

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

A determinação quantitativa da área de microvasos intratumorais pode ser um indicador útil para tratamento coadjuvante em carcinomas de células não pequenas operados do pulmão

Morphometric intratumoral microvessel area evaluation could be a useful indicator for coadjuvant therapy in resected NSCLC

LUCIANE CRISTINA DREHER IRION¹, JOÃO CARLOS PROLLA², ANTÔNIO ATALÍBIO HARTMANN³, VINÍCIUS DUVAL DA SILVA⁴

- ¹ Mestre em Patologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Pós-graduanda (doutoramento em Patologia) na FFFCMPA. Porto Alegre, RS, Brasil. Este trabalho tem origem na dissertação de mestrado da autora.
- ² Professor titular do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor orientador do programa de pós-graduação em Medicina: Patologia, FFFCMPA. Porto Alegre, RS, Brasil.
- ³ Professor adjunto do departamento de Patologia da FFFCMPA e professor co-orientador do programa de pós-graduação em Medicina: Patologia, FFFCMPA. Porto Alegre, RS, Brasil.
- ⁴ Professor do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

- Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Medicina: Patologia. Coordenador: Dr. Antônio Atalíbio Hartmann. Av Sarmiento Leite, 245. Porto Alegre, RS, Brasil.
- Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Serviço de Cirurgia Torácica (Pavilhão Pereira Filho). Director: Dr. José J. P. Camargo. Av Annes Dias, S/N. Porto Alegre, RS, Brasil.
- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Citopatologia. Coordenador: Dr. João Carlos Prolla. Av Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS, Brasil.

Recebido para publicação: 02.12.13

Aceite para publicação: 03.01.17

RESUMO

Objectivo: Realizar a medida da área vascular tumoral e a contagem individual dos microvasos, demonstrados por imuno-histoquímica, em imagens de campos microscópicos de carcinoma de células não pequenas dos pulmões, verificando a correlação dessas medidas com a sobrevida dos pacientes. **Tipo do estudo:** transversal e observacional. **Material e métodos:** O material foi proveniente de peças cirúrgicas de 107 pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões tratados no Pavilhão Pereira Filho – Santa Casa de Porto Alegre. A partir de cortes de tecido incluídos em parafina, foi realizada imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-CD 34 (clone QB-End10; DAKO Corporation). A área vascular tumoral e a contagem de microvasos foram obtidas com o auxílio do programa de computador Image Pro Plus – 3.0. **Resultados:** A sobrevida média, em cinco anos, nos casos com alta área vascular (utilizando a média das áreas como ponto de corte) foi 21,7 meses \pm 2,5, sendo significativamente menor ($P < 0,0001$) do que os de baixa área vascular, com 38,9 meses \pm 3,0. O coeficiente de correlação entre a medida de área de microvasos e a contagem numérica destes foi 0,5 ($P = 0,001$). A área vascular tumoral apresentou maior correlação com a sobrevida (coef. correlação – 0,48/ $P = 0,001$) do que a contagem numérica dos microvasos tumorais (coef. de correlação – 0,2 / $P = 0,03$). Não foi encontrada correlação significativa entre a medida de área de microvasos e classificação histológica do tumor, sistema TNM, estado linfonodal e estadiamento clínico. **Conclusão:** A medida de área vascular tumoral, estabelecida com auxílio de computador, pode ser utilizada como um factor prognóstico para o carcinoma de células não pequenas dos pulmões.

REV PORT PNEUMOL IX (1): 19-32

Palavras-chave: Angiogénese. CD 34. Imuno-histoquímica. Carcinoma de células não pequenas dos pulmões. Análise de imagem.

ABSTRACT

Objective: To accomplish the tumor vascular area measure and the microvessel count, shown by immunohistochemistry, in non small cell lung cancer (NSCLC) microscopic images, and verify the correlation between these measurements and patients survival. **Design:** cross-sectional and observational. **Material and methods:** The material was deriving from 107 NSCLC surgical specimens in Pavilhão Pereira Filho — Santa Casa, Porto Alegre. Immunohistochemistry with anti-CD 34 monoclonal antibody (QB-End10; DAKO Corporation) was performed on paraffin-embedded tissue sections. The tumoral vascular area and the microvessel count were obtained by Image Pro Plus – 3.0 program. **Results:** The 5-year survival rate of high vascular area group (the cut-off was the mean of areas) was 21.7 months \pm 2.5, significantly lower ($P < 0.0001$) than the low vascular area cases, 38.9 months \pm 3.0. The correlation coefficient between microvessel area and microvessel count was 0.5 ($P = 0.001$). The tumoral vascular area shown higher correlation to survival (correlation coefficient: – 0.48 / $P = 0.001$) than the tumoral microvessel count (correlation coefficient: – 0.2 / $P = 0.03$). There was not any significant correlation between the microvessel areas and the histological type, the TNM, the lymph nodes status and the clinical staging. **Conclusion:** The tumoral vascular area measurement, with computed assistance, can be used as a prognostic marker in NSCLC.

REV PORT PNEUMOL IX (1): 19-32

Key-words: Angiogenesis. CD 34. Immunohistochemistry. NSCLC. Image analysis.

Introdução

Apesar dos avanços na conduta clínica e cirúrgica para os pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões, o seu prognóstico permanece reservado, mesmo quando o tratamento é realizado em estádios iniciais¹, sendo ainda a sobrevida média inferior a 15% em 5 anos². Segundo as Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a neoplasia de pulmão deverá atingir 21 425 pessoas (15 040 homens e 6385 mulheres) e causar 15 955 mortes em 2002. Isto significa 17,45/100 000 casos novos e 12,99/100 000 óbitos em homens; 7,20/100 000 casos novos e 5,29/100 000 óbitos em mulheres³.

A necessidade de identificar indicadores prognósticos mais precisos tem fomentado a pesquisa médica na busca de parâmetros biológicos, tais como estudo morfométrico tumoral, pesquisa de oncogenes, expressão de genes supressores de tumor e índices de proliferação celular^{1, 4, 5, 6, 7}. Da mesma forma, a investigação de marcadores prognósticos para neoplasias pulmonares tem sido constantemente realizada^(8, 9, 10). Estudos recentes têm demonstrado que a angiogênese pode ser considerada como um factor prognóstico independente^{11, 12, 13, 14}. Muitos investigadores já constataram uma relação entre angiogênese e prognóstico em neoplasias, entre elas tumores de mama^{15, 16}, próstata¹⁷, ovário¹⁸, colo uterino¹⁹, cabeça e pescoço¹², estômago²⁰ e pele - melanoma²¹. Neste sentido, a análise da densidade vascular pode auxiliar na escolha da terapêutica, especialmente quanto a indicação ou não de drogas inibidoras da angiogênese^{22, 23, 24}. A partir de um estudo publicado por Macchiarini²⁵, outros autores passaram a analisar a angiogênese em neoplasias de pulmão, nos diferentes estádios da doença^{7, 26, 27}.

Angiogênese é um processo fisiológico que traduz o desenvolvimento e proliferação de vasos. Este processo, que ocorre desde o período

embrionário, durante o ciclo menstrual e na reacção inflamatória, desenvolve-se através da degradação da membrana basal de vénulas, seguidas de migração, alinhamento e proliferação de células endoteliais a partir de estímulos angiogénicos²⁸. Nas neoplasias em geral, também estão presentes alguns estímulos angiogénicos, em maior ou menor intensidade, ocorrendo a «angiogénese tumoral».

A avaliação de microvasos tumorais e peritumorais (expressão da angiogénese) pode ser facilmente realizada através de exame imuno-histoquímico em cortes histológicos a partir de blocos de parafina, utilizando anticorpos monoclonais específicos, como anti-Factor VIII, anti-CD 34 e anti-CD 31, entre outros^{29, 30, 31}. Na maioria das pesquisas sobre angiogénese tumoral, executa-se a contagem directa do número de microvasos nas regiões do corte histológico onde há maior concentração desses microvasos. Estas zonas de maior concentração dos microvasos são conhecidas na literatura como «pontos quentes» - «*hot spots*»¹⁵. A contagem de microvasos no tumor é, contudo, uma técnica demorada e trabalhosa. Por outro lado, novos horizontes têm surgido com a utilização da computação, sendo possível avaliar a atividade angiogénica com maior praticidade, rapidez, precisão e acuidade. Esta abordagem possibilitaria a verificação de outras características, como a área vascular tumoral, o perímetro e o diâmetro dos vasos, além da tradicional contagem individual dos microvasos. Avaliações iniciais da angiogénese com o auxílio do computador foram realizadas em alguns tipos de tumores, como de sistema nervoso central³², intestino grosso³³ e colo uterino¹⁹, porém cada um destes estudos utilizou um programa de computador diferente.

Aproveitando a disponibilidade do programa Image Pro Plus, desenvolvemos este estudo avaliando a intensidade da angiogénese tumoral em pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões, através da quantificação da área

vascular tumoral, bem como a contagem do número de microvasos. A área vascular tumoral e o número de microvasos foram, então, correlacionados com a sobrevida.

Material e Métodos

Avaliação do comité de ética

O projecto deste trabalho foi submetido à avaliação do comité de ética em pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa, em Porto Alegre, correspondendo ao protocolo 240/00, o qual foi aprovado sem restrições.

Amostragem tecidual

O material foi proveniente de tecidos incluídos em blocos de parafina de 107 pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões, tratados através de cirurgia entre Abril de 1993 e Fevereiro de 1996 no Serviço de Cirurgia Torácica do Pavilhão Pereira Filho, no Complexo Hospitalar Santa Casa, em Porto Alegre, RS, Brasil. Foram incluídos os casos de pacientes que possuíam, pelo menos, dois blocos de parafina com amostragem tumoral, para garantir um material adequado. Os pacientes não poderiam ter recebido qualquer tratamento antitumoral específico antes do procedimento cirúrgico. Foram confeccionadas lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina (HE), para confirmação diagnóstica e classificação de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)³⁴. O estadiamento também seguiu as recomendações da OMS³⁵. A partir destas lâminas, foi selecionado o bloco de parafina mais adequado para a realização da imuno-histoquímica. Um resumo de dados clínicos e estadiamento encontra-se no Quadro I.

Imuno-histoquímica

O material a ser submetido ao estudo imuno-histoquímico foi fixado em formalina e incluído em parafina, para confecção de cortes histológicos com 4 µm de espessura. Através de imunoperoxidase pela técnica do complexo avidina-biotina (ABC), foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD 34 (clone QB-End10; DAKO Corporation) na diluição de 1:1000 e incubado durante a noite a uma temperatura de 4°C. Os cortes foram incubados com imunoglobulina *anti-mouse* biotinilada (diluição 1:300, DAKO) por 30 minutos a 37°C. Foi aplicado o complexo ABC (1:400) após a lavagem em tampão salino (*phosphate buffered saline*–PBS). Finalmente, foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e posteriormente realizada a contracoloração com hematoxilina. Cortes para controlo negativo foram processados simultaneamente sem o anticorpo primário.

Obtenção das imagens

A avaliação das lâminas ocorreu no laboratório de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo efetuada por dois patologistas simultaneamente, sem o conhecimento de qualquer informação clínica sobre os casos. No caso de discordância, seria requerida a opinião de um terceiro observador. Um teste-piloto, com vinte casos de pacientes diferentes, foi realizado para treinamento dos observadores, sendo obtidas dezoito imagens por caso, como no processo dos pacientes incluídos no estudo. Os cortes histológicos foram realizados nas zonas periféricas do tumor, longe de áreas de necrose, conforme preconizado¹⁵, sendo definido como microvaso qualquer célula endotelial imunocorada e separada dos microvasos adjacentes, das células tumorais e de outros elementos do tecido conjuntivo^{36, 37}.

QUADRO I

Dados clínicos, estadiamento e avaliação vascular

		Nº de Pacientes	Área de Microvasos (µm ²)			N.º de Microvasos		
			Mínima	Média	Máxima	Mínimo	Médio	Máximo
Sexo	Masculino	90	186,04	2654,85	5123,67	4,72	11,945	19,17
	Feminino	17	623,51	1628,45	2633,39	5,44	10,025	14,61
Idade	Até 60 anos	50	325,46	1479,42	2633,39	5,61	12,39	19,17
	Mais de 61 anos	57	290,92	2707,29	5123,67	4,72	10,3	15,89
Tipo Histológico	Epidermóide	53	186,42	2655,04	5123,67	4,72	11,61	18,5
	Adenocarcinoma	45	417,87	1629,95	2842,03	4,72	11,94	19,17
	Outros	9	664,40	1520,37	23376,3	5,44	8,58	11,72
Metástase em Linfonodo	Sim	59	186,04	2654,85	5123,67	4,72	10,3	15,89
	Não	48	325,46	1583,74	2842,03	4,72	11,94	19,17
Estadiamento	IA	9	325,46	995,33	1665,19	5,61	10,86	16,11
	IB	32	417,87	1629,95	2842,03	4,72	11,94	19,17
	IIA	6	623,22	1239,06	1854,90	8,00	8,55	9,11
	IIB	23	417,42	2770,54	5123,67	6,06	10,97	15,89
	IIIA	29	186,04	1494,77	2803,50	4,72	10,11	15,50
	IIIB	8	290,92	1333,58	2376,25	6,39	8,83	11,28

Para avaliação dos microvasos através de análise computadorizada, foi realizada a digitalização das imagens dos campos microscópicos, utilizando uma câmara de vídeo (Sony 3CCD, DXC-970MD) ligada ao microscópio e ao computador. Assim, foi possível uma demonstração do campo microscópico no monitor, em tempo real. Inicialmente, foi realizada uma observação panorâmica do corte histológico de cada caso, com aumento de 30x. Passando-se para o aumento de 100x, seleccionaram-se as três áreas de maior concentração de microvasos por caso, ou seja, três *hot spots*¹³. Com o aumento de 200x (0,74 mm²), procedeu-se à digitalização das imagens nestas três áreas. Com o intuito de avaliar a área preconizada por Weidner e, uma vez que o campo de visual da câmara de vídeo é menor do que o do microscópio, foi necessária a digitalização de 6 campos contíguos em cada *hot spot*, totali-

zando 18 campos fotografados em cada paciente¹⁵. Todas as imagens foram arquivadas no computador em formato «*.tif».

Avaliação dos microvasos

Para avaliação dos microvasos, foi utilizado o programa de computador Image Pro Plus 3.0, na resolução de 640 x 480 pixels e com 24 bits de cores. Primeiramente, definiu-se o limiar de positividade da reacção de imuno-histoquímica: com o auxílio do rato do monitor, o patologista escolheu a tonalidade mais ténue e a mais forte do vermelho-acastanhado conferido pelo DAB, em cada imagem, registando-a como o limiar de positividade para o programa. Com esta selecção feita, o programa considerou automaticamente todas as estruturas (objectos) coradas dentro da

faixa de tonalidades incluídas no limiar, ressaltando-as numa cor viva, para que o patologista pudesse conferir as estruturas seleccionadas (Figs. 1 A e B). Tratando-se de uma imagem plana, a informação da lente de ampliação do microscópio permite que o programa meça automaticamente a área total correspondente aos microvasos marcados pela imuno-histoquímica (em μm^2) e seleccionados por se encontrarem dentro do limiar de cores escolhido pelo patologista. Os resultados das 18 fotos são, então, transferidos automaticamente do Image Pro Plus para o programa Microsoft Excel. A área vascular assumida para cada paciente corresponde à média das áreas vasculares das 18 imagens do seu arquivo.

Em seguida, foi realizada a contagem do número de microvasos corados nas mesmas imagens. Com o rato, o patologista seleccionava cada microvaso imunocorado, permanecendo seleccionado até que todos estivessem marcados. Após a marcação dos microvasos, o programa realizava a contagem dos objectos (microvasos) assinalados em cada imagem. O número de microvasos de cada paciente corresponde à média do número de microvasos nas 18 imagens do seu arquivo (Figs. 2 A e B).

Análise estatística

A análise da sobrevida específica dos pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. A análise de indicadores dicotomizados também foi baseada no método de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos foi verificada por teste de *log rank*. Os resultados de ambos os métodos de avaliação foram correlacionados entre si.

Os resultados de variáveis secundariamente avaliadas, como classificação histológica do tumor, o sistema TNM, o estado linfonodal e o es-

tadiamento clínico foram correlacionados com a angiogénese, segundo a média dos valores de áreas de cada caso. Em todas as análises, um valor de *p* menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas SPSS 8.0 para Windows e Microsoft Excel 97 SR-1.

Resultados

Pacientes

Dos 107 pacientes, 90 eram do sexo masculino e 17 do feminino. A média de idades foi de 61,73 anos, variando entre 36 e 80 anos. O intervalo entre o dia da cirurgia e o encerramento do trabalho foi de 72 meses, em média, variando entre 55 e 89 meses. Setenta e quatro pacientes morreram durante o seguimento, onze permaneceram vivos, perdendo-se contacto com vinte e dois pacientes. Para análise de sobrevida, foram desconsiderados os pacientes perdidos. Apenas um paciente negou história de tabagismo. Entre os fumadores, o tempo médio de fumo foi de 38,55 anos (10-60 anos).

Classificação histológica

Do total, foram diagnosticados 53 carcinomas epidermóides (49,53 %), 45 adenocarcinomas (42,05 %) e 9 casos (8,41 %) com outros tipos (carcinoma de grandes células, carcinoma de células tipo intermediárias, carcinoma de padrão neuroendócrino). Quanto à diferenciação da neoplasia, a maioria dos carcinomas epidermóides foi classificada como moderadamente diferenciada (42-79,2 %), sendo 3 casos (5,7 %) classificados como bem diferenciados e 8 (15,1 %) pouco diferenciados. Entre os adenocarcinomas, a distribuição foi um pouco mais homogénea, correspondendo os bem diferenciados a 8 casos

A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ÁREA DE MICROVASOS INTRATUMORAIS PODE SER UM INDICADOR ÚTIL PARA TRATAMENTO COADJUVANTE EM CARCINOMAS DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS OPERADOS DO PULMÃO/LUCIANE CRISTINA DREHER IRION, JOÃO CARLOS PROLLA, ANTÔNIO ATALÍBIO HARTMANN, VINÍCIUS DUVAL DA SILVA

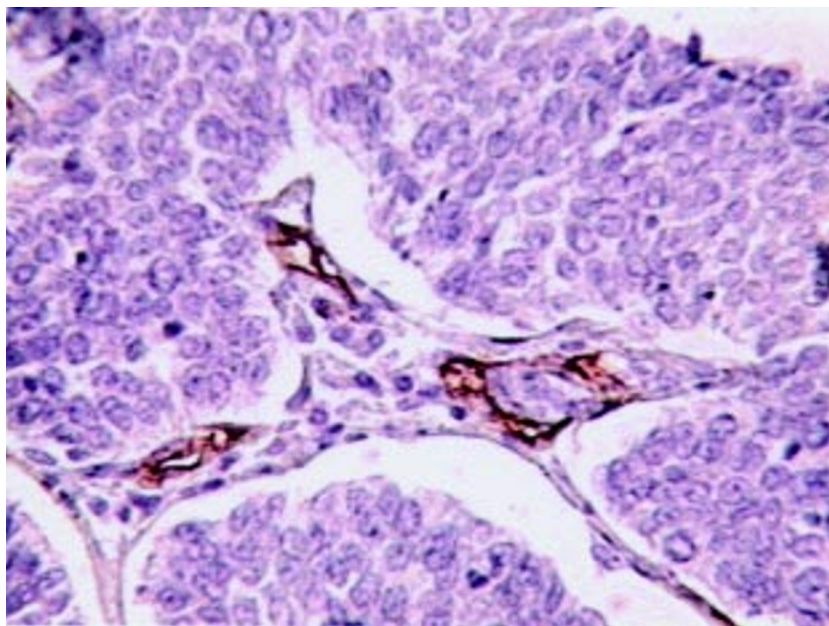


Fig. 1A — Imagem digitalizada de campo microscópico com aumento de 200x antes de accionar o comando do programa analisador de imagem.

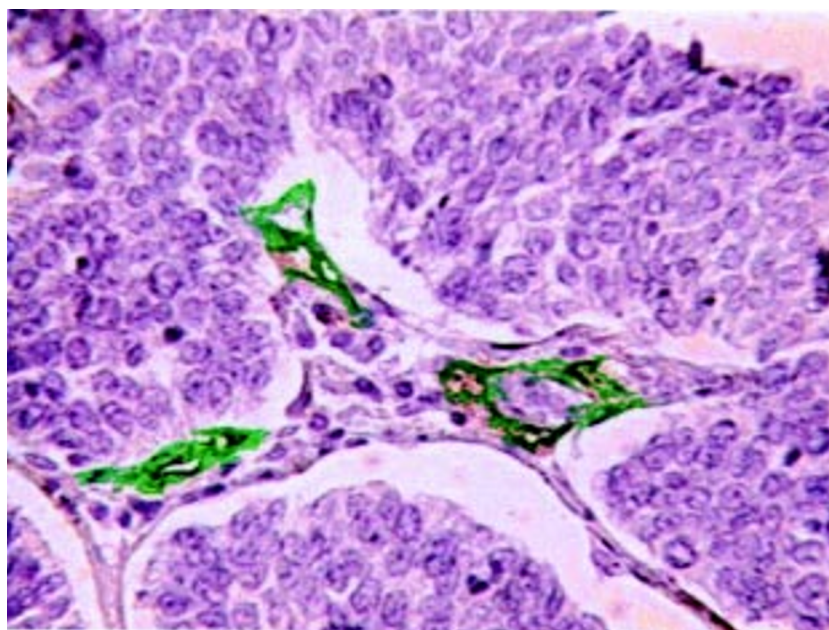


Fig. 1B — Imagem após o comando do programa analisador de imagens, mostrando o que exactamente foi considerado.

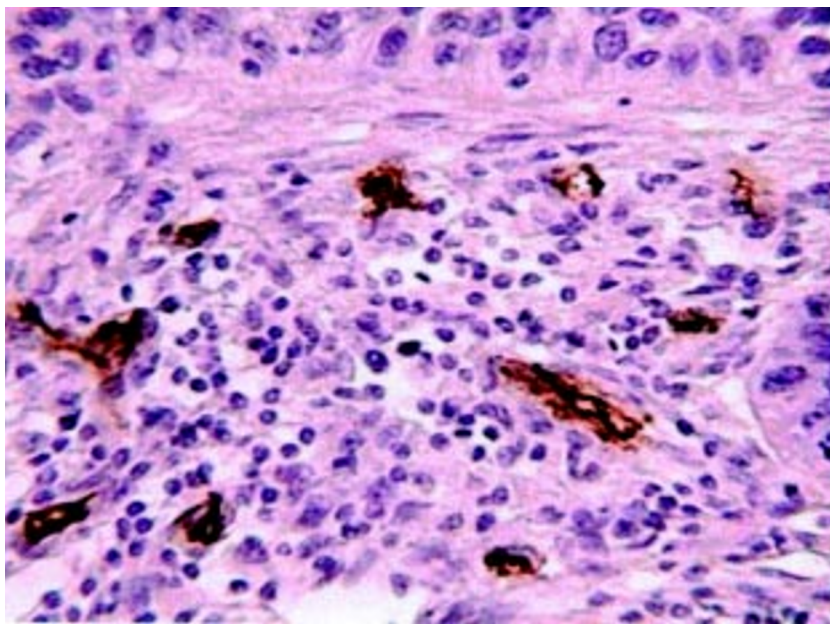


Fig. 2A — Imagem digitalizada de campo microscópico antes de realizar a contagem numérica de microvasos.

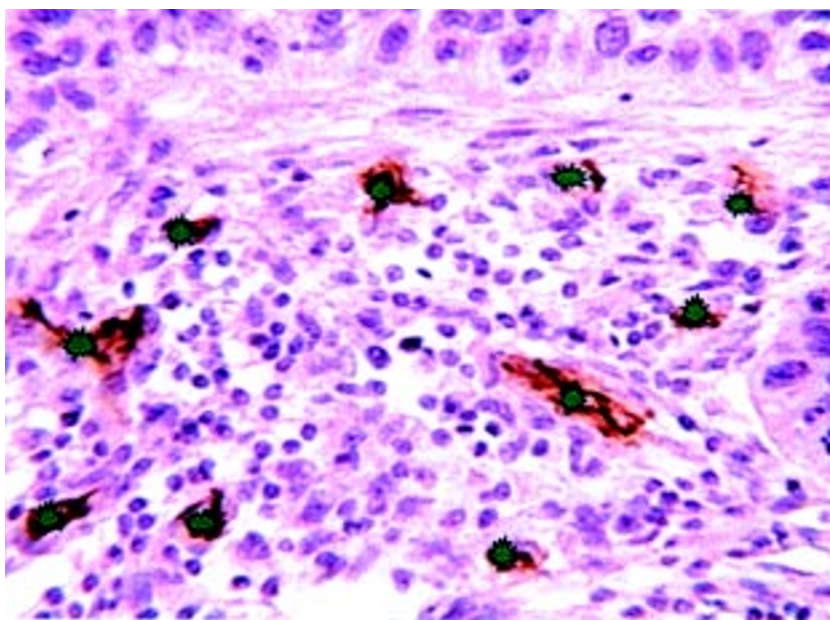


Fig. 2B — Imagem após a contagem dos microvasos.

(17,8 %), os moderadamente diferenciados a 20 casos (44,4 %) e os pouco diferenciados a 17 casos (37,8 %).

Estadiamento

O estadiamento clínico e a estratificação dos pacientes no TNM encontram-se demonstrados nos Quadros I e II.

Avaliação dos microvasos

A coloração das lâminas submetidas à imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CD 34 não ofereceu dificuldades à interpretação, pela boa qualidade, mostrando-se altamente específica, com mínima ou inexistente coloração de fundo (*background*).

Área vascular tumoral

O valor da média da área de microvasos de todos os casos foi $1185,76 \mu\text{m}^2 \pm 708,9$ e variando entre $186,04 \mu\text{m}^2$ e $5123,66 \mu\text{m}^2$. Esta média das áreas de microvasos foi considerada como ponto de corte, a fim de dividir os pacientes em dois grupos (alta e baixa área vascular tumoral), pois o seu valor é muito próximo do obtido por meio de uma curva ROC ($1200 \mu\text{m}^2$).

Número de microvasos

O valor da média do número de microvasos dos casos (média dos 18 campos microscópicos) foi de $9,59 \pm 2,96$, variando entre 4,72 e 19,17. Como na medida de área a média da contagem de microvasos de todos os casos foi considerada como ponto de corte, confirmado por curva ROC, dividindo os pacientes em dois grupos: alta e

baixa densidade de microvasos.

Um resumo dos resultados da avaliação da área dos microvasos, bem como a contagem destes, podem ser observados no Quadro I.

Sobrevida

A sobrevida média dos pacientes foi de 33,5 meses $\pm 2,8$ (IC 95 % = 28,0 – 38,9). Na curva de sobrevida de Kaplan-Meier, utilizando como factor os valores de áreas de microvasos, obteve-se uma sobrevida média de 38,9 meses $\pm 3,0$ (IC 95 % = 33,0 – 44,9) para os casos com baixa área vascular e uma sobrevida média de 21,7 meses $\pm 2,5$ (IC 95 % = 16,9 – 26,6) para os casos com alta área vascular tumoral, sendo o teste de *log rank* significativo ($p < 0,0001$) (Fig. 3).

Da mesma forma, foi realizada a curva de sobrevida de Kaplan-Meier, utilizando-se como factor os valores da contagem de microvasos. Neste caso, a sobrevida média foi de 33,8 meses $\pm 3,2$ (IC 95 % = 27,6 – 40,0) para casos com baixa densidade de microvasos e de 26,6 meses $\pm 2,7$ (IC 95 % = 21,2 – 31,9) para casos com alta densidade de microvasos (teste de *log rank* significativo, com $p = 0,03$) (Fig. 4).

O índice geral de sobrevida em cinco anos foi de 19 %. Em igual período, o índice de sobrevida em casos com baixa área vascular tumoral foi 31,82 % e naqueles com alta área vascular tumoral foi de 5 %. Em relação à contagem de microvasos, a sobrevida, em cinco anos, de pacientes com baixa densidade de microvasos, foi de 27,66 % e com alta densidade de microvasos de 7,9 %.

Foi observado que, a partir do segundo ano de cirurgia, aumenta importantemente a diferença anual na sobrevida dos pacientes com baixa ou alta área vascular tumoral. Isto foi confirmado pelo aumento gradativo da razão entre as taxas de sobrevida dos pacientes com baixa e alta área vascular, respectivamente (Quadro III).

QUADRO II
Distribuição dos pacientes em relação ao TNM

T	Nº Pacientes (%)		
	N0	N1	N2
T1	9 (8,41 %)	4 (3,73 %)	1 (0,93 %)
T2	32 (29,9 %)	21 (19,62 %)	21 (19,62 %)
T3	4 (3,73 %)	3 (2,8 %)	4 (3,73 %)
T4	3 (2,8 %)	5 (4,67 %)	0

Existe correlação, apesar de fraca, entre a medida das áreas vasculares e a contagem de microvasos (coeficiente de correlação = 0,5 / $p = 0,001$). Encontrou-se uma correlação negativa entre os valores das áreas microvasos e a sobrevivência dos pacientes, com coeficiente de correlação $-0,48$ ($p = 0,001$). A correlação entre contagem de microvasos e a sobrevivência, apesar de significativa ($p = 0,03$), é mais fraca, com coeficiente de correlação de $-0,2$.

Na população estudada, não houve correlação significativa entre a média das áreas dos microvasos e a classificação histológica do tumor, o sistema TNM, o estado linfonodal e o estadiamento clínico (Quadro IV).

Discussão

Neste estudo, investigou-se a angiogénese tumoral, por medida da área de microvasos e contagem numérica dos mesmos, testando-os como factores prognósticos no carcinoma de células não pequenas dos pulmões.

A frequência dos tipos histológicos carcinoma epidermóide e adenocarcinoma, acima dos 40 % neste estudo, segue a tendência encontrada na literatura²⁶, sendo ainda o carcinoma epidermóide o subtipo histológico mais frequente^{1, 4}. O número inferior de pacientes em estágio inicial em relação ao TNM pode ter ocorrido porque, em geral, o diagnóstico ainda não é feito precocemente, pois o paciente procura auxílio médico quando já existem indícios clínicos da doença, como por exemplo o escarro hemoptóico.

As técnicas de imuno-histoquímica são fáceis de realizar, relativamente baratas e disponíveis na maioria dos hospitais. Relatos recentes têm demonstrado que o anticorpo anti-CD 34 confere uma coloração reprodutível, sem apresentar problemas como reacção cruzada com células de vasos linfáticos ou estromais, sendo mais específico e sensível do que o anti-Factor VIII^{2, 18, 29}. Segundo Tanigawa²⁰, a contagem do número de

QUADRO III
Sobrevivência anual geral e de acordo com a área vascular tumoral

Tempo em anos	SOBREVIVÊNCIA				Razão Baixa/ /Alta área vasc.
	Geral	Baixa área vascular	Alta área vascular	Valor p	
1	77,38 %	84,10%	70%	0,137	1,2
2	58,33 %	77,27%	37,50%	0,0005	2,06
3	39,30 %	59,10%	17,50%	< 0,0001	3,37
4	23,81 %	36,36%	10%	< 0,0001	3,63
5	19 %	31,82%	5%	< 0,0001	6,36

QUADRO IV

Correlação entre as medidas de áreas dos microvasos e classificação histológica, sistema TNM, estado linfonodal e estadiamento clínico.

VARIÁVEIS		P	Coef. Correlação
TIPO HISTOLÓGICO	epidermóide	0,9	0,016
	adenocarcinoma	0,74	0,1
TNM		0,63	-0,04
LINFONODOS		0,34	-0,09
ESTADIAMENTO		0,38	-0,08

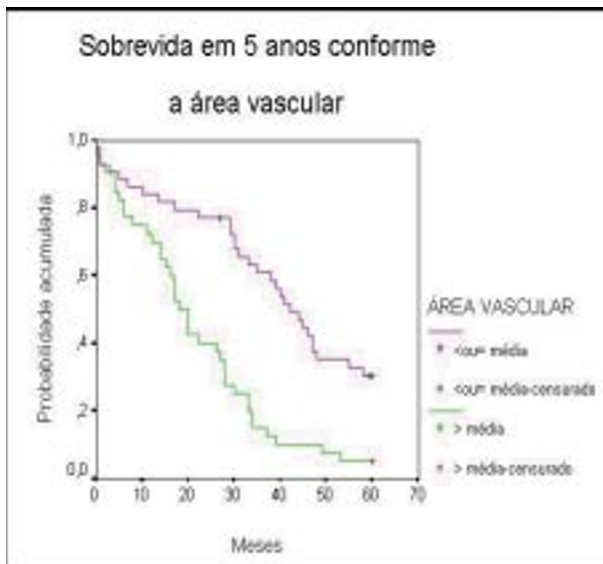


Fig. 3 — Curva de sobrevida de acordo com a área de microvasos.

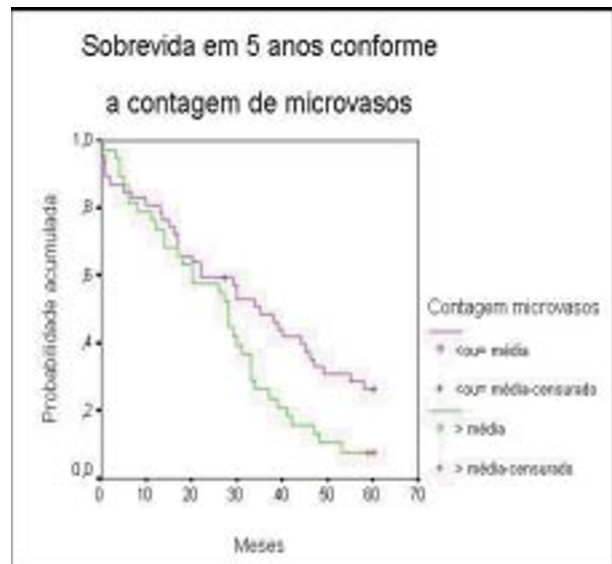


Fig. 4 — Curva de sobrevida de acordo com a contagem de microvasos.

microvasos identificados com o CD 34 é três ou quatro vezes maior do que o número identificado através do Factor VIII. Num trabalho envolvendo carcinomas ovarianos, Hollingsworth e colaboradores¹⁸ tentaram realizar a comparação da eficácia de reação imuno-histoquímica entre os anticorpos anti-CD 34, anti-Factor VIII e anti-UEA. Como houve uma subcoloração do epitélio vascular em aproximadamente 50 % dos cortes

histológicos com anti-Factor VIII e UEA, os autores realizaram as correlações clínicas apenas com os resultados do processamento com o anticorpo anti-CD 34. Na experiência de Alves e colaboradores³⁸, o anticorpo anti-CD 34 tem-se mostrado mais sensível do que o anti-CD 31. Ao utilizar-se o anticorpo anti-CD 31, regiões com um infiltrado inflamatório proeminente podem ser erroneamente interpretadas como uma área de alta

densidade vascular, principalmente com um aumento de baixa magnificação³⁹. No presente estudo, a eleição do anticorpo anti-CD 34 para ressaltar a visualização de microvasos mostrou-se adequada, pois ofereceu uma lâmina limpa, praticamente sem artefactos como *background* e sem reacções cruzadas com epitélio vascular linfático ou células estromais. Estas características são fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas que envolvem programas de computador para análise de imagem, facilitando a automatização e aumentando a credibilidade dos resultados.

Apesar de existirem várias propostas de avaliação vascular tumoral, parece haver concordância na escolha da melhor região a ser avaliada. Está praticamente estabelecido que o estudo da densidade vascular tumoral deva ser realizado nas zonas de maior concentração vascular (*hot spots*), longe de áreas de necrose. Não há consenso ainda sobre o número de campos microscópicos a serem examinados e nem mesmo em quantas faixas deva ser dividida a gradação dos resultados^{12, 26, 40, 41, 42, 43, 44}. Neste trabalho, também realizámos a avaliação vascular a partir dos *hot spots* e separamos a densidade vascular em dois grupos: abaixo e acima da média, pois o valor obtido na média dos resultados foi semelhante ao encontrado na curva ROC.

Concordando com dados amplamente divulgados na literatura, o nosso trabalho mostrou que a densidade vascular medida por contagem numérica de microvasos em *hot spots* apresenta correlação com a sobrevida dos pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões, havendo diferença nos grupos de menor ou maior densidade de microvasos ($p = 0,03$). Yamazaki⁴⁵ encontrou correlação significativa ($p = 0,027$) com o anti-Factor VIII, Chiba⁶, com o anti-CD 34 ($p = 0,001$) e Dazzi⁴⁶, igualmente com anti-CD 34 ($p = 0,004$). Por outro lado, a densidade vascular medida por área de microvasos nos mesmos *hot spots* apresentou uma correlação mais confiável com a sobrevida, havendo diferença

entre os grupos de menor ou maior área vascular ($p < 0,0001$). Não encontramos relatos comparando a área vascular tumoral e a sobrevida em pacientes com carcinoma brônquico, para confronto dos resultados. Os resultados obtidos na comparação da medida de área dos microvasos e da contagem manual dos mesmos com a sobrevida dos pacientes mostraram que a área vascular tem melhor significância prognóstica, o que está de acordo com resultados publicados em outras neoplasias malignas. Pavlopoulos³³, estudando a angiogénese no adenocarcinoma coloproctal, comparou a significância prognóstica para sobrevida da contagem de microvasos com outros parâmetros morfométricos analisados por meio de programa de computador e concluiu que a área vascular em *hot spots* é o único parâmetro morfométrico com significância prognóstica.

No presente estudo e em análise envolvendo carcinoma de colo uterino, houve uma significativa relação entre baixa densidade vascular tumoral e uma sobrevida mais longa, com valores $p < 0,005$ encontrado por Tjalma e colaboradores¹⁹ e $p < 0,0001$ no nosso estudo.

Em conclusão, este estudo mostrou que existe correlação negativa entre a sobrevida de pacientes com carcinoma de células não pequenas dos pulmões e a medida da área de microvasos, realizada com auxílio de programa de computador e imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD 34. Assim, estar ciente do estado da angiogénese tumoral pode ser útil na previsão de um prognóstico favorável ou não.

BIBLIOGRAFIA

1. ANTONANGELO L, BERNARDI FDC, CAPELOZZI VL, et al. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest* 1997; 111:110-114.
2. MATSUYAMA K, CHIBA Y, SASAKI M, TANAKA H, MURAOKA R. Tumor angiogenesis as a prognostic mar-

A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ÁREA DE MICROVASOS INTRATUMORAIS PODE SER UM INDICADOR ÚTIL PARA TRATAMENTO COADJUVANTE EM CARCINOMAS DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS OPERADOS DO PULMÃO/LUCIANE CRISTINA DREHER IRION, JOÃO CARLOS PROLLA, ANTÔNIO ATALÍBIO HARTMANN, VINÍCIUS DUVAL DA SILVA

- ker in operable non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:1405-1409.
3. INCA - Instituto Nacional do Cancer. Relatório de atividades 2001. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer para o ano 2002. Vol. 2002: Ministério da Saúde, INCA, 2002.
 4. BERNARDI FDC, CAPELOZZI VL, TAKAGAKI TY, YOUNES RN, SALDIVA PHN. Usefulness of morphometric evaluation of histopathologic slides in predicting long-term outcome of patients with squamous cell carcinoma of the lung, a preliminary report. *Chest* 1995; 107:614-620.
 5. QUINLAN D, DAVIDSON A, SUMMERS C, WARDEN H, DOSHI H. Accumulation of p53 correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52:4828-4831.
 6. CHIBA Y, TANIGUCHI T, MATSUYAMA K, et al. Tumor angiogenesis, apoptosis, and p53 oncogene in stage I lung adenocarcinoma. *Surg Today* 1999; 29:1148-1153.
 7. D'AMICO T, MASSEY M, HERNDON JN, MOORE M, HARPOLE DJ. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Cardiovasc Surg* 1999; 117:736-743.
 8. DEMARCHI LMMF, REIS MM, PALOMINO SAP, et al. Prognostic Values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000; 13(5):511-520.
 9. BERNARDI FD, ANTONANGELO L, BEYRUTI R, TAKAGAKI T, SALDIVA PH, CAPELOZZI VL. A prognostic model of survival in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung using clinical, pathologic, and biologic markers. *Mod Pathol* 1997; 10(10):992-1000.
 10. CARVALHO PE, ANTONANGELO L, BERNARDI FD, LEAO LE, RODRIGUES OR, CAPELOZZI VL. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30(11):478-486.
 11. FOLKMAN F. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
 12. GASPARINI G, WEIDNER N, MALUTA S, et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:739-744.
 13. WEIDNER N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1993; 10:302-313.
 14. MACCHIARINI P, FONTANINI G, DULMET E, et al. Angiogenesis: an indicator of metastasis in non-small-cell lung cancer invading the thoracic inlet. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:1534-1539.
 15. WEIDNER N, SEMPLE J, WELCH W, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
 16. TOI M, INADA K, SUZUKI H, TOMINAGA T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36:193-204.
 17. WEIDNER N, CARROLL P, FLAX J, BLUMENFELD W, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:401-409.
 18. HOLLINGSWORTH H, KOHN E, STEINBERG S, ROTHENBERG M, MERINO M. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147:33-41.
 19. TJALMA W, VAN MARCK E, WEYLER J, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78:170-174.
 20. TANIGAWA N, AMAYA H, MATSUMARA M, et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56:2671-2676.
 21. SRIVASTAVA A, LAIDLER P, DAVIES R, HORGAN K, HUGHES L. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4.00 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133:419-423.
 22. KIM K, LI B, WINER J, ARMANINI M, GILLET N, PHILLIPS HS and Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppress tumour growth in vivo. *Nature* 1993 Apr 29; 362(6423):841-844.
 23. STRIETER R, POLVERINI P, ARENBERG D, et al. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 1995; 57:752-762.
 24. CARBONE D. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24:388-401.
 25. MACCHIARINI P, FONTANINI G, HARDIN M, SQUARTINI F, ANGELETTI C. Relation of neovascularization to metastasis of non small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340:145-146.
 26. ANGELETTI C, LUCCHI M, FONTANINI G, et al. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2). *Cancer* 1996; 78:409-415.
 27. COX G, JONES J, WALKER R, STEWARD W, O'BYRNE K. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000; 27:81-100.
 28. VORAVUD N, CHARURUK N. Tumor angiogenesis. *J Med Assoc Thai* 1999; 82:394-404.
 29. FINA L, MOOLGAARD H, ROBERTSON D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75:2417-2426.
 30. FONTANINI G, BIGINI D, VIGNATI S, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small-cell lung cancer. *J Pathol* 1995; 177:57-63.
 31. GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M, THEODOSSIOU D, et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor VIII and anti-CD 31 immu-

- nostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2485-2492.
32. WESSELING P, JEROEN A, VAN DER LAAK W, HENK DE LEENW M, RUTTER J, BURGER P. Quantitative immunohistochemical analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1994; 81:902-909.
 33. PAVLOPOULOS P, KONSTANTINIDOU A, AGAPITOS E, KAVANTZAS N, NIKOLOPOULOU P, DAVARIS P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 83:2067-2075.
 34. TRAVIS W, COLBY T, CORRIN B, SHIMOSATO Y, BRAMBILLA E. Histological typing of lung and pleural tumours. WHO, World Health Organization, International Histological Classification of Tumours. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1999:156.
 35. BROWN J, SPIRO S. Update on lung cancer and mesothelioma. *J R Coll Physicians Lond* 1999; 33:506-512.
 36. FONTANINI G, VIGNATI S, BIGINI D, et al. Neoangiogenesis: a putative marker of malignancy in non-small-cell lung cancer (NSCLC) development. *Int J Cancer* 1996; 67:615-619.
 37. FONTANINI G, LUCCHI M, VIGNATI S, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:881-886.
 38. ALVES V, BACCHI C, VASSALO J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999:270.
 39. VERMEULEN P, GASPARINI G, FOX S, 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.
 40. HARPOLE DJ, RICHARDS W, HERNDON J, SUGARBAKER D. Angiogenesis in molecular biologic substaging in patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:1470-1476.
 41. GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M, KAKO-LYRIS S, et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:3017-3024.
 42. YUAN A, YANG P, YU C, et al. Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2157-2162.
 43. GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M, O'BYRNE K, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small-cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 179:80-88.
 44. FONTANINI G, VIGNATI S, LUCCHI M, et al. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor VEGF) expression. *Br J Cancer* 1997; 75:1295-1301.
 45. YAMAZAKI K, ABE S, TAKEKAWA H, et al. Tumor angiogenesis in human lung and carcinoma. *Cancer* 1994; 74:2245-2250.
 46. DAZZI C, CARIELLO A, MAIOLI P, et al. Prognostic and predictive value of intratumoral microvessels density in operable non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 1999; 24:81-88.