



Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

ISSN: 1808-8694

revista@aborlccf.org.br

Associação Brasileira de
Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-
Facial
Brasil

Amar, Ali; Fernando Giovanini, Allan; Paladino Rosas, Marilene; Cervantes, Onivaldo
Reatividade linfonodal e densidade microvascular nas metástases cervicais de carcinoma
epidermóide com tumor primário oculto

Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 72, núm. 3, mayo-junio, 2006, pp. 382-387

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392437764015>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Reatividade linfonodal e densidade microvascular nas metástases cervicais de carcinoma epidermóide com tumor primário oculto

Lymph node reactivity and microvessel density in neck metastases of unknown primary squamous cell carcinoma

Ali Amar¹, Allan Fernando Giovanini², Marilene Paladino Rosas³, Onivaldo Cervantes⁴

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas, linfonodos, neoplasias de cabeça e pescoço, neoplasias primárias desconhecidas, neovascularização patológica.

Keywords: squamous cell cancer, lymph nodes, head and neck neoplasms, unknown primary neoplasms, pathologic neovascularization.

Resumo / Summary

Introdução: A neoangiogênese e a resposta imunológica são mecanismos importantes no desenvolvimento das metástases. **Objetivo:** Avaliar a reatividade linfonodal e a densidade microvascular nas metástases cervicais de carcinoma epidermóide com tumor primário oculto, considerando a sua relação com outras variáveis histológicas e clínicas. **Tipo de Estudo:** Série de casos, retrospectiva. **Casística e Método:** 19 pacientes submetidos a esvaziamento cervical entre 1983 e 2000. Os linfonodos foram reavaliados quanto ao tipo de reatividade, considerando a área cortical e paracortical. Nas metástases foi avaliado o grau de diferenciação, desmoplasia, necrose, e densidade microvascular (CD34). Foi estabelecida a relação entre as diferentes variáveis histológicas e clínicas, incluindo o estadiamento e a evolução dos pacientes. **Resultados:** A densidade microvascular apresentou mediana de 91 vasos/mm², variando de 28 a 145. A reatividade paracortical foi mais freqüente nos pacientes com menos de 55 anos (90% x 44%, p= 0,05). A sobrevida livre de doença foi de 52% em 3 anos, sendo similar entre os pacientes com maior ou menor densidade microvascular tumoral. **Conclusões:** A densidade microvascular nas metástases de tumor primário oculto apresenta grande variação individual. Não foi possível estabelecer relação entre a densidade microvascular e as variáveis clínicas e histológicas estudadas.

Background: neoangiogenesis and the immune response are important mechanisms in metastasis development. **Aim:** to evaluate lymph node reactivity and microvessel density in neck metastasis of occult primary squamous cell carcinoma considering their histological and clinical variables. **Study design:** retrospective case-series. **Method:** 19 patients with neck metastasis of occult primary squamous cell carcinoma who underwent neck dissection between 1983 and 2000 were selected. The lymph nodes were reevaluated on the type of reactivity in both the cortical and paracortical areas, and the metastasis were assessed as to grade, desmoplasia, necrosis and microvessel density (CD34). The relationship between histological and clinical variables was evaluated. **Results:** the median microvessel density was 91 vessels/mm², varying from 28 to 145. Paracortical hyperplasia was more common in patients below 55 years of age (90% x 44%, p= 0.05), but there was no relationship between reactivity patterns and microvessel density with prognosis. The disease-free survival was 52% in 3 years, being similar in both groups, with higher or lower microvessel densities. **Conclusion:** microvessel density in neck metastasis of occult primary squamous cell carcinoma had a great individual variability. It wasn't possible to establish the relationship between microvessel density and the clinical or histological variables studied.

¹ Doutor, Médico Assistente Hospital Heliópolis.

² Doutor, Professor Centro Universitário Positivo.

³ Mestre, Médica patologista Hospital Heliópolis.

⁴ Professor livre-docente, Chefe da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço Escola Paulista de Medicina.

Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, UNIFESP-EPM Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis.

Endereço para correspondência: Rua Pintassilgo 516 ap. 188 Vila Uberabinha 04514-032 São Paulo SP.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 6 de janeiro de 2006.

Artigo aceito em 28 de março de 2006.

INTRODUÇÃO

A neoangiogênese é um processo importante para o desenvolvimento dos tumores e está relacionada com a metastatização e o prognóstico em diferentes tipos de neoplasias malignas¹⁻⁴. A resposta imunológica, além da ação antitumoral, participa da modulação da angiogênese e de outros mecanismos relacionados à invasão e crescimento das neoplasias. Os linfonodos regionais freqüentemente apresentam sinais de reatividade, mas o seu significado ainda é desconhecido^{5,6}. Este estudo tem por objetivo avaliar a densidade microvascular e a reatividade linfonodal nas metástases cervicais de tumor primário oculto, relacionando estes achados com outras variáveis histológicas e clínicas, considerando que esta doença representa um modelo clínico adequado para o estudo das metástases.

MÉTODO

Foram revisados os prontuários dos pacientes com metástase cervical de tumor primário oculto atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis entre 1983 e 2000. Foram selecionados os pacientes submetidos a esvaziamento cervical, nos quais se confirmou a presença de carcinoma epidermóide. Foram incluídos todos os pacientes que apresentavam amostra tecidual disponível para análise e seguimento igual ou superior a 12 meses após o tratamento inicial, totalizando 19 casos. Destes, 16 pacientes pertenciam ao gênero masculino e 3 ao feminino. A idade média foi de 55 anos. O tabagismo e o etilismo estavam presentes em 16 e 13 casos respectivamente. Quanto ao estadiamento da metástase cervical, os pacientes foram estadiados conforme os critérios da classificação TNM de 2002 (UICC-AJCC), sendo que 1 paciente apresentava estágio N1, 8, N2 e 10, N3. A média de linfonodos obtidos no esvaziamento cervical foi de 22,4 linfonodos, variando de 4 a 49. A reatividade foi avaliada em 427 linfonodos e a densidade microvascular em 60 linfonodos com metástases.

A análise histológica convencional avaliou o grau de diferenciação, presença de necrose tumoral, desmoplasia e reatividade linfonodal. A avaliação da reatividade linfonodal aplicou os critérios usados por Berlinger et al. e Klimek et al., descritos a seguir^{5,7}:

A - Hiperplasia paracortical: aumento da celularidade na área paracortical.

B - Hiperplasia folicular: aumento do número e tamanho dos folículos linfóides na zona cortical do linfonodo, formação de folículos secundários com centros germinativos proeminentes.

C - Hiperplasia sinusal: hiperplasia das células endoteliais com distensão dos sinusóides medulares e histiocitose.

D - Linfonodo não-estimulado: linfonodo sem proliferação linfocitária.

E - Linfonodo depletado: diminuição da população linfocitária e fibrose difusa no linfonodo.

O padrão de reatividade foi classificado conforme definido por Amar et al., avaliando as zonas cortical e paracortical do linfonodo, considerando o padrão existente em mais de 2/3 dos linfonodos reativos. Não havendo predomínio, a hiperplasia foi considerada mista. A falta de reatividade em mais de 80% dos linfonodos definiu o padrão não-reativo. A hiperplasia sinusal e a histiocitose foram consideradas separadamente. A histiocitose foi definida pela presença de macrófagos nos sinusóides, caracterizados por núcleos grandes, nucléolos evidentes e citoplasma eosinofílico.

A análise histológica convencional considerou o grau de diferenciação, presença de necrose tumoral e desmoplasia.

As reações imunohistoquímicas foram realizadas na seguinte sequência:

1. Anticorpo primário (Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 Class II, Dako AS, M7165, Denmark) diluído 1:100 em PBS, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

2. Anticorpo secundário (Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit Ig, do conjunto StreptAB Complex/HRP Duet Mouse/Rabbit, Dako AS, K492, Denmark) diluído 1:200, por 30 minutos a 37°C.

3. Complexo reagente A (Streptavidin) e reagente B (Biotinylated Peroxydase) diluído 1:200, por 30 minutos a 37°C.

4. Solução de 3,3'-Diaminobenzidina Tetrahydrocloro 60 mg% (Sigma, D5637, USA), 1 mL de Dimetil-sulfóxido (DMSO), 1mL de H2O2 6% e 100 mL de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

A contagem dos vasos foi realizada à microscopia óptica, em 5 áreas de maior densidade vascular intratumoral (hot spot). Foi selecionada uma área de 0,4 mm² em cada hot spot, analisados com auxílio do programa de análise de imagens Image Tool 2.0 (University of Texas Health Science Center, USA), contado o número de vasos em aumento de 100X e somado o valor obtido nas 5 áreas (2 mm²).

Foi avaliada a relação entre a reatividade do linfonodo e a densidade microvascular nas metástases, grau de diferenciação, desmoplasia, necrose, características clínicas e evolução dos doentes.

Na análise estatística foi utilizado o método de sobrevivência atuarial de Kaplan-Meier e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Gehan. Nas variáveis quantitativas, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney e pelo teste de Kruskal-Wallis. A correlação entre as variáveis quantitativas usou o teste de Spearman. Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher e o teste da diferença entre duas proporções, considerando valores bicaudais de p. Os cálculos foram realizados no programa Statistica

5.1 (Statsoft Inc., USA) e, em todos os testes, foram consideradas significativas as diferenças cujos valores de p foram iguais ou inferiores a 0,05.

RESULTADOS

A reatividade foi avaliada em 427 linfonodos, dos quais 102 apresentavam hiperplasia paracortical e 122, hiperplasia folicular. A hiperplasia sinusal foi observada em 93 linfonodos, provenientes de 15 pacientes, os quais também apresentavam histiocitose sinusal. A hiperplasia paracortical, considerando sua presença também nos casos de padrão misto, foi observada em 90% dos pacientes com menos de 55 anos de idade e em 44% dos pacientes com idade igual ou superior a 55 anos, $p=0,05$.

A densidade microvascular mediana foi de 91,5 vasos/mm², variando de 28 a 145 (figura 1). Considerando o grau de diferenciação independentemente em cada linfonodo e a sua respectiva densidade microvascular, os tumores bem ou moderadamente diferenciados apresentaram mediana de 55 vasos/mm² (Q25-75%= 38-90), enquanto que os tumores pouco diferenciados apresentaram 53 vasos/mm² (Q25-75%= 43-116), $p=0,85$.

No seguimento, um tumor primário foi diagnosticado em 3 pacientes, 10 apresentaram recidiva no pescoço e em 4 casos foram detectadas metástases à distância. Ao todo, 5 pacientes receberam tratamento de resgate, sendo 4 com cirurgia e 1 com radioterapia; os demais receberam tratamento paliativo. Entre os submetidos ao resgate, 3 tiveram a doença controlada no segundo tratamento.

A densidade microvascular mediana nos casos que desenvolveram ou não metástases a distância foi 73 va-

sos/mm² (Q25-75%= 55-108) e 99 vasos/mm² (Q25-75%= 28-145) respectivamente, $p=0,59$.

A sobrevida livre de doença para todo o grupo foi de 52% a dois anos e 44% a 5 anos. Os pacientes assintomáticos tiveram um acompanhamento médio de 61 meses (Figuras 2 e 3).

Não foi observada relação significativa entre a idade dos pacientes e a densidade microvascular das respectivas metástases (Figura 4). A relação entre a densidade microvascular e as demais variáveis analisadas pode ser verificada na tabela 1.

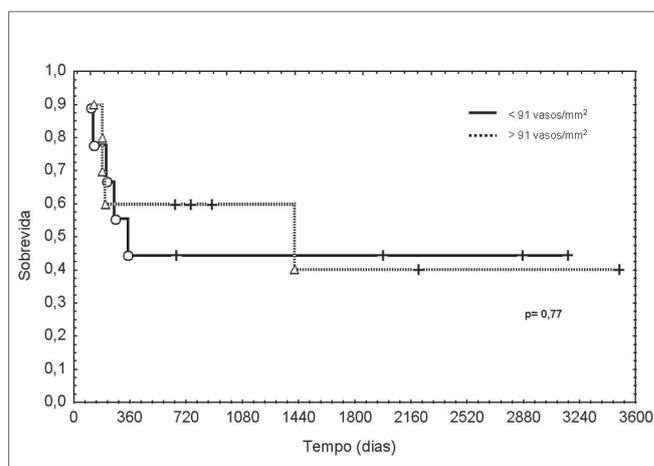


Figura 2. Sobrevida livre de doença conforme a densidade microvascular das metástases.

legenda: Sobrevida atuarial método de Kaplan-Meier. Teste de Gehan, $p=0,64$

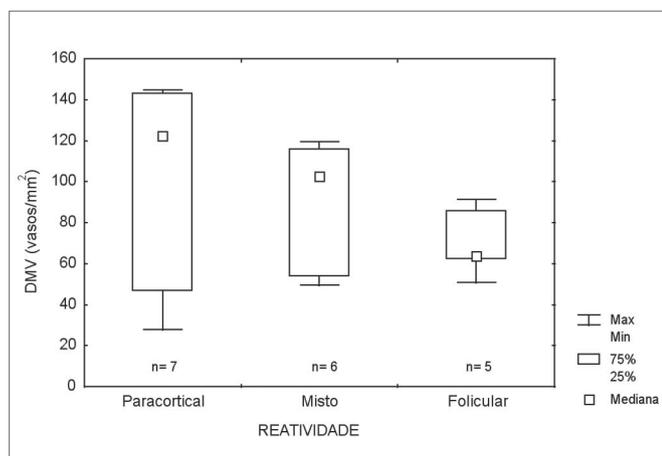


Figura 1. Densidade microvascular nas metástases em relação ao padrão de reatividade linfonodal.

legenda: DMV= densidade microvascular. Max= máximo. Min= mínimo. 75%= quartil 75%. 25%= quartil 25%. Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,27$.

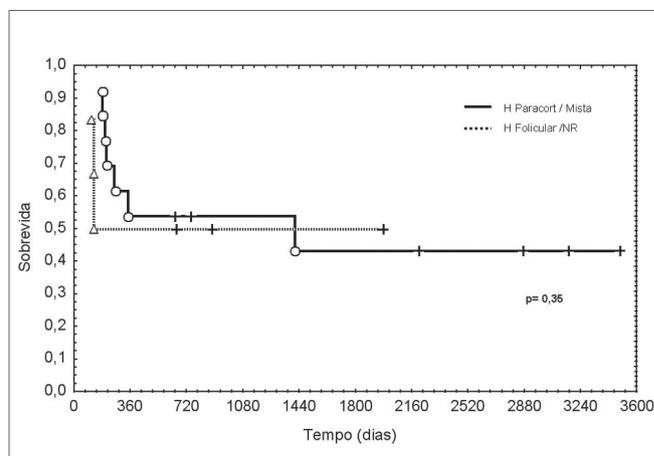


Figura 3. Sobrevida livre de doença conforme o padrão de reatividade linfonodal.

legenda: Sobrevida atuarial, método de Kaplan-Meier. Teste de Gehan, $p = 0,35$.

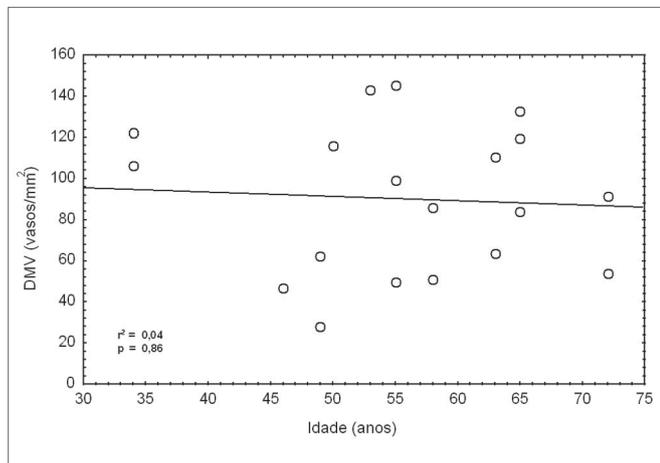


Figura 4. Correlação entre a idade do paciente e a densidade microvascular das metástases.

legenda: DMV= densidade microvascular. Teste de Spearman, $r^2 = 0,04$, $p = 0,86$.

Tabela 1. Densidade microvascular conforme as características clínicas e variáveis histológicas.

		Densidade Microvascular			p
		Mediana Q _{25-75%}	Mim	Max	
Idade	≤ 55	102 (49-122)	28	145	0,82
	> 55	86 (63-110)	51	133	
Estádio N	N1-2	62 (55-99)	47	145	0,20
	N3	108 (86-122)	28	143	
Reatividade	Paracortical	122 (47-143)	28	145	0,27
	Misto	102 (53-116)	41	119	
	Folicular	63 (62-86)	59	91	
Reatividade	≤ 50%	91 (49-106)	28	145	0,64
	> 50%	86 (62-119)	51	143	
Evolução	Doente	88 (62-119)	28	145	0,86
	Assintomático	99 (53-110)	47	143	
Necrose	Não	86 (53-116)	47	143	0,52
	Sim	102 (84-113)	28	145	
Desmoplasia	Não	63 (51-116)	28	122	0,22
	Sim	102 (84-133)	47	145	

DISCUSSÃO

A primeira questão que se apresenta nos casos de metástases cervicais de tumor primário oculto é relacionada à origem do tumor. Os pacientes com tumor primário oculto apresentam as mesmas características epidemiológicas observadas nos pacientes com tumores primários das vias aerodigestivas superiores. Adicionalmente, foram identificadas alterações genéticas similares na mucosa oral "normal" e nas metástases linfonodais em alguns casos de

tumor primário oculto que, analisadas dentro do contexto da cancerização de campo e da expansão clonal, são fortes evidências para suportar a hipótese de sua origem no epitélio das vias aero-digestivas superiores, com possível regressão ou dormência tumoral no sítio primário⁸⁻¹⁰. Vários estudos reportam a associação entre a densidade microvascular nos tumores primários e a presença de metástases^{3,4}. Como a neoangiogênese é uma característica importante para o crescimento das metástases, a maior angiogênese sugere uma vantagem adquirida pela seleção clonal. Foi relatada uma relação inversa entre a densidade microvascular no tumor primário e nas respectivas metástases, sugerindo que a maior angiogênese em um sítio poderia contribuir para a inibição da angiogênese à distância^{11,12}. A hipótese de que as metástases de tumor primário oculto poderiam inibir o crescimento do tumor primário seria suportada por elevada densidade microvascular, mas foi encontrada grande variação no presente estudo. Esta grande variação não inviabiliza a hipótese de que o controle sistêmico da neoangiogênese esteja implicado na etiologia do tumor primário oculto, mas este não deve ser o único mecanismo envolvido.

Outra questão importante diz respeito ao significado da densidade microvascular tumoral, especialmente quando se usa a técnica de contagem nos hot spots^{3,13}. O tumor pode crescer ao longo da vasculatura existente ou remodelar o estroma, promovendo a neoangiogênese, mas a maior densidade microvascular não significa que o tumor tenha maior aporte sanguíneo. Os tumores necróticos podem apresentar maior neoangiogênese, possivelmente desencadeada pela maior resposta inflamatória neste tipo de morte celular¹⁴. Para que ocorra a difusão de oxigênio e nutrientes, as células podem distar aproximadamente 110mm do vaso, medida que é alcançada com baixa densidade microvascular¹³. Os linfonodos apresentam grande densidade microvascular, que supera a densidade observada nas metástases, assim a alteração no fluxo sanguíneo ocasionada pelo crescimento das metástases também reforça a idéia de que o tumor modifica a estrutura vascular e a dinâmica do fluxo^{15,16}. Infelizmente, a técnica empregada não permite distinguir os vasos neoformados daqueles já existentes.

Não foi encontrada correlação entre a idade e a densidade microvascular, mas a reatividade paracortical foi encontrada com mais frequência entre os pacientes com idade inferior a 55 anos. Uma vez que é esperada menor angiogênese com o envelhecimento, este achado sugere que a neoangiogênese na metástase esteja relacionada a uma maior ação inibitória¹⁷.

A reatividade linfonodal, manifesta por hiperplasia paracortical ou folicular, foi relacionada a melhor prognóstico em diferentes estudos^{5,6,18}. Nos diferentes estudos não se formou um consenso quanto ao tipo de reatividade relacionado ao melhor prognóstico, bem como

ao método para classificar uma reatividade heterogênea. Não é incomum encontrar mais de um padrão no mesmo linfonodo ou diferentes padrões em diversos linfonodos de um mesmo paciente, o que torna difícil a categorização dos mesmos e poderia explicar os diferentes resultados. A quase totalidade dos pacientes com tumor primário oculto apresentava linfonodos reativos. A resposta imune está relacionada à liberação de substâncias promotoras da angiogênese e, no presente estudo, nos casos que apresentavam reatividade paracortical foram observadas as maiores densidades microvasculares, embora estatisticamente não significante. Nos tumores da cabeça e pescoço, os linfonodos com hiperplasia folicular ou paracortical se localizam na proximidade do tumor, ou seja, aqueles que habitualmente apresentam metástases, portanto, é possível que a resposta imune favoreça o implante e o crescimento das metástases no linfonodo⁷. Adicionalmente, a resposta imune poderia ser responsável pela regressão do tumor primário.

A histiocitose e a hiperplasia sinusal foram encontradas na maioria dos pacientes. Esta última é considerada uma reatividade inespecífica e associada à disfunção imunológica⁷. Por estar presente na quase totalidade dos pacientes, não foi possível determinar a sua relação com as outras variáveis estudadas. Os linfonodos com hiperplasia sinusal são mais freqüentes nos linfonodos mais distantes do tumor, assim não pode ser descartada a possibilidade de que o tumor ou a resposta imune nos linfonodos da primeira estação de drenagem possam desencadear um efeito imunossupressor a jusante no fluxo linfático⁷. Este hipótese é reforçada pelo fato de que os linfócitos provenientes de linfonodos na área de drenagem do tumor apresentem menor ação citotóxica do que os linfócitos do sangue periférico¹⁹. Os macrófagos (histiócitos) têm função importante na remodelação da matriz extracelular e na modulação da angiogênese e da resposta imune, e também podem modificar a expressão gênica e o comportamento das células tumorais, aumentando o seu potencial de invasão. Sua ação poderia tanto favorecer como inibir o crescimento tumoral^{20,21}.

A sobrevida livre de doença foi semelhante entre os pacientes com alta ou baixa densidade microvascular. Os estudos que relacionaram a maior densidade microvascular com pior prognóstico avaliaram tumores primários⁴. Como a maior densidade microvascular está associada à presença de metástases, isto poderia explicar a pior evolução destes casos. Em relação à radiosensibilidade, foi relatado pior resultado nos tumores primários que apresentavam valores extremos de densidade microvascular, o que poderia refletir a modulação regional da neoangiogênese^{22,23}. No presente estudo, o tratamento multimodal pode ter mascarado esta relação. Considerando a grande variação da densidade microvascular, também encontrada em outros estudos, a amostra foi insuficiente para estabelecer

relações significativas com outras variáveis clínicas ou histológicas^{24,25}.

Concluindo, a reatividade linfonodal e a densidade microvascular nas metástases de tumor primário oculto não apresentaram relação entre si ou com a evolução da doença. Nestes pacientes, onde pode ser desconsiderado o efeito do tumor primário nos parâmetros estudados, parece que a metástase linfonodal, que é um dos fatores prognósticos mais relevantes nos carcinomas das vias aero-digestivas, já reflete uma seleção clonal na qual a neoangiogênese passa a ter importância secundária. Adicionalmente, a classificação empregada pode ter mascarado relações existentes apenas no microambiente da metástase. A densidade microvascular reflete uma forma de interação com os tecidos adjacentes, fundamental para o crescimento do tumor, que pode ter repercussão regional ou sistêmica. Obviamente, o prognóstico individual é multifatorial e a densidade microvascular avalia apenas um determinado momento em uma fração do tumor. Estes aspectos funcionais não puderam ser elucidados através das alterações morfológicas analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and Metastasis. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2451-60.
2. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1990;50(19):6130-8.
3. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, 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(14):2274-84.
4. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2001;25(3):169-80.
5. Berlinger NT, Tsakraklides V, Pollack K, Adams GL, Yang M, Good RA. Immunologic assessment of regional lymph node histology in relation to survival in head and neck carcinoma. *Cancer* 1976;37(2):697-705.
6. Amar A, Rosa MP, Rapoport A, Magalhães MR, Carvalho MB. Reatividade linfonodal com metástase cervical de tumor primário oculto - Estudo de 24 pacientes. *Rev Col Bras Cir* 2001;28(3):193-197.
7. Klimek T, Glanz H, Dreyer T. Histomorphological characteristics of non-metastatic lymph nodes in patients with head and neck cancer according to their site in the neck. *Acta Otolaryngol* 1996;116(2):336-40.
8. Califano J, Westra WH, Koch W, Meiningner G, Reed A, Yip L et al. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(7):599-604.
9. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for clonal origin. *Cancer Res* 1996;56(11):2484-7.
10. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953;6:963-8.
11. Camphousen K, Moses MA, Beecken WD, Khan MK, Folkman J, O'Reilly MS. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res* 2001;61(5):2207-11.
12. Amar A, Giovanini AF, Rosa MP, Yamassaki HO, Rapoport A. Densidade microvascular no carcinoma de língua. *Rev Assoc Med Bras* 2002;48(3):204-8.
13. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangi-

-
- rogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(12):883-93.
14. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *British J Cancer* 1999;79(5/6):991-5.
 15. Naresh KN, Nerurkar AY, Borges AM. Angiogenesis is redundant for tumor growth in lymph node metastases. *Histopathology* 2001;38(5):466-70.
 16. Chikui T, Yuasa K, Maemura S, Kanda S. Change of angiostructure and hemodynamics in lymph node metastases in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(3):350-7.
 17. Kreisle RA, Stebler BA, Ershler WB. Effect of host age on tumor-associated angiogenesis in mice. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(1):44-7.
 18. Cernea C, Montenegro F, Castro I, Cordeiro A, Gayotto L, Ferraz A et al. Prognostic significance of lymph node reactivity in the control of pathologic negative node squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg* 1997;174(5):548-51.
 19. Nakamura H, Ishiguro K, Mori T. Different immune functions of peripheral blood, regional lymph node, and tumor infiltrating lymphocytes in lung cancer patients. *Cancer* 1988;62(12):2489-97.
 20. Al-Sarireh B, Eremin O. Tumor-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumor growth. *JR Coll Surg Edimb* 2000;45(1):1-16.
 21. Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* 2005;23(5):953-64.
 22. Koukorakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48(2):545-53.
 23. Ito Y, Kamijo T, Yokose T, Kawashima M, Ogino T, Ikeda H et al. Microvessel density predicts the radiosensitivity of metastatic head and neck squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes. *Int J Oncol* 2001;19(6):1127-32.
 24. Karavasilis V, Melamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Kalofonos H et al. Angiogenesis in cancer of unknown primary: clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1. *BMC Cancer* 2005;5(1):25.
 25. Hillen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997;74(1):81-5.