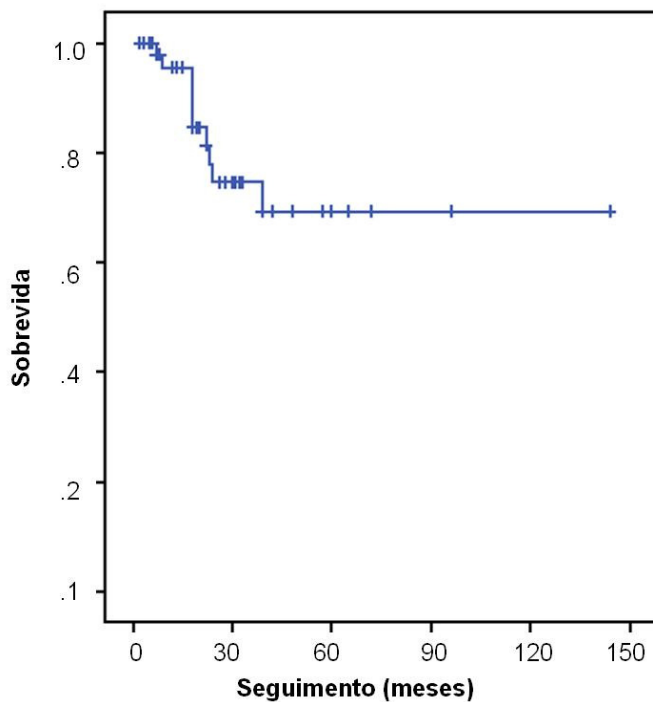


Figura 5: Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência geral de óbitos pela doença

5.2 Aspectos Histológicos

A distribuição quanto ao grau de diferenciação celular pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição dos pacientes conforme o grau de diferenciação celular.

Grau de diferenciação celular	Número de pacientes	(%)
Bem diferenciado (G1)	6	11,3
Moderadamente diferenciado (G2)	39	73,6
Pouco diferenciado (G3)	8	15,1

A infiltração de bainhas nervosas foi observada em 27 (50,9%) situações e ausente em 26 (49,1%). A embolização vascular foi observada em 19 (35,8%) casos e ausente em 34 (64,2%) casos.

5.3 Densidade Microvascular e Fator Tecidual

O média de microvasos por campo por paciente variou de 4 a 47,8 com uma média de 18,47 vasos. Os pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo considerado de baixa densidade em relação a média foram identificados 32 pacientes e um segundo grupo considerado de alta densidade foram identificados 21 pacientes.

Foi observada pouca imunorreatividade para o fator tecidual na maioria das células tumorais, sendo que três tumores avaliados não expressaram a proteína. Trinta e quatro tumores foram classificados de baixa expressão (Figura 3) enquanto que 13 foram alta expressão (Figura 4), escores 3 e 4 (Tabela 10). Em função do pequeno número de pacientes alocados nos escores 2 e 4 e da polarização observada na pouca intensidade da expressão do fator tecidual, para melhor análise estatística, os casos de escore 0, 1 e 2 foram estudados em conjunto, formando um novo grupo, baixa frequência de expressão do fator tecidual, com menos de 50% das células positivas e os casos 3 e 4 formaram um segundo grupo, considerada alta expressão do fator tecidual, com mais de 50% das células positivas.

Tabela 10 . Expressão do fator tecidual em espécimes de carcinoma epidermóide de boca.

Escore - Fator Tecidual	Número de amostras (%)
1 (0-25%)	34 (64,2)
2 (26-50%)	6 (11,3)
3 (51-75%)	12 (22,6)
4 (76-100%)	1 (1,9)

Para a análise da regulação da expressão do fator tecidual exercida sobre a angiogênese nas células tumorais, foi realizada comparação do número de microvasos nas áreas de tumor com a expressão do fator tecidual nas lâminas de secção adjacente. A análise comparativa entre a categoria do fator tecidual e o número de microvasos por campo não se mostrou estatisticamente significativa (Figura 6).

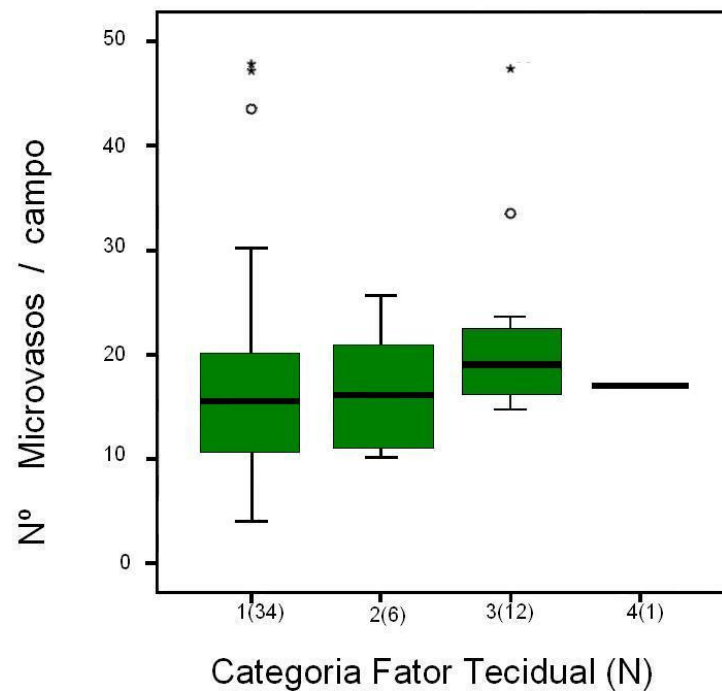


Figura 6. Correlação entre a expressão do FT (número de casos) e a densidade microvascular (média de microvasos)

5.4 Características clínico-patológicas, fator tecidual, densidade microvascular e metástase cervical.

As associações e correlações entre os pacientes com metástase (pN+) e sem metástase (pN-) foi realizada com as características clínicas, histológicas, fator tecidual e densidade microvascular e podem ser observadas na Tabela 11.

A localização foi estudada considerando a língua como fator diferencial, visto que é a região mais freqüente acometida pelos carcinomas epidermóide de boca e pelo maior risco de metástase^{25,26}.

A classificação N quando associada à confirmação histológica de metástase apresentou sensibilidade em 72% dos casos, sendo 7(28%) pacientes falsos negativos.

Tabela 11: Comparação entre os grupos com metástase e sem metástase quanto a variáveis demográficas, características clínicas, histológicas, fator tecidual e densidade microvascular.

Variável	Com Metástase n=25 (%)	Sem Metástase n=28 (%)	OR	IC95%	P
Idade, anos (%)					
Abaixo de 60 anos	12(48,0)	18(64,3)	-		
Acima de 60 anos	13(52,0)	10(35,7)	1,9	0,6a 5,8	0,180
Gênero, n° (%)					
masculino	18(72,0)	23(82,1)	0,6	0,2 a 2	0,290
Feminino ^(a)	7(28,0)	5(17,9)			
Lingua, n° (%)					
comprometida	9(36,0)	11(39,3)	1,1	0,4 a 3,5	0,515
não comprometida ^(a)	16(64,0)	17(60,7)			
Classificação T (tumor), n° (%)					
T1 e T2 ^(a)	8(32,0)	16(57,1)			
T3 e T4	17(68,0)	12(42,9)	2,8	0,9 a 8,7	0,059
Classificação N(nódulo), n° (%)					
N- ^(a)	7(25)	23(92)			
N+	18(75)	5(8)	11,8	3,2 a 43,5	0,001
Estadiamento clínico, n° (%)					
I e II ^(a)	2(8)	13(46,4)			
III e IV	23(92)	15(53,6)	9,9	1,9 a 50,6	0,002
Grau de diferenciação, n (%)					
G1	1(4)	5(17,8)			
G2	19(76)	20(71,5)	4,8	0,5 a 117,9	0,20
G3 ^(a)	5(20)	3(10,7)	8,3	0,4 a 318,2	0,14
Embolização, n° (%)					
Presente	15(60)	4(14,3)	9	2,3 a 33,9	0,001
ausente ^(a)	10(40)	24(85,7)			
Infiltração nervosa, n° (%)					
Presente	17(68)	10(35,7)	3,8	1,2 a 12	0,019
ausente ^(a)	8(32)	18(64,3)			
Fator Tecidual, n° (%)					
[+]	6(24)	7(25)	0,9	0,3 a 3,3	0,594
[-] ^(a)	19(76)	21(75)			
Densidade Microvascular, n°(%)					
Baixa ^(a)	16(64)	16(57,1)			
Alta	9(36)	12(42,9)	0,7	0,2 a 2,3	0,410

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e frequência (percentual). OR: *odds ratio*; IC95%: intervalo de confiança de 95%. ^(a) Categoria de referência no cálculo do *odds ratio*

A análise multivariada para avaliar o risco de associação do fator tecidual com outros potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de metástase foi realizada e está apresentada na tabela 12.

Tabela 12: Modelo de regressão logística multivariável ajustando o efeito do fator tecidual [alta expressão] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de metástases.

Variável	OR	IC95%	P
Fator Tecidual [alta expressão]	0,88	0,18 a 4,34	0,88
Densidade Microvascular [Alta]	1,36	0,33 a 5,56	0,06
Estadiamento	7,01	1,18 a 41,73	0,03
Embolização vascular	7,86	1,69 a 36,44	<0,01

OR: *odds ratio*; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

5.5 Sobrevida em função da expressão do fator tecidual, densidade microvascular e a presença de metástase.

A sobrevida foi analisada em função da presença de metástase, do fator tecidual e da densidade microvascular em meses através de uma curva de sobrevida cujo desfecho considerado foi o óbito por câncer de boca, que ocorreu em dez situações. Os resultados podem ser observados nas Figuras 7,8 e 9.

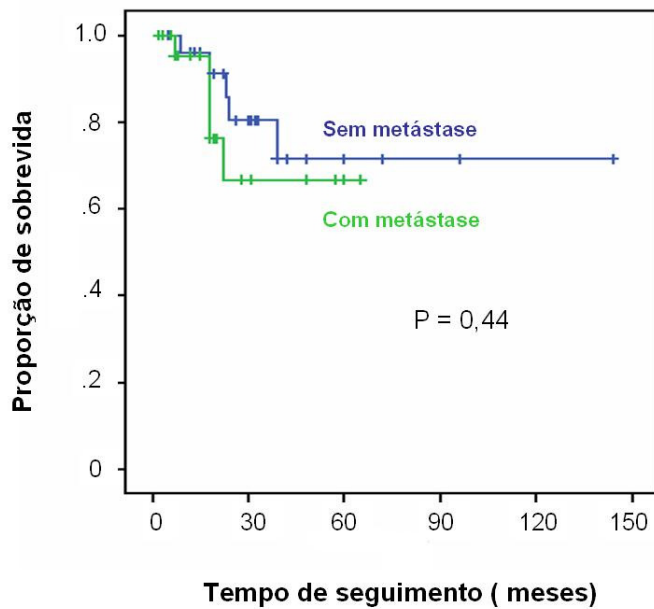


Figura 7 Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada pela presença ou não de metástases.

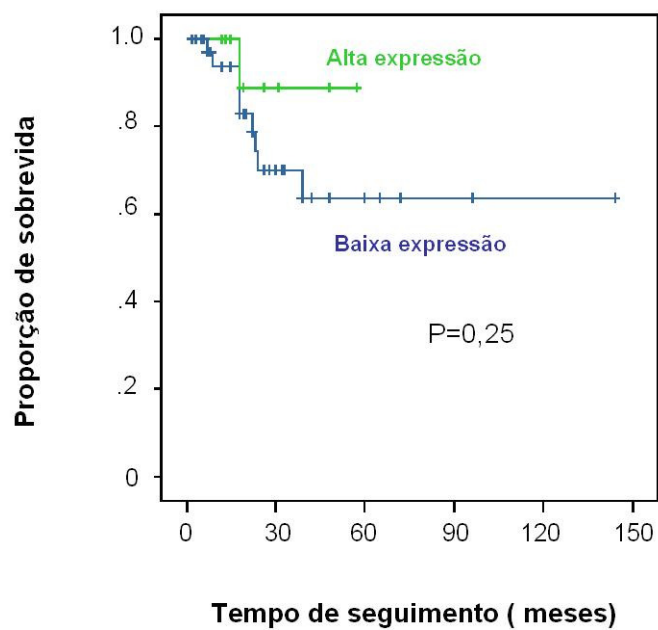


Figura 8: Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada por grupos de baixa e alta expressão do fator tecidual

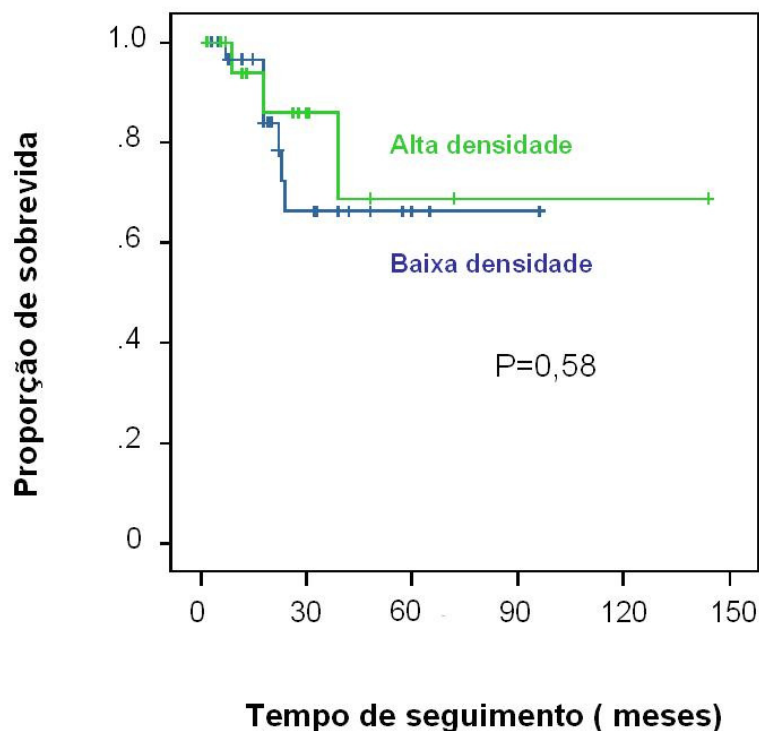


Figura 9 Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada por grupos de baixa e alta densidade microvascular.

O efeito do fator tecidual foi ajustado frente a potenciais fatores de risco para a avaliação da sobrevivência e está mostrado na Tabela 13.

Tabela 13: Modelo de regressão de Cox multivariável ajustando o efeito do fator tecidual [alta expressão] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de óbito.

Variável	RR	IC95%	P
Fator Tecidual [+]	0,26	0,03 a 2,33	0,23
Densidade Microvascular [alta]	1,07	0,26 a 4,42	0,93
Estadiamento clínico III e IV	0,94	0,17 a 5,23	0,95
Embolização vascular	2,56	0,65 a 10,43	0,18

RR: risco relativo; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

6. DISCUSSÃO

A relevância da angiogênese no desenvolvimento de tumores demonstrada por Folkman e colaboradores⁷¹ há mais de 30 anos e as crescentes publicações na literatura mundial ainda revelam resultados controversos em relação ao seu valor prognóstico. Diversos fatores são atribuídos para a ambigüidade dos resultados, como as diferentes metodologias de avaliação microvascular, da vascularização intratumoral e da heterogeneidade biológica do tumor^{88,92}.

Este estudo demonstra pela primeira vez a expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma epidermóide de boca. O estudo, apesar do pequeno número de pacientes, objetivou identificar o fenômeno da angiogênese no sítio primário do tumor e sua associação com o principal fator prognóstico do câncer de boca que é a presença de metástase cervical. Aspectos demográficos, características clínicas e histológicas foram também analisadas e associadas à doença metastática e sobrevida dos pacientes.

A média de idade da amostra foi de 60,2 anos, sendo que 24 (45,3%) dos pacientes apresentavam mais de 60 anos. O envelhecimento da população acarreta um aumento na idade média dos pacientes com câncer, onde 65 a 75% das neoplasias malignas correspondem a pacientes com mais de 65 anos de idade¹⁹¹. O presente estudo não observou um número expressivo de pacientes nesta faixa etária. A idade também não esteve relacionada com a presença de metástase cervical, embora se saiba que os pacientes muito jovens e os idosos desenvolvem tumores com comportamento mais agressivo¹⁹².

O sexo predominante foi o masculino, com uma proporção de 4:1. A tendência de queda na proporção entre homens e mulheres^{7,9} foi observada, havendo uma maior prevalência de pacientes homens em relação às mulheres. Quanto ao gênero não houve

associação com a presença de metástase cervical, o que confirma não ser fator de risco para este tipo de metástase.

A localização mais freqüente foi na língua em 20(37,7%) pacientes. O segundo local de incidência foi na gengiva, quando o esperado seria no assoalho bucal. No presente estudo foram sete pacientes com tumores de gengiva e dois de assoalho. A categorização de 18 pacientes com tumores com mais de uma ou outra localização podem justificar este achado, visto que em oito destes casos havia o envolvimento do assoalho como uma das áreas comprometidas. O lábio e o trígono retro-molar apresentaram comprometimento com uma freqüência correspondente ao descrito na literatura^{25,26}.

Quanto à localização, também não houve associação com a presença de metástases. Os nove pacientes T1 e T2 com carcinoma epidermóide de língua apresentaram metástase em dois casos, enquanto que os demais dez pacientes T1 e T2, classificados como outros locais da boca, apresentaram metástase em seis casos. A localização não apresenta importância quando os tumores são grandes (tumores T3 e T4), pois individualmente já ocasionam alto risco de metástases.

Quanto à classificação T, 24(45,3%) pacientes foram classificados em T1 e T2 e 29(54,7%) pacientes em T3 e T4. Os tumores T3 e T4 foram mais freqüentes caracterizando uma amostra de pacientes com tumores avançados na primeira consulta, concordando com o esperado que seria ao redor de 70%^{26,35}. O T pós-cirúrgico modificou em quatro situações nas quais os pacientes inicialmente classificados no grupo de T1 e T2 passaram para o grupo T3 e T4. Os pacientes agrupados em T3 e T4 não modificaram a classificação no pós-operatório (pT).

Oito (33,3%) dos 24 pacientes T1 e T2 apresentaram metástases histológicas correspondendo ao percentual esperado, que é de 20 a 40%. Quanto aos 29 pacientes T3 e

T4, 17(58,6%) apresentaram metástases concordando com a literatura³⁵. Houve significado estatístico entre o tamanho do tumor e a presença de metástase ($P = 0,05$).

Quanto à classificação N, foram classificados 30(56,6%) pacientes como N- e 23(43,4%) pacientes como N+. O resultado encontrado é superior ao demonstrado na literatura, que é de 21% de pacientes com linfonodos metastáticos na primeira consulta^{2,27,34}. O exame histológico dos linfonodos demonstrou que dos 30 pacientes estadiados como negativos, 7(23,3%) eram falsos negativos e 23(76,7%) verdadeiramente negativos. Quanto aos 23 pacientes N+, o exame histológico revelou que 5(21,7%) pacientes eram falsos positivos e em 18(78,2%) pacientes foi confirmada a presença de metástase cervical. O valor P encontrado foi de 0,001 para a presença de metástase cervical. O número de falsos positivos de 21,7% corresponde ao descrito na literatura, que é de 20%, enquanto que os 23,3% de falsos negativos corresponde à literatura que é de 20 a 35%^{34,54}. A estratificação dos pacientes com metástase não foi estudada neste trabalho, face ao pequeno número de pacientes alocados em cada subdivisão N.

O estadiamento clínico foi significativo na associação com a presença de metástase cervical. Quando é definido o estadiamento de um paciente com carcinoma de boca, está sendo considerado o tamanho do tumor e a presença clínica de metástase pela palpação cervical. Uma vez que os pacientes classificados em N positivo pertencem ao estadiamento III e IV, a significância encontrada não é surpreendente, estando diretamente associada à incidência de falsos positivos e falsos negativos na palpação cervical, que no presente estudo foi de 21,7% e 23,3% respectivamente.

O grau de diferenciação preponderante foi o moderadamente diferenciado correspondendo a 39(73,6%) dos 53 pacientes. A variabilidade de distintos graus de diferenciação em um mesmo tumor e a subjetividade da interpretação por parte do médico patologista pode justificar a maior frequência de tumores moderadamente diferenciados.

A frequência de distribuição quanto ao grau de diferenciação apresenta grande variabilidade na literatura³⁴ e não houve associação com a presença de metástase cervical.

A infiltração de bainhas nervosas esteve associada à presença de metástase. A presença de infiltração de bainha nervosa ocorreu em 17(68%) dos 25 pacientes com metástases, semelhante ao encontrado por Woolgar e colaboradores⁶⁸.

A embolização vascular foi preditiva quanto à presença de metástases. Woolgar e colaboradores⁶⁸ encontraram 78% de invasão vascular nos pacientes N positivos e de 70% de infiltração de bainhas nervosas de uma amostra de 45 pacientes com carcinoma epidermóide de boca. No presente estudo foi encontrado o valor de 60% para invasão vascular e 68% para infiltração nervosa. A afirmação de que a infiltração de bainha nervosa e a embolização vascular ocorrem simultaneamente⁴⁵, não foi observada no presente estudo, visto que ocorreram isoladamente em 14 e seis pacientes respectivamente.

A densidade microvascular é o método mais utilizado para a avaliação da angiogênese. Inicialmente foi padronizado por Weidner⁸⁸ e posteriormente uniformizado por dois consensos internacionais^{92,93}. Apesar disso, dúvidas persistem quanto a metodologia aplicada. Ainda não existem estudos prospectivos que determinem o método de aferição mais adequado para evitar as variações na avaliação subjetiva por observadores diferentes. O controle de qualidade na seleção do material, seu processamento, realização adequada da imunoistoquímica, seleção da área a ser avaliada e técnica de avaliação da DMV são fundamentais para a comparação e a reprodutibilidade dos diferentes estudos em angiogênese.

A análise digital¹⁹³ das imagens neste estudo justifica-se pela tentativa de diminuir as dificuldades metodológicas na aferição da densidade microvascular, as quais podem resultar em variações de resultados quando interpretadas por observadores diferentes. A

capacidade do programa utilizado de capturar as imagens do microscópio pelo computador permite o armazenamento, a contagem dos vasos e a discussão sobre a avaliação da angiogênese com imagens padronizadas e com a aplicação de grades de demarcação que facilitam e retiram fatores subjetivos da avaliação. O único elemento não objetivo que permanece na apreciação é a seleção das áreas mais vascularizadas (*hot spots*)¹⁵⁶.

Quanto ao marcador de angiogênese utilizado, podem ser feitas algumas considerações. Além dos poucos trabalhos comparando anticorpos marcadores, é questionado o que estaria este anticorpo marcando, pois há dúvidas se uma simples célula endotelial marcada representaria um vaso verdadeiro e se este vaso seria capaz de gerar metástase, visto que os vasos tumorais tem formato aberrante, sem um lúmen claro, tortuosos e com largos espaços entre as células endoteliais^{108,55}. O anti-FVIII tem a capacidade de identificar vasos maduros e imaturos⁹⁶. O anti-CD105 parece ser um marcador promissor, porém poucos estudos o utilizam. Os anticorpos mais utilizados atualmente para a avaliação da DMV são o anti-CD31 e o anti-CD34. A escolha neste estudo do anticorpo anti-CD34, deve-se à possibilidade de erros na avaliação com o anticorpo anti-CD31, que ocorrem quando áreas com infiltrados inflamatórios proeminentes são interpretadas erroneamente como *hot spots*⁶⁵.

A literatura apresenta resultados distintos quanto a expressão da densidade microvascular conforme o órgão e a neoplasia estudada. No câncer de cabeça e pescoço existem poucos estudos de densidade microvascular especialmente associada com a presença de metástase.

Na presente pesquisa a média do número de vasos encontrada foi de 18,47 e ocorreu uma grande variabilidade entre os pacientes do estudo. A média do número de vasos observada nos trabalhos publicados também é variável o que dificulta estabelecer

um ponto de corte⁷⁸. Houve uma predominância de pacientes cujo tumor primário expressou uma baixa densidade microvascular quando comparado aos pacientes que expressaram uma alta densidade de vasos. As questões técnicas da imunohistoquímica, período da retirada do tumor até o emblocamento, o tempo que o material está emblocado, os distintos marcadores de angiogênese, a seleção e o número de *hot spots*, podem justificar a variabilidade do número de vasos encontrado entre os estudos.

A expressão da densidade microvascular não esteve associada à presença de metástase. Na literatura, a associação entre a expressão da densidade microvascular e a presença de metástase cervical é ambígua. Alguns pesquisadores encontraram associação com a DMV e a presença de metástase cervical^{8,125,127,128,129,132,133,134}, enquanto outros não encontraram a mesma associação^{135,1,37,139,140,141}. Todas estas pesquisas foram de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, o que permite concluir que ainda não há definição quanto a associação da DMV com a presença de metástase e a sobrevida dos pacientes. Os resultados são contraditórios e os motivos mais uma vez podem ser: diferenças de expressão da DMV nas diferentes regiões da cabeça e pescoço, o estado da peça cirúrgica, como o emblocamento e o tempo no formol até ser fixado, o ponto de corte para definir o que é alta densidade microvascular e uma metodologia padrão de leitura com graus de subjetividade na interpretação.

Da mesma forma, o estudo da DMV na análise multivariada não demonstrou correlação entre esta variável e a ocorrência de metástases cervicais ou sobrevida. Estes achados contrariam os de Kyzas e colaboradores que descreveram a DMV como fator de prognóstico independente¹⁸⁹.

A identificação de outras moléculas envolvidas no processo da angiogênese pode contribuir para compreender quais são os mecanismos responsáveis pela angiogênese no câncer de cabeça e pescoço. O fator tecidual tem sido pesquisado em outros tipos de

câncer, especialmente o câncer gástrico¹⁸³, de próstata¹⁶⁷ e de colo-retal¹⁷⁰⁻¹⁷², porém a literatura é carente de estudos na sua associação com o câncer de cabeça e pescoço, o que incentivou a realização desta pesquisa.

No câncer de cabeça e pescoço somente dois trabalhos existem pesquisando o fator tecidual^{187,188}, sendo este o primeiro a pesquisá-lo em câncer de boca. Nos trabalhos anteriores, Callander e colaboradores¹⁸⁷ pesquisaram a expressão do fator tecidual em sete pacientes com tumores em diferentes localizações na cabeça e no pescoço. Os autores descreveram a expressão do fator tecidual em todos os pacientes sem quantificá-lo. Wojtukiewicz e colaboradores¹⁸⁸, estudando laringes excisadas, encontraram alta expressão do fator tecidual, diferente ao resultado deste estudo no qual somente 13(24,5%) pacientes tiveram alta expressão do fator tecidual.

O fator tecidual não esteve associado a presença de metástase cervical na presente pesquisa. Existem poucas pesquisas que associaram a presença do FT com a doença metastática. Seto e colaboradores¹⁷⁰ em carcinomas colo-retais encontraram associação do FT com a presença de metástases e a sobrevida dos pacientes. Consideraram em sua pesquisa, que o FT e o estadiamento seriam fator de prognóstico independente. You JL e colaboradores¹⁴² também encontraram associação do FT com a presença de metástases linfáticas e no fígado de pacientes com neoplasia de cólon. Versteeg H e colaboradores¹⁵² também encontraram maior expressão do fator tecidual em paciente com doença metastática.

Kaido e colaboradores¹⁷³ em carcinoma hepato-celular identificaram maior expressão do FT em pacientes com metástases e com fenômenos trombo-embólicos.

Akashi e colaboradores¹⁷⁸ no adenocarcinoma de próstata encontraram associação entre a forte expressão do FT com doença metastática.

Wang e colaboradores¹⁸¹ em neoplasia de ovário também encontraram associação do FT com a presença de doença metastática.

As pesquisas que encontraram associação entre a presença do FT e doença metastática foram realizadas em pacientes com neoplasias de origem glandular, onde comparadas às neoplasias epiteliais são mais frequentes os fenômenos trombo-embólicos. No presente estudo, o FT foi pouco expresso nos tumores primários e não foi fator de proteção para o desenvolvimento de doença metastática. A literatura revela que a associação do FT à presença de doença metastática foi identificada na sua grande maioria em pacientes com adenocarcinomas sendo fraca esta associação em pacientes com carcinomas epidermóides. Koomagi e Volm¹⁶⁹ também não encontraram associação do FT com doença metastática em carcinomas de pulmão.

A associação do fator tecidual e a densidade microvascular não foi observada neste estudo, contrariando o resultado de Carvalhal¹⁷⁷ em câncer de próstata, Poon e colaboradores em carcinomas hepatocelulares¹⁷² e Koomagi e colaboradores em carcinomas de pulmão¹⁶⁹. Talvez outros mecanismos estejam presentes, tanto para incrementar a progressão dos tumores quanto para estimular a produção de vasos sanguíneos¹⁷⁰.

A análise da sobrevida quanto à presença de metástase, revela que os pacientes com metástase cervical não apresentaram menor sobrevida, opondo-se ao significado da metástase cervical como fator prognóstico no câncer de boca⁴⁰⁻⁴³. Este resultado inesperado pode ser justificado pelo tamanho da amostra com excessivo número de pacientes sem acompanhamento que embora censurados na análise, são pacientes em estadiamento avançado e conseqüentemente com elevado risco de óbito. A busca de notícias destes pacientes poderia dirimir esse viés, porém a análise da sobrevida não era o objetivo principal deste estudo.

A angiogênese do tumor e a resultante disseminação metastática são eventos multifatoriais dependentes de um balanço estrito entre agentes pró-angiogênicos e anti-angiogênicos¹⁰⁶. Outros mecanismos e interações precisam ser esclarecidos, eventualmente com séries maiores de pacientes, para que se possa ampliar a compreensão sobre a regulação de mecanismos de coagulação por neoplasias malignas e seu efeito sobre a produção de vasos sanguíneos e sobre a evolução da doença.

O presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa do Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Clínica Cirúrgica, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que estuda a angiogênese e marcadores tumorais em espécimes de neoplasias de cabeça e pescoço, de próstata, de cólon, de bexiga e de estômago. Especula-se que, confirmando sua importância na gênese desses tumores, o fator tecidual possa ser estudado como marcador sérico e urinário nos pacientes com essas neoplasias. Os trabalhos iniciais objetivam lançar as bases para tais pesquisas, sendo este estudo em paciente com câncer de boca o único da linha de pesquisa em carcinomas epidermóides.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- a. O fator tecidual e a densidade microvascular não estão associados à ocorrência de metástases cervicais no carcinoma epidermóide de boca.
- b. A presença de embolização vascular, a infiltração neuronal e o estadiamento clínico foram os fatores mais significativos como preditivos de metástases cervicais nos casos estudados.
- c. O fator tecidual, a densidade microvascular e a presença de metástases cervicais não foram determinantes da sobrevida dos pacientes estudados.

8. LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CM: Centímetro

CT: Tomografia Computadorizada

DAB: Diaminoazobenzidina

DMV: Densidade Microvascular

ICG: Grau de invasão celular

FT : Fator Tecidual

FVIII: Fator VIII

FVIIa: Fator VII ativado

H₂O₂: Água Oxigenada

IC: Intervalo de confiança

MM: Milímetro

N+: Presença clínica de metástases ganglionares

N- : Ausência clínica de metástases ganglionares

N0: Ausência de metástases ganglionares na classificação TNM

OR: Odds ratio

RM: Ressonância Nuclear Magnética

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PSA: Antígeno prostático

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TIFF: True Image Format File

TNM : “Tumor, node, metastases”; Tumor, Nódulos linfáticos e metástases.

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson SD. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 2002. p 1273-1290.
2. Shaha A, Spiro R, Shah J, Stron E. Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg* 1984; 148:455-459.
3. Russolo M, Giacomarra V, Papanikolla L, Tirelli G. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. *Laryngoscope* 2002;112:449-452.
4. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad. Med. J.* 2005;81:236-242.
5. Zacharski L, Henderson W, Rickles F, Forman W, Cornell C, Forcier R, et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer*. 1984; 53 (10):2046-52.
6. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2006. Capturado da Internet em 26/11/2007. Disponível em [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br).
7. Gloecker Ries L. SEER cancer statistics review, 1973-1991. Bethesda MD: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Cancer Institute 1994. Report no. NIH-94-2789.
8. Ascani G, Balercia P, Messi M, et al. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2005;25:13-17.
9. Kleimann D. Cancers of the oral cavity and pharynx: a statistics review monograph, 1973-1987, Atlanta: US Department of Health and Human Service, Public Health Service, Central for Disease Control, 1991.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette smoking among adults- United States, 1992, and changes in the definition of current cigarette smoking. *MMWR* 1994;43:343-6.
11. Blot W, McLaughlin J, Winn D. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3283-7.
12. Boyle P, Macfarlane G, Maisonneuve P. Epidemiology of mouth cancer in 1989. A review. *JR Soc Med* 1990;83:724-30.
13. US Department of Health and Human Services. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. A report of the Surgeon General. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 1989. DHHS publication no.(CDC)89-8411.

14. US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking cancer. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Smoking and Health, 1982. DHHS publication no.(PHS) 82-50179.
15. Neville B, Day T. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *Cancer J. Clin.* 2002;52:195-215.
16. Day G, Blot W. Second primary tumors in patient with oral cancer. *Cancer* 1992;70:4-9.
17. Jones A. Second primary tumors in patient with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;75:1343-53.
18. Silverman S Jr., Lozada F. Oral leukoplaquia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;53:563-8.
19. Waldrom C, Shafer W. Leukoplakya revisited. A clinicopathologic study of 3,256 oral leukoplakyas. *Cancer* 1975;36:1386-92.
20. Mincer H, Coleman S, Hopkins K. Observations on the clinical characteristics of oral lesions showing histologic epithelial dysplasias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33:389-99.
21. Shafer W, Waldron C. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer* 1975; 36:1021-8
22. Million R, Cassisi N. Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach. 2 nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1993;p 599-626.
23. Hansen L, Silverman S Jr. Proliferative verrucose leukoplaquia: a long term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 60:285-98.
24. Ackerman L. Verrucous carcinoma of the oral cavity. *Surgery* 1948,23:670-8.
25. Vokes E, Weichselbaum R, Lippman S, Hong W. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-94.
26. Henk and Langdon. Malignant Tumours of the Oral Cavity. London: Edward Arnold; 1985. p 43-45.
27. Frazell E, Lucas J Jr. Cancer of the tongue: report of the management of 1554 patients. *Cancer* 1962;15,1085-1099.
28. Hoffman D, Hecht S. Advances in tobacco carcinogenesis. In: Grover P, ed. Handbook of experimental pharmacology. New York:Springer-Verlag;1989. p.34-38.
29. Franceschi S. Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 1990;50:6502-7.

30. Kremer M, Lesch C, Squaier C. Effect of alcohol on mucosal penetration of tobacco carcinogens. *J Dent Res* 1991;70:595.
31. Wald R, Calcaterra T. Lower alveolar carcinoma. Segmental v. marginal resection. *Arch Otolaryngol* 1983;109:578.
32. American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Manual*. 6th ed. Philadelphia:Lippincott-Raven; 2002.
33. Merino O, Lindeberg R, Fletcher G. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1977;40:147-9.
34. Carter L. Patterns and mechanisms of spread of squamous carcinomas of the oral cavity. *Clinic Otolaryngology* 1990; 15:185-191.
35. Jones A. Prognosis in Mouth Cancer: Tumor Factors. *Oral Oncol, Eur J Câncer* 1994;Vol.30B, 8-15.
36. Schwartz L, Ozsahin M, Zhang G. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. *Cancer* 1994;74:1933-8.
37. Castelijns J. Diagnostic radiology of head and neck oncology. *Curr Opin Oncol* 1991;3:512-8.
38. Van den Brekel M, Castelijns J, Snow G. The role of modern imaging studies in staging and therapy of head and neck neoplasms. *Semin Oncol* 1994;21:340-7.
39. Don D, Anzai Y, Luffkin R, Fu Y, Calcaterra T. Evaluation of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1995; 105:669-674.
40. Spiro R, Alfonso A, Farr H, Stron E. Cervical node metastases from epidermoid carcinoma of the oral cavity or oropharynx: a critical assessment of current staging. *Am J Surg* 1974;128,562-567.
41. Hibbert J, Marks N, Winter P, Shaheen O. Prognostic factors in oral carcinoma and their relation to clinical staging. *Clin Otolaryng* 1983;8:197-203.
42. Hiratsuka H. Multivariate Analysis of Occult Lymph Node Metastasis as a Prognostic Indicator for Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer* 1997; 80:351-356.
43. Russolo M, Giacomarra V, Papanikolla L, Tirelli G. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. *Laryngoscope* 2002;112:449-452.
44. Mohit-Tabatabai M. Relation of Thickness of Floor of Mouth Stage I and II Cancers to Regional Metastasis. *The American Journal of Surgery* 1986;152:351-353.

45. Woolgar J, Path M, Scoot J, Path F. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head & neck* 1995;17:463-472.
46. DiTroia J. Nodal metastases and prognosis in carcinoma of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am* 1972;5:333-342.
47. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factor for late cervical metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck*. 2002; 24:731-736.
48. Yuen A, Lam K, Wei W, Lam K, Ho C, Chow T and Yuen W. A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am.J.Surg.* 2000;180:139-143.
49. Hosal A, Unal O and Ayhan A. Possible prognostic value of histopathologic parameters in patients with carcinoma of the oral tongue. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1998;255:216-219.
50. Lim S, Zhang s, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho J and Ochiai A. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue. *Clinical Cancer Res.* 2004;10:166-172.
51. Hermanek P, Hutter R, Sobin L, Wittekind C. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999;86:2668-2673.
52. Stoeckli S, Pfaltz M, Steinert H, Schmid S. Histopathological Features of Occult Metastasis Detected by Sentinel Lymph Node Biopsy in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope* 2002;112:111-115.
53. Ambrosch P, Brinck U. Detection of Nodal Micrometastases in Head and Neck Cancer by Serial Sectioning and Immunostaining. *Oncology* 1996;10:1221-1225.
54. Van den Brekel M. Micrometastases from squamous cell carcinoma in neck dissection specimens. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992;249:349-353.
55. Ferlito A, Rinaldo A. False Negative Conventional Histology of Lymph Nodes in Patients with Head and Neck Câncer. *Head and Neck Cancer* 2000;62:112-114.
56. Hamkawa H, Takemura K, Sumida T, Kayahara K, Tanioka H, Sogawa K. Histological study on pN upgrading of oral cancer. *Virchows Arch* 2000;437:116-121.
57. Enepekides D, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Black M, Rochon L. Occult Cervical Metastases: Immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1999;120:713-717.
58. Ali S, Tiwari R, Snow G. False-positive and False-negative neck nodes. *Head and Neck Surgery* 1985;8:78-82.

59. Van den Brekel M, Castelijns J, Stel H, Luth W, Valk J, Van der Waal I, Snow G. Occult Metastatic Neck Disease: Detection with US and US – guided Fine-Needle Aspiration Cytology. *Radiology* 1991;180:457-461.
60. Van den Brekel M, Castelijns J, Stel H, Golding RP, Meyer CJL, Snow GB. Modern Imaging techniques and Ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study. *Eur Arch of Oto-Rhino-Laryngology* 1993;250:11-17
61. Van den Brekel M, Castelijns J, Croll G, Stel H. Magnetic resonance imaging vs palpation of cervical lymph node metastasis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:666-673.
62. Broders A. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am* 1941;21:947.
63. Thomson S. The history of cancer of the larynx. *J. Laryngol* 1939;54:61-87.
64. Carter L, Barr L, O'Brien C & Bliss J. Prognostic implications of perineural spread in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1986;96:1145-1148.
65. Crissman J, Gluckman J, Hiteley J, Quenelle D. Squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Head Neck Surg* 1980;3:2-7.
66. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabellsteen E. New malignancy grading is better prognostic indicator than Broders grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18:432-437
67. Hogmo A, Kuylenskierna R, Lindholm J and Munck-Wikland E. Predictive value of malignancy grading systems, DNA content, p53, and angiogenesis for stage I tongue carcinomas. *J.Clin. Pathol.* 1999;52:35-40.
68. Woolgar J, Path M, Scoot J, Path F. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head & Neck* 1995;17:463-472.
69. Sotirou C, Lothaire P, dequanter D, Cardoso F and Awada A. Molecular profiling of head neck tumors. *Current Opinion in Oncology.* 2004;16:211-214
70. Chimenos-Küstner E, Font-Costa I, López-López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Méd Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9:377-84.
71. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene.*2000;19:6122-6129.
72. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
73. Folkman J. Anti-angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. *Ann. Surg.* 1972;175:409-416.

74. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29:15-18.
75. Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407:249-57.
76. Belting M, Dorrel M, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 2004; 10:502-9.
77. Tandle A, Blazer D and Libutti S. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *Journal of translational medicine.com.* 2004;2-22.
78. Hasina R, Lingen M. Angiogenesis in Oral Câncer. *Journal of Dental Education.* 2001;65:1282-90.
79. Jones A, Harris A. New developments in angiogenesis: A major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am.* 1998 jul-aug;4(4):209-17.
80. Poon R, Fan S, Wong J. A target for Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Ann. Surg.* 2003;238:9-28.
81. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):253-70.
82. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992; 359 (6398): 843-5.
83. O'Reilly M, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med.* 1996 Jun;2(6):689-92.
84. Chan J. Advances in immunohistochemistry: Impact on surgical pathology practice. *Seminars in diagnostic pathology.* 2000. 17(3):170-177.
85. Hayes A, Li L, Lippman M. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *BMJ.* 1999;318:853-56.
86. Yu J, May L, Klement P, Weitz J, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb. Hemost.* 2004;30(1):21-30.
87. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J. Pathol.* 1995; 147(1):9-19.
88. Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8.
89. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M, Squartini F, Angeletti C. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 1992; 340(8812):145-6.

90. Weidner N, Carroll P, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1993; 143(2):401-9.
91. Erenoglu C, Akin M, Uluutku H, Tezcan L, Yildirim S, Batkin A. Angiogenesis predicts poor prognosis in gastric carcinoma. *Dig Surg.* 2000;17(6):581-586
92. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of Angiogenesis in Solid Human Tumours: an International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation. *Eur J Cancer.* 1996; 32A:2474-2484.
93. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Colpaert C, Marson L, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer.* 2002;38: 1564–1579.
94. Hannen E, Riediger D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *Int. J Oral Maxillofac. Surg.* 2004;33:2-7.
95. Offersen B, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma. *Cancer*;91:1500-09.
96. Laitakari J, Näyha V, Stenbäck F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumor development. *J. Clin. Pathol.* 2004;57:394-401
97. Weidner N, Pozza F, Bevilacqua P, Allred E, Moore D, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Institute* 1992;84:1875-87.
98. Wild R, Ramakrishnan S, Sedgewick J, Griffioen A. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. *Microvasc Res* 2000;59(3):368-76.
99. Graham C, Rivers J, Kerbel R, Stankiewicz K, White W. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol.* 1994;145(3):510-4.
100. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2195-2200.
101. Igarashi M, Dhar, Kubota H, et al. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 1998;82:1225-1232.
102. Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T, et al. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery.*2001;129:302-308.

103. Torres C, Wang H, Turner J, et al. Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barret's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 1999;30:753-758.
104. Choi JY, Jang K, Shim Y, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with positron emission tomography. *Annals of surgical oncology.* 2006;13(8):1054-1062.
105. Maeda K, Chung Y, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1995;13:477-481.
106. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *Cancer.* 1996;77:858-63.
107. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:2671-2676.
108. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1997 Feb;15(2):826-32.
109. Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Mabuchi H, Hara H, Sako S, et al. Prognostic value of tumor cell proliferation and intratumor microvessel density in advanced gastric cancer treated with curative surgery. *Int J Oncol.* 1998;13:255-259.
110. Che X, Hokita S, Natsugoe S, et al. Tumor angiogenesis related to growth pattern and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Chin Med J (engl).* 1998;111:1090-1093.
111. Takahashi Y, Cleary K, Mai M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1679-1684.
112. Xiangoming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, et al. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 1998;5:585-589.
113. Frank R, Saclarides T, Leurgans S, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann. Surg.* 1995;222:696-699.
114. Takahashi Y, Tucker S, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node negative colon cancer. *Arch Surg.* 1997;132:541-546.

115. Ohe H, Tanaka S, Kitadai Y, et al. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:1129-1136.
116. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 1996;78:226-231
117. Engel C, Bennett S, Chambers A, et al. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for dukes staging. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1260-1265.
118. Vermeulen P, Van de Eyden G, Huget P, et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1999;79:316-322.
119. Ishikawa H, Fujii H, Yamamoto K, et al. Tumor angiogenesis predicts recurrence with normal serum carcinoembryonic antigen in advanced rectal carcinoma patients. *Surg Today*. 1999;29:983-991.
120. Sternfeld T, Foss H, Kruschewski M, et al. The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 1999;14:272-276.
121. Pietra N, Sarli L, Caruana P, et al. Is tumor angiogenesis a prognostic factor in patients with colorectal cancer and no involved nodes? *Eur J Surg*. 2000;166:552-556.
122. Cianchi F, Palomba A, Messerini L, et al. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2002;9:20-26.
123. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, et al. Intratumoral microvessel density and p 53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1993;55:739-744.
124. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:587-596
125. Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. 1996;122(8):865-8.
126. Williams J, Carlson G, Cohen C, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. 1994;168(5):373-80.
127. Shintani S, Rafael A, Yoshihama Y, et al. Immunohistochemical detection of microvessels in oral squamous cell carcinomas. *Japanese Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 1994;40:645-650.

128. Penfold C, Partridge M, Rojas R, Langdon J. The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1996;34(1):37-41.
129. Kyzas P, Stefanou D, Batistou A. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:624-630.
130. Kyzas P, Agnantis N, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2006;448(6):768-75.
131. Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD105 microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol.* 2005;41(2):147-55.
132. Murray J, Carlson G, McLaughlin K, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Am J Surg.* 1997;174(5):523-6.
133. Lopez-Graniel C, Tamez de Leon D, Meneses-Garcia A, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001;20(4):463-8.
134. Chien CY, Su CY, Hwang CF, et al. Clinicopathologic significance of CD105 expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Head Neck.* 2006;28(5):441-6.
135. Hannen EJ, Van de Laak J, Manni J, et al. Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasized and nonmetastasized squamous cell carcinomas of the tongue. *Head Neck.* 2002;24(7):643-50.
136. Herbst C, Kosmehl H, Stiller K, et al. Evaluation of microvessel density by computerized image analysis in human renal cell carcinoma. Correlation to pT category, nuclear, grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124:141-147.
137. Gleich L, Biddinger P, Pavelic Z, Gluckman J. Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma: role in predicting tumor aggressiveness. *Head Neck.* 1996;18(4):343-6.
138. Gleich L, Biddinger P, Duperier F, Gluckman J. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck.* 1997;19(4):276-80.
139. Leedy D, Trune D, Dronz J, Weidner N, Cohen J. Tumor angiogenesis, the p53, and cervical metastasis ins squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngology head neck surgery.* 1995;111:417-22.
140. Amar A, Giovanini F, Carvalho M, Rapaport A, e cols. Densidade microvascular no carcinoma de língua. *Rev. Assoc Med Bras.* 2002;48(3):204-8.

141. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1997;33(5):369-74.
142. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz J, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood.* 2005;105:1734-1741.
143. Rickles F, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res.* 2001; 102(6): V215–24.
144. Rickles F, Patierno S, Fernandez P. Tissue factor, thrombin and cancer. *Chest.* 2003; 124:58S-68S.
145. Prandoni P, Lensing A, Buller H. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1128-33.
146. Rickles F, Levine M. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.* 2001; 106: 6-12.
147. Sorensen H, Mellekjaer L, Olsen J, Baron J. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2000; Dec 21;343(25):1846-50.
148. Carmeliet P, Collen D. Molecules in focus: tissue factor. *Int J Biochem & Cell Biol.* 1998; 30: 661-7.
149. Daly M, Makris A, Reed M, Lewis C. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: A source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *Journal of the national cancer institute.* 2003;95(22):1660-73.
150. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *The faseb journal.* 1995;9:883-889.
151. Osterud B. Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost.* 1997; Jul 78 (1):755-8.
152. Versteeg H, Spek C, Peppelenbosch M, Richel D. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Molecular medicine.* 2004;10:1-6.
153. Versteeg H, Peppelenbosch, Spek C. Tissue factor signal transduction in angiogenesis. *Carcinogenesis.*2003;24:1009-1013.
154. Banner D. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost.* 1997; 78(1):512-5.
155. Beerepoot L, Mehra N, Linschoten F, et al. Circulating endothelial cells in cancer patients do not express tissue factor. *Cancer Letters.* 2004;213:241-248.
156. Toneto M. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no câncer gástrico: correlação com fatores prognósticos e

- sobrevida. 2006. Tese (Doutorado em PPG em Medicina e Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina da PUCRS.
157. Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5): 1374–81.
 158. Fernandez P, Patierno S, Rickles F. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30(1):31-44.
 159. Toomey J, Kratzer K, Lasky N, Stanton J, Broze G Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood.* 1996; 88:1583–1587.
 160. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996; 380:439–442
 161. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Van Vlaenderen P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development *Nature.* 1996; 383: 73-5.
 162. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldher R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 1994; 94:1320–1327.
 163. Rickles F, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol.* 2001; 73(2): 145–50.
 164. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S, Andrassy M, Chen B, Stern D, et al. Tissue factor—a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001; 86(1):334–45.
 165. Nash G, Walsh D, Kakkar A. The role of the coagulation system in tumor angiogenesis. *Lancet Oncol.* 2001; 2(10): 608–13.
 166. Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff J, et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost.* 1998; 80:598-602.
 167. Abdulkadir S, Carvalhal G, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey P, Catalona W, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol.* 2000; 31(4): 443–7.
 168. Vrana J, Stang M, Grande J, Getz M. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation

- by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res.* 1996; 56(21): 5063–70.
169. Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer.* 1998;79(1):19–22.
 170. Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer.* 2000; 88(2): 295–301.
 171. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza E, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol.* 2002; 69(4): 247–54.
 172. Poon R, Lau C, Ho J, Yu W, Fan S, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 1;9(14):5339-45.
 173. Kaido T, Oe H, Yoshikawa A, Mori A, Arii S, Imamura M. Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. *Hepatology* 2005;52(65):1383-7
 174. Khorana A, Fine R. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol.* 2004;5(11):655-63.
 175. Kakkar A, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Lemoine N, Williamson R. A characterization of the coagulant and fibrinolytic profile of human pancreatic carcinoma cells. *Haemostasis.* 1998; 28: 1-6.
 176. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer.* 1996; 77(9): 1877–83.
 177. Carvalhal G. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata de humanos: correlação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.
 178. Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 2003; 62(6):1078-82.
 179. Contrino J, Hair G, Kreutzer D, Rickles F. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nature Med.* 1996; 2:209-15.
 180. Abe K, Shoji M, Chen J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:8663-68.

181. Wang X, Wang E, Kavanagh J, Freedman R. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med.* 2005; 21:3-25.
182. Chinen K, Kazumoto T, Ocurra Y, Matsubara O, Tsuchiya E. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy caused by a gastric carcinoma expressing vascular endothelial growth factor and tissue factor. *Pathology International.* 2005;55:27–31.
183. Jiao Z, Gou C, Cao N, Li Y. Correlation of tissue factor expression to angiogenesis of gastric carcinoma and its clinical significance. *Chin J Cancer.* 2005; 24 (7): 880-4.
184. Zhang J, Ding J, Zhang X, Shao X, Hao Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) production and angiogenesis by tissue Factor (TF) in SGC-7901 gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2005; Jul,4(7):769-72.
185. Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:8161–8166.
186. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res.* 2001; 61:711–716.
187. Callander N, Varki N, Rao VM. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer.* 1992; 70: 1194-1201.
188. Wojtukiewicz M, Zacharski L, Rucinska M, et al. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb Haemost.* 1999;82:1659-62.
189. Kyzas P, Cunha I, Ioannidis J. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical cancer research.* 2005,11:1434-1440.
190. Gundersen H et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96:379-394.
191. Yancik R, Ries L. Aging and cancer in America. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14(1):17-23.
192. Carvalho F, Papaleo N. Geriatria, fundamentos, clínica e terapêutica. São Paulo: Atheneu; 1994. p 9-30.
193. Tarta C, Silva V, Teixeira C, Prolla J, Meurer L, Chiele Neto C, Tanaka S . Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004 Aug;26(4):201-6.

ANEXOS

1 - Características dos 53 pacientes estudados

Paciente	Idade	Fator Tecidual	Densidade Microvascular	Sexo*	Localização**	Tumor-T	Nódulo -N	p.Tumor	pNódulo
1	64	1	14,9	M	Outra	T3-T4	N0	pT3-T4	pN2
2	50	1	47,8	M	Retro-molar	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
3	53	1	14,45	M	Língua	T1-T2	N2	pT1-T2	pN0
4	57	1	10,25	M	Lábio	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
5	55	1	47,15	M	Língua	T3-T4	N1	pT3-T4	pN0
6	56	1	43,5	M	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN2
7	55	1	19,5	M	Outra	T1-T2	N3	pT1-T2	pN3
8	59	2	16	M	Outra	T3-T4	N1	pT3-T4	pN2
9	67	1	16,6	M	Língua	T3-T4	N1	pT3-T4	pN2
10	78	1	19	M	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN2
11	70	1	8,1	F	Língua	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
12	53	1	9	M	Outra	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
13	58	1	8,9	M	Outra	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
14	51	3	17,4	F	Retro-molar	T1-T2	N0	pT3-T4	pN2
15	45	2	11,2	M	Língua	T3-T4	N2	pT3-T4	pN2
16	70	1	17,05	M	Assoalho	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
17	56	1	13,7	M	Outra	T1-T2	N2	pT1-T2	pN2
18	76	1	8,7	M	Língua	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
19	72	2	10,15	M	Gengiva	T3-T4	N1	pT3-T4	pN2
20	47	1	14,75	M	Outra	T1-T2	N0	pT3-T4	pN0
21	65	1	30,15	M	Língua	T1-T2	N0	pT3-T4	pN0
22	52	1	11,38	M	Outra	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
23	68	3	19,4	M	Gengiva	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
24	87	2	15,4	F	Gengiva	T1-T2	N1	pT1-T2	pN0
25	82	1	23,4	M	Gengiva	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
26	72	1	10,75	F	Retro-molar	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
27	72	1	18,85	M	Outra	T1-T2	N1	pT1-T2	pN1
28	55	0	11,15	M	Retro-molar	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
29	49	2	25,65	M	Gengiva	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
30	68	1	26,1	M	Outra	T3-T4	N1	pT3-T4	pN2
31	69	1	16,85	M	Outra	T3-T4	N2	pT3-T4	pN2
32	66	1	12,6	M	Retro-molar	T1-T2	N1	pT1-T2	pN1
33	46	1	15,85	M	Outra	T3-T4	N0	pT3-T4	pN1
34	47	1	5,2	M	Língua	T1-T2	N1	pT1-T2	pN1
35	50	0	19,3	M	Gengiva	T3-T4	N1	pT3-T4	pN0
36	59	3	16,65	F	Língua	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
37	40	3	16,7	M	Assoalho	T3-T4	N2	pT3-T4	pN2
38	65	3	15,95	M	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
39	63	1	8,7	M	Língua	T3-T4	N1	pT3-T4	pN2
40	73	3	23,65	F	Língua	T3-T4	N1	pT3-T4	pN1
41	46	3	20,2	M	Língua	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
42	52	3	14,75	M	Outra	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
43	70	0	4	M	Gengiva	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
44	82	4	17	F	Outra	T3-T4	N3	pT3-T4	pN3
45	44	3	33,5	M	Língua	T1-T2	N1	pT3-T4	pN0
46	60	1	19,1	F	Língua	T1-T2	N0	pT1-T2	pN1
47	46	3	20,15	F	Outra	T1-T2	N0	pT1-T2	pN0
48	47	1	11,6	F	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN2
49	54	3	18,3	M	Outra	T1-T2	N3	pT1-T2	pN3
50	70	3	47,35	F	Retro-molar	T3-T4	N1	pT3-T4	pN1
51	49	2	20,5	M	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0
52	72	1	21,4	F	Outra	T3-T4	N3	pT3-T4	pN3
53	58	1	19,85	M	Língua	T3-T4	N0	pT3-T4	pN0

* Sexo: M (masculino) e F (feminino)

** Localização: Outra localização, mais de uma localização, ou extensão para a orofaringe

2 - Características dos 53 pacientes estudados

Paciente	Idade	Fator Tecidual	Densidade Microvascular	Estadiamento	Diferenc. Celular*	Embolização Vascular	Infiltração Nervosa.	Radiot.	Sobrevida**
1	64	1	14,9	III e IV	2	Sim	Sim	Sim	4(3)
2	50	1	47,8	I e II	2	Não	Sim	Não	3(144)
3	53	1	14,45	III e IV	1	Não	Não	Sim	3(48)
4	57	1	10,25	I e II	2	Não	Não	Não	4(22)
5	55	1	47,15	III e IV	1	Não	Não	Não	4(6)
6	56	1	43,5	III e IV	1	Não	Sim	Sim	4(7)
7	55	1	19,5	III e IV	1	Sim	Sim	Não	4(2)
8	59	2	16	III e IV	2	Sim	Sim	Sim	3(60)
9	67	1	16,6	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	1(22)
10	78	1	19	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	4(6)
11	70	1	8,1	I e II	1	Não	Sim	Não	4(5)
12	53	1	9	I e II	1	Não	Sim	Sim	4(33)
13	58	1	8,9	III e IV	1	Sim	Sim	Não	3(96)
14	51	3	17,4	I e II	2	Sim	Não	Não	2(18)
15	45	2	11,2	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	4(8)
16	70	1	17,05	I e II	0	Não	Não	Não	4(6)
17	56	1	13,7	III e IV	1	Sim	Não	Sim	3(65)
18	76	1	8,7	I e II	2	Não	Sim	Não	3(60)
19	72	2	10,15	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	1(18)
20	47	1	14,75	I e II	1	Não	Não	Sim	1(23)
21	65	1	30,15	I e II	1	Não	Sim	Não	4(12)
22	52	1	11,38	I e II	1	Não	Não	Não	3(32)
23	68	3	19,4	I e II	1	Não	Não	Não	3(31)
24	87	2	15,4	III e IV	1	Não	Não	Não	1(18)
25	82	1	23,4	III e IV	0	Não	Não	Não	3(30)
26	72	1	10,75	III e IV	1	Não	Não	Sim	1(24)
27	72	1	18,85	III e IV	2	Não	Não	Sim	3(28)
28	55	0	11,15	III e IV	1	Não	Não	Sim	3(42)
29	49	2	25,65	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(26)
30	68	1	26,1	III e IV	1	Não	Sim	Sim	1(18)
31	69	1	16,85	III e IV	2	Sim	Não	Sim	3(20)
32	66	1	12,6	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(19)
33	46	1	15,85	III e IV	1	Não	Não	Sim	3(18)
34	47	1	5,2	III e IV	1	Não	Não	Sim	3(60)
35	50	0	19,3	III e IV	1	Não	Não	Sim	1(9)
36	59	3	16,65	I e II	1	Não	Não	Não	3(19)
37	40	3	16,7	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	3(19)
38	65	3	15,95	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(15)
39	63	1	8,7	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	3(15)
40	73	3	23,65	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(31)
41	46	3	20,2	I e II	0	Não	Não	Não	4(13)
42	52	3	14,75	III e IV	1	Sim	Não	Não	4(12)
43	70	0	4	III e IV	0	Não	Não	Sim	3(39)
44	82	4	17	III e IV	1	Sim	Não	Sim	4(15)
45	44	3	33,5	III e IV	0	Não	Não	Sim	4(26)
46	60	1	19,1	I e II	0	Não	Não	Sim	3(6)
47	46	3	20,15	I e II	1	Sim	Não	Sim	3(48)
48	47	1	11,6	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	1(7)
49	54	3	18,3	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	3(57)
50	70	3	47,35	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(48)
51	49	2	20,5	III e IV	1	Sim	Sim	Sim	1(39)
52	72	1	21,4	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(12)
53	58	1	19,85	III e IV	1	Não	Sim	Sim	3(72)

*Grau de diferenciação celular: 0 (bem diferenciado), 1 (moderadamente diferenciado) e 2 (pouco diferenciado).

** Sobrevida: 1 (óbito pela doença), 2 (óbito por outra causa), 3 (vivo em acompanhamento), 4 (abandono de tratamento) e os valores entre parênteses são os números de meses de sobrevida.