

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA LINFANGIOGÊNESE EM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
METÁSTASES NODAIS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2011

S729a Sousa, Sílvia Ferreira de
2011 Avaliação da linfangiogênese em carcinoma de células escamosas
T de boca e de sua associação com metástase nodais / Sílvia Ferreira de Sousa,
2011.
111 f.:il.
Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia.
1. Carcinoma de células escamosas – Teses. 2. Neovascularização
patológica – Teses. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dissertação intitulada "**Avaliação da linfangiogênese em carcinoma de células escamosas de boca e de sua associação com metástases nodais**", área de concentração em **Patologia Bucal**, apresentada por **Sílvia Ferreira de Sousa**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
FO-UFMG - Orientadora

Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio
FO-UFPeI

Dra. Vanessa de Fátima Bernardes
PNPD/CNPq-UFMG

Profa. Dra. Efigênia Ferreira e Ferreira
Subcoordenadora do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 15 de julho de 2011.




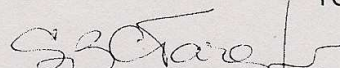
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br

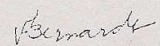


Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Patologia Bucal**, da candidata **Sílvia Ferreira de Sousa**.

Aos 15 de julho de 2011, às 9:00 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio e Dra. Vanessa de Fátima Bernardes. A Professora Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Orientadora da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Avaliação da linfangiogênese em carcinoma de células escamosas de boca e de sua associação com metástases nodais**". Encerrada a exposição, foi iniciada a argüição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, Dra. Vanessa de Fátima Bernardes e Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as argüições, a Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela APROVAÇÃO..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 15 de julho de 2011.


Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
FO-UFMG - Orientadora



Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio
FO-UFPEl


Dra. Vanessa de Fátima Bernardes
PNPD/CNPq-UFMG

Colegiado de Pós-Graduação,
Faculdade de Odontologia de
UFMG

Confere com o original

15 / 07 / 2011


Assinatura

Elizabeth Soares Teles Noronha
Secretária do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
FO/UFMG

À minha querida mãe e ao meu querido pai, exemplos de esforço e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pela torcida, ajuda e admiração e, ao meu pai, por todo o carinho, apoio e compreensão. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim!

Ao Marcos, por todo o carinho, companheirismo, respeito e incentivo a todo momento.

Às minhas pequenas, mas muito amadas, Ana Clara, Júlia e Maria Fernanda, por alegrarem triplamente a minha vida. À Elizete, pelo apoio e por torná-las minhas irmãs.

Ao Léo, pelo carinho e incentivos na concretização deste objetivo.

Aos meus amigos de Samonte, especialmente as amigas Laura e Bruna, por terem sido tão presentes.

A todos os familiares, em especial aos meus avós, exemplos de bondade.

Aos grandes amigos de Faculdade: Paty, Aninha e Fred, por entenderem e incentivarem minha caminhada.

Em especial, à minha orientadora, Professora Maria Cássia, pela oportunidade, ensinamentos, amizade e acima de tudo, pela orientação. Muito Obrigada.

À Vanessa, pelo aprendizado diário e por ser có-responsável pela realização deste trabalho.

Ao Fred, amigo e companheiro de todas as horas desta jornada. Por todos os conselhos, incentivos e ensinamentos.

Aos Professores da Patologia Bucal: Maria Auxiliadora Do Carmo, Ricardo Mesquita, Tarcília Silva, Ricardo Gomez e Vagner Santos. Os ensinamentos da docência e pesquisa de vocês são diferenciais em nossa formação na Patologia.

Ao Professor Mauro Henrique Abreu, na ajuda com a estatística.

À Inês, por sua competência, disponibilidade e paciência em todos os momentos.

Aos grandes amigos e companheiros de mestrado: Ivana, Thiago, Telminha, Fabrício, Márcio, Vladimir, Alessandra e Janine; o convívio com vocês no dia-a dia foi essencial.

Aos já Mestres, Patrícia, Giovanna, Daniela, Juliana, João, Renata, Elizete e Cláudia, pelo carinho e ajuda constantes.

À Professora Aline Batista e à doutoranda Helenisa da Universidade Federal de Goiás, pela contribuição neste trabalho.

Ao cirurgião bucomaxilofacial Dr. Júlio César Lacerda, pela confiança e incentivo.

Ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG, representado pelo Professor Saul Martins de Paiva e as funcionárias Bete, Laís e Zuleika, por todos os serviços prestados.

À UFMG, pela gratuidade do ensino de qualidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

A Deus, por me dar ânimo, coragem, sabedoria e demonstrações de estar sempre comigo.

RESUMO

Estudos recentes têm mostrado que o comportamento metastático de alguns tumores pode ser facilitado pela linfangiogênese, seja no tumor primário ou nos linfonodos. Para o estudo da linfangiogênese, foram utilizados 36 espécimes cirúrgicos de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) e linfonodos associados. As densidades vascular linfática (LVD) e microvascular (MVD), tumoral e linfonodais, foram avaliadas imunohistoquimicamente usando os anticorpos D2-40 e CD105 respectivamente. Avaliou-se também a expressão de podoplanina (D2-40), VEGF-C e VEGFR-3 pelas células neoplásicas no tumor primário e linfonodo metastático. A relação das proteínas estudadas com as características clínicopatológicas foram avaliadas por meio de testes de associação. O impacto das variáveis estudadas na sobrevida global dos pacientes foi também analisado. Alta LVD mostrou-se associada com o tamanho do tumor e localização. MVD mostrou significância estatística com a presença de metástase e houve uma associação significativa entre os fatores linfangiogênicos e a densidade de vasos na região intratumoral. Nenhum dos tumores bem diferenciados mostrou expressão de podoplanina no fronte de invasão. LVD e MVD nos linfonodos metastáticos mostraram-se significativamente maiores quando comparadas às densidades nos linfonodos não metastáticos. Observamos ainda que, gradação histológica e MVD peritumoral se mostraram como indicadores de um pior prognóstico no CCEB. Sinais da ocorrência da linfangiogênese no CCEB foram demonstrados e a presença de uma rede vascular aumentada nos linfonodos metastáticos reforça estudos prévios da ocorrência da linfangiogênese no linfonodo. Além disso, a expressão da podoplanina pelas células tumorais mais indiferenciadas no fronte invasivo, sugere sua expressão como um indicador de agressividade tumoral.

Unitermos: carcinoma de células escamosas de boca, angiogênese, linfangiogênese, metástase linfonodal, imunohistoquímica.

ABSTRACT

“EVALUATION OF LYMPHANGIOGENESIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND ASSOCIATION WITH NODAL METASTASIS”

Recent studies have demonstrated that metastatic behavior of some tumors is facilitated by lymphangiogenesis in primary tumor or in lymph node environment. In the present study of lymphangiogenesis 36 paraffin-embedded samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and associated lymph nodes were used. Lymphatic vessels and microvessels densities (LVD and MVD) in tumor and in lymph nodes were evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and CD105 antibodies, respectively. Also, we analyzed podoplanin (D2-40), VEGF-C and VEGFR-3 neoplastic expressions in primary tumor and in metastatic lymph node. The relationship between the proteins studied and clinicopathologic characteristics was evaluated by association tests. Moreover, the impact of studied variables in overall survival of the patients was analyzed. High LVD showed an association with size and localization of tumor. MVD showed statistical significance with metastasis and a significant association between the lymphangiogenic factors and the density of vessels in intratumoral region was also seen. None of the well differentiated tumors, showed podoplanin expression in invasion front. LVD and MVD in metastatic lymph nodes demonstrated to be significantly higher when compared with densities in non-metastatic lymph nodes. Also, histologic graduation and peritumoral MVD showed a tendency to be indicators of a poor prognosis in OSCC. Signs of lymphangiogenesis occurrence in OSCC were demonstrated, and the enhanced vascular network in metastatic lymph nodes reinforces the previous reports of lymphangiogenesis occurrence in lymph nodes. Also, the expression of podoplanin by more undifferentiated tumor cells in invasion front, suggest that this expression could be an indicator of tumor aggressiveness.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, angiogenesis, lymphangiogenesis, nodal metastasis, immunohistochemistry.

ABREVIATURAS E SIGLAS

µm – Micrometro (ou micrômetro)

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

CA – California

CCEB – Carcinoma de células escamosas de boca

CD105 – Anticorpo monoclonal de microvasos neoformados

cm – centímetro

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS – Conselho Nacional de Saúde

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

D2-40 – Anticorpo monoclonal de vasos linfáticos

DAB – *Diaminobenzidine* (diaminobenzidina)

DNA – *Desoxirribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

EUA – Estados Unidos da América

Fig – Figura

FO – Faculdade de Odontologia

GO – Goiás

HC – Hospital das Clínicas

HE – *Hematoxylin-eosin* (hematoxilina-eosina)

HPV – Papiloma Vírus Humano

HR – *Hazard ratio*

IC – Intervalo de confiança

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LM – Linfonodo metastático

LNМ – Linfonodo não metastático

LVD – *Lymphatic vessel density* (densidade de vasos linfáticos)

MVD – *Microvessel density* (densidade de microvasos)

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TNM – *Tumor, nodal disease, metastatic disease* (sistema de estadiamento – tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e metástase.)

UFG – Universidade Federal de Goiás

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UICC – União Internacional Contra o Câncer

UK – *United Kingdom*

VEGF-C – *Vascular Endothelial Growth Factor –C* (fator de crescimento endotelial vascular – C)

VEGFR-3 – *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – 3* (fator de crescimento endotelial vascular – receptor 3)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Carcinoma de células escamosas de boca	20
2.2 Os vasos linfáticos e a metástase	27
2.3 Angiogênese e linfangiogênese	29
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo geral	41
4.2 Objetivos específicos	41
5. METODOLOGIA	42
5.1 Seleção da amostra	43
5.2 Reação imunoistoquímica	44
5.3 Análise da marcação imunoistoquímica	45
5.3.1 Análise da imunomarcação de D2-40 e CD105	46
5.3.2 Análise da imunomarcação de D2-40 nas células neoplásicas	47
5.3.3 Análise da imunomarcação de VEGF-C e VEGFR-3	47
5.4 Gradação histopatológica dos tumores	49
5.5 Avaliação da sobrevida global dos pacientes	51
5.6 Análise estatística	52
5.7 Aspectos éticos e legais	52
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1 Descrição dos resultados	54
6.2 Artigo	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

8. CONCLUSÕES -----	92
9. REFERÊNCIAS -----	94
10. ANEXOS -----	106
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG -----	107
Atividades complementares exercidas durante o mestrado -----	108

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 – Sistema de estadiamento para o câncer oral e de lábio proposto pela <i>American Joint Committee on Cancer</i>	25
QUADRO 2 – Elaboração do estadiamento clínico TNM para o câncer oral e de lábio proposto pela <i>American Joint Committee on Cancer</i>	26
QUADRO 3 – Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo	45
QUADRO 4 – Sistema de graduação histopatológica para o carcinoma de células escamosas de boca proposto pela OMS	50
QUADRO 5 – Sistema de graduação histopatológica para o carcinoma de células escamosas de boca proposto por Bryne e colaboradores	50

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Características clinicopatológicas dos 36 casos de carcinoma de células escamosas de boca avaliados	55
TABELA 2 – Distribuição dos casos segundo seguimento	59
TABELA 3 – Análise univariada da sobrevida segundo modelo de Cox	61
TABELA 4 – Análise multivariada da sobrevida segundo modelo de Cox	62
Table 1 – Artigo - Association between density of vessels, podoplanin expression and clinicopathological parameters in primary tumor	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Evolução anual da sobrevida dos 36 pacientes em estudo	59
FIGURA 2 – Curvas de sobrevida das variáveis gradação histopatológica do tumor tipo OMS e densidade microvascular peritumoral	62
Figure 1 – Artigo - Immunohistochemical findings in samples of oral squamous cell carcinoma and lymph nodes	83
Figure 2 – Artigo - Lymphangiogenic factors and density of vessels	84
Figure 3 – Artigo - Density of vessels in metastatic and non-metastatic lymph nodes	85

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é o tumor maligno mais comum da região de cabeça e pescoço. Sua taxa de sobrevivência de 05 anos permanece baixa, em torno de 50%, principalmente em decorrência das metástases locais e à distância (Funk *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2006; Siriwardena *et al.*, 2008).

Estima-se que a angiogênese, a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes, seja essencial para o crescimento do tumor e metástases (Folkman, 1995). Entretanto, além de disseminação através de vasos sanguíneos, o sistema linfático também contribui para a disseminação das células tumorais e o carcinoma de células escamosas de boca metastatiza preferencialmente através de vasos linfáticos (Myahara *et al.*, 2007). Essa migração das células tumorais para os linfonodos parece ser facilitada pela linfangiogênese, um processo de formação de novos vasos linfáticos a partir de outros vasos já pré-existentes ou a partir de células progenitoras endoteliais linfáticas (Ran *et al.*, 2010).

Há um aumento nas evidências de que a significância clínica e patológica da linfangiogênese possa ser avaliada através da densidade vascular linfática. (Martone *et al.*, 2005; Myahara *et al.*, 2007). Diversos estudos têm demonstrado que um aumento da densidade vascular linfática em alguns tumores, como os de mama e os CCEB, correlacionam-se com metástases linfonodais e menores taxas de sobrevivência (Myahara *et al.*, 2007; Ran *et al.*, 2010).

Estima-se também que a linfangiogênese tumoral tenha um potencial significativo não apenas no sítio primário, mas também nos linfonodos, de forma que o tumor primário induza o crescimento de novos vasos linfáticos nos linfonodos drenantes antes de metastatizar (Hirakawa, 2009). Entretanto, quando comparada com a linfangiogênese tumoral, o papel da linfangiogênese linfonodal permanece inexplorado (Ishii *et al.*, 2010).

Dentre as principais proteínas que regulam a linfangiogênese, estão o fator de crescimento endotelial vascular – C (VEGF-C) e o fator de crescimento endotelial vascular

– receptor 3, (VEGFR-3), que são fatores linfangiogênicos comumente expressos no endotélio linfático, nas células malignas, no infiltrado e no estroma tumoral (Ran *et al.*, 2010). Um aumento na expressão de VEGF-C e VEGFR-3 nas células tumorais têm sido correlacionados com metástase linfonodal e menor sobrevida dos pacientes (Ran *et al.*, 2010).

Assim, é importante uma melhor compreensão da linfangiogênese tumoral e linfonodal na disseminação das células tumorais no CCEB para que tumores com maior capacidade metastática possam ser detectados mais precocemente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA:

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é uma neoplasia maligna com origem nos queratinócitos do epitélio pavimentoso da cavidade bucal e representa aproximadamente 90% dos cânceres de boca. É o oitavo câncer mais comum no mundo e, em algumas regiões da América do Sul e do Sudeste Asiático, esta prevalência é ainda maior (Scully e Bagan, 2009A). No Brasil estima-se o CCEB como o sexto tipo de câncer mais prevalente (INCA, 2010). Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) previam para o ano de 2010 a ocorrência de 14.120 novos casos de câncer de boca para o Brasil (INCA, 2010). Nos últimos 30 anos, entretanto, a incidência mundial de CCEB tem diminuído (Patel *et al.*, 2011).

Devido a sua alta mortalidade e frequente natureza desfigurante, os cânceres de boca têm sido identificados como um significativo problema de saúde pública (Barasch *et al.*, 1994; Funk *et al.*, 2002). Avanços ocorridos na prevenção, nos métodos de tratamento e melhoras nos hábitos de vida nos últimos anos fizeram com que, na última década, o CCEB demonstrasse um maior aumento na sobrevida dos pacientes quando comparado aos demais cânceres de cabeça e pescoço (Pulte e Brenner, 2010), entretanto, sua taxa de sobrevida em 5 anos permanece baixa. Atualmente, a taxa de sobrevida em 1 ano é de aproximadamente 81% e, em 5 anos, é em torno de 50% (Sathyan *et al.*, 2006; Warburton *et al.*, 2007). Entretanto, este percentual decai bastante em pacientes com metástase (Curado e Hashibe, 2009).

Sua prevalência permanece entre os indivíduos do sexo masculino, entretanto, a diferença na proporção homem/mulher, está diminuindo (Scully e Bagan, 2009B). Observa-se na América do Sul um aumento nas taxas de incidência em mulheres e uma estabilidade nas taxas em homens (Curado e Hashibe, 2009). A doença ocorre mais frequentemente na faixa etária adulta, sendo que se inicia 90% em pacientes com mais de 45 anos de idade (Scully e Bagan, 2009A), entretanto, há um aumento no número de

casos em adultos jovens (Scully e Felix, 2006; Soudry *et al.*, 2010). Clinicamente, a maioria dos CCEB se inicia como uma ulceração superficial com progressão para invadir as estruturas profundas. A úlcera apresenta-se com margens e base irregulares, dura e elevada à palpação (Bagan *et al.*, 2010). Outra manifestação inicial é como um nódulo exofítico, com superfície verrucosa e com limites imprecisos, podendo ser sintomático ou assintomático (McDowell 2006; Bagan *et al.*, 2010). Outro aspecto clínico da doença é sua manifestação como lesões brancas ou eritroplásicas (Scully e Felix, 2006).

O carcinoma de células escamosas de boca clinicamente inclui o câncer de lábio que representa a maioria dos CCEB e o câncer intra-bucal. O CCEB intra-bucal afeta principalmente a língua, particularmente a borda lateral posterior (Scully e Bagan, 2009A), e o assoalho bucal (Bagan *et al.*, 2010). Outras áreas de envolvimento são mucosa jugal, região retromolar, gengiva, palato mole e menos frequentemente, dorso de língua e palato duro (Bagan *et al.*, 2010). Variações geográficas nas freqüências das localizações podem ser observadas em países do sul e sudeste asiáticos, incluindo a Índia, em que a mucosa jugal aparece como o principal sítio de acometimento (Sathyan *et al.*, 2006). Além disso, um estudo recente de Patel *et al.* (2011) demonstrou que parece haver uma mudança na epidemiologia das lesões em língua, com um aumento na incidência em mulheres brancas e jovens, na faixa etária entre 18 e 44 anos (Patel *et al.*, 2011).

Variações observadas nas idades de acometimento ou na frequência das localizações parecem ocorrer em função de diferenças na etiologia da doença. Nenhum único fator causal é responsável pelo câncer. O CCEB é principalmente causado por uma combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos, que agem de forma conjunta por um longo período de tempo (McDowell, 2006). Como qualquer outro tipo de câncer, o CCEB é causado por mutações no DNA, frequentemente espontâneas, mas aumentadas pela exposição a uma série de agentes mutagênicos. Esse acúmulo de mudanças genéticas leva os queratinócitos da cavidade bucal a uma habilidade de proliferação maior do que

o normal, tornando-os autônomos e com características de invasão através da membrana basal. Eventos mutagênicos podem se originar de agentes químicos (tais como os carcinógenos), agentes físicos (como as radiações ionizantes) e agentes biológicos (como os microorganismos, dentre eles o HPV) (Scully *et al.*, 2000; Scully e Felix, 2006; Scully e Bagan, 2009B).

O tabaco, seja na sua forma de fumo ou não, é ainda considerado o principal fator de risco em todo o mundo para o CCEB (Scully e Bagan, 2009B). O uso do betel, uma mistura de uma planta mascável com vários carcinógenos e aditivos adocicados, comercializado principalmente na Índia, seja com ou sem a adição de tabaco, se mostra carcinogênico para a cavidade bucal (Curado e Hashibe, 2009), colocando-o como responsável por mais de 50% dos casos de câncer de boca em alguns países (Scully e Bagan, 2009B). O tabaco representa um complexo de mistura de pelo menos 50 compostos carcinógenos, incluindo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como o benzopireno, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas (Scully e Felix, 2006). Algumas substâncias, chamadas de pró-carcinógenos, são produzidos após o metabolismo desses carcinógenos. Durante o processo de metabolismo dessas substâncias, várias enzimas estão envolvidas na ativação ou degradação de carcinógenos/pró-carcinógenos (Scully *et al.*, 2000).

Nos últimos 30 anos, observa-se mundialmente um declínio no uso do tabaco e este parece ser um dos responsáveis pela diminuição da incidência do CCEB (Patel *et al.*, 2011). No Brasil, em uma pesquisa recentemente divulgada pelo site do INCA, aponta que entre 2006 e 2010, a proporção de brasileiros fumantes caiu de 16,2% para 15,1%, sendo que o avanço mais expressivo ocorreu entre os homens, que em geral fumam mais do que as mulheres: passou de 20,2% para 17,9%. Entre as mulheres, porém, o nível (12,7%) permaneceu estável neste período (INCA, 2011).

A importância do estilo de vida no desenvolvimento do CCEB é representado além do tabaco, pelo álcool, que combinado ao tabaco, é também um dos principais fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento (Scully e Felix, 2006). Permanece incerto quais os mecanismos do álcool mais importantes na carcinogênese em boca. Estudos *in vitro*, mostram que o álcool modifica a permeabilidade da mucosa, o que facilitaria a penetração de diferentes substâncias, inclusive as carcinogênicas presentes no fumo, o que representa uma explicação para o sinergismo na ação álcool e fumo no câncer de boca (Carrard *et al.*, 2008). Atualmente, o consumo de álcool tem aumentado em várias populações e a faixa etária dos indivíduos consumidores está cada vez mais baixa (Carrard *et al.*, 2008).

Entretanto, apesar da importância desses hábitos causais, existem pacientes que desenvolvem a doença mesmo na ausência deles. Outros fatores implicados na ocorrência do CCEB são os seguintes: 10-15% dos casos de câncer bucal foram atribuídos às deficiências nutricionais (Scully e Bagan 2009B), como de vitaminas A, E ou C (Scully e Felix, 2006; Scully e Bagan, 2009B); recentemente, uma higiene bucal precária, doença periodontal ou perda dentária também têm sido destacadas como possíveis fatores de risco; uma relação ainda controversa entre o HPV 16 e os pacientes com CCEB, discutida em alguns trabalhos, também sugere um envolvimento deste microorganismo (Scully e Bagan, 2009B); e a susceptibilidade do hospedeiro parece também exercer um papel considerável, (Scully *et al.*, 2000), com pacientes que possuem uma habilidade prejudicada em metabolizar os carcinógenos, ou em reparar danos ao DNA mais propensos a desenvolverem o câncer (Scully e Felix, 2006). Nesses indivíduos que nunca fumaram ou beberam, diferenças consideráveis nos sítios e idade de ocorrência destes tumores têm sido vistas: esses pacientes tendem a ter menos de 50 anos de idade, serem mulheres (Curado e Hashibe, 2009) e a principal localização do tumor é em língua, seguida de gengiva mandibular (Dahlstrom *et al.*, 2008).

Uma série de desordens potencialmente malignas são também reconhecidas como fatores de risco ao desenvolvimento do CCEB, sendo a leucoplasia e a eritroplasia as mais importantes (Scully e Bagan, 2009B). Entretanto, apesar dos grandes avanços nos estudos, não há ainda um marcador capaz de prever essa transformação maligna individualmente nos pacientes (Scully e Felix, 2006).

As características clínicas do CCEB em estágios mais avançados são bem típicas, tornando fácil estabelecer o diagnóstico clínico, que, uma vez feito, deve sempre ser seguido da biópsia para a confirmação do diagnóstico (Bagan *et al.*, 2010).

O tratamento do CCEB envolve uma série de especialidades, incluindo cirurgiões, oncologistas, dentistas, nutricionistas, fisioterapeutas, dentre outras (Scully e Felix, 2006). A cirurgia é ainda o método mais aceito no tratamento definitivo. A introdução da radiação ionizante se tornou uma alternativa de tratamento não cirúrgico. Entretanto, na maioria dos pacientes com estágio avançado, a radioterapia é empregada em conjunto com a cirurgia, mais frequentemente oferecida como um tratamento pós-cirúrgico (Shah e Gil, 2009). A quimioterapia pode ser administrada em pacientes com avanço local da doença, juntamente com a irradiação, ou como uma quimioterapia de indução prévia ao tratamento local, ou ainda, como terapia paliativa em pacientes com doença recorrente ou metastática (Scully e Bagan, 2009B). Entretanto, diferentemente de outros cânceres de cabeça e pescoço, no CCEB primário, a resposta à quimioterapia de indução não se mostrou favorável a longo prazo (Shah e Gil, 2009). Estratégias de prevenção primária e secundária, incluindo mudanças nos hábitos de vida, auxiliam também no tratamento (Shah e Gil, 2009).

Há anos, o sistema de estadiamento clínico de tumores TNM (Tumor, *Nodal disease*, *Metastatic disease*), proposto pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), tem sido o padrão de classificação para caracterizar os tumores, propor a terapia mais adequada e, assim, estimar a sobrevivência dos pacientes (Greene e Sobin, 2008). O sistema

TNM descreve a extensão anatômica do câncer classificando separadamente os elementos T (tamanho do tumor), N (metástase nodal) e M (metástase distante) do indivíduo (QUADRO 1), agrupando-os depois em diferentes estágios (QUADRO 2). Os objetivos do sistema TNM são: auxiliar clínicos e investigadores no plano de tratamento, avaliação do prognóstico, estratificação dos pacientes para estudos terapêuticos e facilitar a comunicação (Greene e Sobin, 2008). Este sistema está sob contínua revisão pela UICC e *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (Kreppel *et al.*, 2010B). A sexta edição de classificação TNM dos cânceres de boca da UICC corresponde exatamente à classificação da AJCC (Greene e Sobin, 2008). De acordo com uma revisão feita por Kreppel *et al.* (2010B) para avaliar o valor prognóstico da sexta edição do UICC nos CCEB, o estadiamento T e N são bons preditores da sobrevida global dos pacientes com CCEB (Kreppel *et al.*, 2010B).

QUADRO 1

Sistema de estadiamento para o câncer oral e de lábio proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002)*

T – Tumor primário	
T _x	Tumor primário não pode ser avaliado.
T ₀	Sem evidência de tumor primário.
T _{is}	Carcinoma <i>in situ</i> .
T ₁	Tumor de até 2 cm em seu maior diâmetro.
T ₂	Tumor maior que 2 cm mas menor que 4 cm em seu maior diâmetro.
T ₃	Tumor maior que 4 cm em seu maior diâmetro.
T ₄	Tumor maior que 4 cm, com invasão das estruturas adjacentes.
N – Doença linfonodal	
N _x	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N ₀	Sem metástase linfonodal regional.
N ₁	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, com 3 cm ou menor em seu maior diâmetro
N ₂	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, maior que 3 cm e menor que 6 cm em seu maior diâmetro; ou em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro; ou em nódulos múltiplos, contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.

N ₃	Metástase em linfonodo maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
M – Doença metastática	
M _x	Metástases à distância não podem ser avaliadas.
M ₀	Sem evidência de metástase à distância.
M ₁	Metástase à distância.

QUADRO 2

Elaboração do estadiamento clínico TNM para o câncer oral e de lábio proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2002)*

Estágio I	T ₁	N ₀	M ₀
Estágio II	T ₂	N ₀	M ₀
Estágio III	T ₃	N ₀	M ₀
	T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₁	M ₀
Estágio IV	T ₃	N ₁	M ₀
	Qualquer T	N ₂	M ₀
	Qualquer T	N ₃	M ₀
	Qualquer categoria com T ₄		
	Qualquer categoria com M ₁		

Outra forma amplamente utilizada de prover fatores prognósticos suplementares a fim de aperfeiçoar o valor do estadiamento TNM e conseqüentemente auxiliar na escolha terapêutica é o uso das classificações histopatológicas do CCEB (Woolgar, 2006). Várias classificações vêm sendo usadas na literatura na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. Dentre essas classificações, uma bastante utilizada, é o método proposto por Bryne *et al.* (1992), que apresentou vantagem em relação aos métodos anteriormente propostos, uma vez que possuía um alto valor prognóstico e era de realização rápida, pois apenas as áreas de invasão eram utilizadas na gradação (Lourenço *et al.*, 2007). A Organização Mundial da

Saúde (OMS) propôs em 2005, uma classificação histopatológica mais simples, baseada no grau de diferenciação celular (Barnes *et al.*, 2005). Entretanto, a OMS afirma que a gradação histopatológica correlaciona-se pobremente com o desfecho do paciente, sendo que seu valor aumenta somente quando as margens invasivas profundas são avaliadas, o que foi inicialmente proposto por Bryne e colaboradores. Até o presente momento, porém, não há na literatura consenso sobre a classificação histopatológica que possua maior valor preditivo (Lourenço *et al.*, 2007).

O diagnóstico precoce é o fator mais importante para aumentar a sobrevida do paciente (Bagan *et al.*, 2010). Tumores descobertos em estágios iniciais oferecem excelentes taxas de cura, entretanto, uma vez que metástases regionais linfonodais tenham ocorrido, uma significativa queda na taxa de cura é esperada (Shah e Gil, 2009). Além disso, o diagnóstico feito em estágios iniciais também minimiza a extensão requerida na cirurgia (Bagan *et al.*, 2010).

2.2 OS VASOS LINFÁTICOS E A METÁSTASE

O sistema vascular compreende dois tipos de estruturas vasculares: os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos. Os primeiros fornecem oxigênio e nutrientes às células dentro dos tecidos. Durante este processo, os capilares sanguíneos extravasam plasma para que esse oxigênio e nutrientes possa ser efetivamente transportado para dentro das células alvo (Alitalo *et al.*, 2007; Hirakawa, 2009). A homeostase deste processo é mantida pelo sistema linfático, cuja função é coletar, através dos vasos linfáticos, o fluido intersticial tecidual periférico e retorná-lo à circulação sanguínea (Tammela *et al.*, 2005; Sleeman *et al.*, 2009). O fluido intersticial dos tecidos periféricos canalizado para os vasos linfáticos é drenado para um único ou, ocasionalmente, mais linfonodos (Sleeman *et al.*, 2009).

A metástase é definida como a disseminação do câncer do seu sítio de origem e subsequente colonização em órgãos distantes (Sahai, 2007). Vasos sanguíneos e vasos linfáticos, dentro ou próximo dos tumores, servem como condutor primário para as células tumorais metastáticas se disseminarem em vários tipos de tumores (Niimi *et al.*, 2001; Bolenz *et al.*, 2009). A metástase para os linfonodos regionais é o principal fator que afeta o prognóstico de pacientes com CCEB (Ishii *et al.*, 2010). Esse processo de invasão e disseminação para os linfonodos regionais do pescoço, comumente observado no carcinoma de células escamosas de boca no sítio primário, ocorre possivelmente, devido ao comportamento altamente invasivo deste carcinoma na região de cabeça e pescoço e à rica drenagem linfática presente (Kramer *et al.*, 2005).

Comparados aos vasos sanguíneos, os vasos linfáticos oferecem várias vantagens para invasão e transporte das células pré-metastáticas, tais como: descontinuidade da membrana basal e perda das junções célula-célula (Saharinen *et al.*, 2004; Alitalo *et al.*, 2007); um fluxo muito menor, o que aumenta a sobrevivência das células, pois minimiza o estresse a que elas são submetidas; além de uma concentração maior de ácido hialurônico, uma molécula com propriedades de sobrevivência e proteção celular. Assim, o sistema linfático é naturalmente equipado para transportar células através do corpo, garantindo a atividade e sobrevivência delas (Ran *et al.*, 2010).

Células tumorais que se dissociam da massa tumoral e estão aptas para entrar nos vasos linfáticos, são transportadas juntamente com o fluxo do fluido intersticial para os linfonodos que drenam os tecidos que circundam o tumor. As células tumorais podem então, formar tumores secundários dentro dos linfonodos (Sleeman *et al.*, 2009). O mecanismo preciso através do qual as células tumorais se movem preferencialmente em torno de um particular linfonodo permanece pouco definido (Shayan *et al.*, 2006). Foi inicialmente estabelecido que a invasão linfática era um processo passivo à medida que o tumor avançava. Entretanto, evidências recentes indicam que uma interação mais

complexa entre as células neoplásicas e o endotélio linfático parece ocorrer (Shayan *et al.*, 2006).

2.3 ANGIOGÊNESE E LINFANGIOGÊNESE

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio de vasos pré-existentes. É o resultado de um processo complexo e de muitos passos envolvendo remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação de célula endotelial, diferenciação, anastomoses e desenvolvimento do lúmen (Folkman, 1995). É atualmente aceito que a angiogênese tumoral é determinante tanto para o crescimento do tumor neoplásico primário como para o desenvolvimento de metástases (Folkman, 1990). Assim, muitos estudos demonstraram o papel da angiogênese como um mecanismo de suporte à disseminação hematogênica e de facilitadora do crescimento do tumor (Weidner *et al.*, 1991; Kyzas *et al.*, 2005). Em contraste, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na disseminação linfática (Longatto-Filho *et al.*, 2007). Dados clínicos e experimentais sugerem que a migração das células do tumor para dentro dos linfonodos, seja facilitado pela linfangiogênese, ou seja, o processo de geração de novos vasos linfáticos a partir de vasos pré-existentes (Tammela *et al.*, 2005; Ran *et al.*, 2010).

Os mecanismos precisos pelos quais os novos vasos linfáticos promovem a progressão do câncer não são bem compreendidos. Entretanto, alguns mecanismos têm sido descritos: uma modificação no funcionamento linfático e um aumento na densidade linfática alterariam o microambiente tumoral e sua propensão à metástase. Além disso, uma interação entre as células tumorais e a célula endotelial linfática parece ocorrer. A liberação de fatores de crescimento pela célula tumoral parece induzir a secreção de citocinas pelas células endoteliais linfáticas. Essas citocinas liberadas agem facilitando a migração celular e invasão em torno de um vaso ligando-se em receptores expressos pelas próprias células tumorais (Issa *et al.*, 2009; Botting *et al.*, 2010).

A noção de que a linfangiogênese pode ser induzida em tumores humanos é suportada pela presença de células endoteliais linfáticas em proliferação encontradas em estudos de melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e carcinoma colorretal (Zhao *et al.*, 2008; Sleeman *et al.*, 2009). O estudo de Myahara *et al.* (2007) investigou o significado clínico e patológico da linfangiogênese no CCEB. Os resultados mostraram que a densidade de vasos linfáticos correlacionou significativamente com metástase e baixas taxas de sobrevida (Myahara *et al.*, 2007). Estudos posteriores confirmaram também que a linfangiogênese promove condutos linfáticos adicionais para a disseminação das células no câncer (Zhao *et al.*, 2008; Sugiura *et al.*, 2009). Entretanto, alguns resultados têm sido controversos, uma vez que a linfangiogênese não pode ser detectada sempre em todos os tumores malignos de origem epitelial, ou, em outras palavras, nem sempre ela ocorre, ainda que em um mesmo tipo de câncer (Zhang *et al.*, 2009).

Um outro fator que tem sido investigado na linfangiogênese é o processo descrito como linfangiogênese linfonodal. Metástases linfonodais regionais usualmente ocorrem através do linfonodo sentinela, que é o primeiro linfonodo a receber drenagem linfática do tumor (Ran *et al.*, 2010). Um estudo em um modelo de melanoma em camundongos observou uma linfangiogênese aumentada no linfonodo drenante do tumor, quando comparado ao linfonodo não drenante (Harrel *et al.*, 2007). Em um outro modelo animal, de carcinoma nasofaríngeo, achados similares foram vistos: alargamento linfonodal acompanhado por um aumento dos sinus linfático e no diâmetro dos lumens (Qian *et al.*, 2006). O estudo de Hirakawa (2009) sugere, assim, que esta linfangiogênese associada ao tumor tem um potencial significativo não apenas no tumor primário, mas também nos linfonodos, de forma que o tumor primário induz também o crescimento de novos vasos linfáticos nos linfonodos antes da ocorrência da metástase. Em Ishii *et al.* (2010), investigou-se pela primeira vez se o tumor primário induzia linfangiogênese no linfonodo

sentinela em pacientes com CCEB. Os resultados sugerem que o tumor primário induz ativamente linfangiogênese no linfonodo sentinela antes de metastatizar (Ishii *et al.*, 2010).

A idéia de quantificar histologicamente os vasos sanguíneos em tumores sólidos iniciou-se com Noel Weidner e colaboradores em 1991, que fizeram uma quantificação dos vasos sanguíneos visualizados por técnica imunoistoquímica. Os resultados do estudo demonstraram uma correlação entre a densidade de vasos sanguíneos e as metástases linfonodais nos carcinomas de mama (Weidner *et al.*, 1991). Após a publicação do estudo, inúmeros outros trabalhos usando uma variedade de anticorpos que identificavam o endotélio sanguíneo e variados métodos de contagem, começaram a surgir (Nico *et al.*, 2008).

O estudo da densidade microvascular nos tumores sólidos é um método aceito na literatura para predizer o comportamento clínico do tumor, entretanto, resultados variáveis foram encontrados na associação entre densidade microvascular e sobrevida do paciente (Fox e Harris, 2004). Parte dessa variabilidade de resultados nesses estudos se deve ao anticorpo empregado e sua especificidade, ao método de contagem dos vasos, ao cálculo da densidade microvascular, à variabilidade do observador (especialmente na seleção do campo a ser contado) e à determinação do ponto de corte para uma vascularização aumentada (Vermeulen *et al.*, 2002).

A quantificação da densidade microvascular é usualmente feita tanto nas chamadas “hot spots”, as áreas de maior vascularização, conforme o método original proposto por Weidner *et al.* (1991), ou feita em campos microscópicos escolhidos aleatoriamente (Nico *et al.*, 2008). A seleção das “hot spots” é subjetiva e depende da experiência e treinamento do observador, existindo pouco consenso em relação ao número de “hot spots” a serem avaliadas, geralmente varia de um a cinco (Nico *et al.*, 2008). O termo “hot spots” foi usado uma vez que estas seriam supostamente as regiões

mais biologicamente agressivas, com o maior potencial angiogênico e conseqüentemente de disseminação (Fox e Harris, 2004). No modelo inicial, a área do tumor que contém o máximo número de microvasos a serem contados, é identificada em microscópio óptico no menor aumento (100x). Em seguida, o número de vasos identificados nessa área são contados no médio aumento (200x) e no aumento maior (400x). Ao final, cada contagem é expressa como o maior valor do número de microvasos identificados dentro de qualquer um dos campos, de médio ou maior aumento (Weidner *et al.*, 1991).

Para a contagem da densidade microvascular requer-se o uso de marcadores específicos de endotélio vascular e de procedimentos imunoistoquímicos para visualizar os microvasos (Nico *et al.*, 2008). Em comparação com os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos vinham sendo pouco estudados até recentemente, em função da falta de marcadores específicos para endotélio linfático. Com isso, muitos pesquisadores acreditavam que o tumor não podia induzir linfangiogênese devido à ausência de vasos linfáticos nos tumores (Zhang *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a descoberta de alguns anticorpos como anti-LYVE-1 (Jackson, 2001), anti-Prox-1 (Jackson, 2001), anti-VEGFR-3 (Pajusola *et al.*, 1992), anti-podoplanin (Schoppmann *et al.*, 2001) e D2-40 (Kahn e Marks, 2002), tornou possível distinguir de forma mais clara vasos linfáticos de vasos sanguíneos. Desde então, estudos imunoistoquímicos usando esses anticorpos têm sido relatados em várias malignidades, incluindo o câncer de cólon, gástrico, próstata, mama e o carcinoma de células escamosas de boca (Ohno *et al.*, 2007).

D2-40 é um anticorpo monoclonal recente, marcador do antígeno oncofetal M2A, também chamado de podoplanina (Longatto-Filho *et al.*, 2007). A podoplanina é uma glicoproteína transmembrana mucinóide especificamente expressa nas células endoteliais linfáticas, mas não nas células endoteliais sanguíneas. Estudos demonstraram que camundongos *knockout* para a podoplanina apresentaram alterações na formação

vascular linfática normal e presença de linfedema, sugerindo que sobre condições fisiológicas, ela exerce uma função no desenvolvimento vascular linfático (Yuan *et al.*, 2006; Kreppel *et al.*, 2010A).

Desde sua descoberta e recente liberação comercial, o anticorpo D2-40 vem sendo utilizado em estudos da linfangiogênese tumoral como marcador específico de vasos linfáticos (Myahara *et al.*, 2007; Longatto-Filho *et al.*, 2007; Marinho *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Bolenz *et al.*, 2009; Sugiura *et al.*, 2009). Nos estudos de Evangelou *et al.* (2005) e Ohno *et al.* (2007), realizou-se uma comparação da precisão de marcação entre os anticorpos anti-podoplanina e o D2-40, os resultados sugeriram que ambos os anticorpos são excelentes marcadores de endotélio linfático (Evangelou *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2007).

Entretanto, já se sabe que, além do endotélio linfático, a imunoreatividade do D2-40 é vista também em células neoplásicas. A presença desta marcação já foi descrita em vários tipos de câncer humano, como os de pulmão (Kadota *et al.*, 2009) e no CCEB (Yuan *et al.*, 2006; Kreppel *et al.*, 2010A). Os estudos realizados em CCEB demonstraram uma correlação entre a expressão neoplásica de podoplanina e a presença de metástases linfonodais, bem como piores taxas de sobrevida, suportando o papel desta proteína no desenvolvimento neoplásico (Yuan *et al.*, 2006; Kreppel *et al.*, 2010A) .

Em cânceres humanos, a análise da densidade vascular linfática tem sido realizada dentro da área de massa neoplásica, ou região intratumoral (Weidner *et al.*, 1991; Kizas *et al.*, 2005B; Myahara *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008) assim como na margem do tumor, ou região peritumoral (Kyzas *et al.*, 2005A; Longatto-filho *et al.*, 2007; Botting *et al.*, 2010), ou ainda, na periferia do tumor (Mohammed *et al.*, 2009). Até o momento, permanece controverso se as células cancerígenas metastatizam através de infiltração dos vasos linfáticos peritumorais pré-existentes ou a partir da introdução e invasão dos novos vasos linfáticos intratumorais (Zhao *et al.*, 2008). Vasos linfáticos intratumorais

foram associados a uma sobrevida menor e à presença de metástases nodais em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (Kyzas *et al.*, 2005A). Assim como vasos linfáticos peritumorais têm sido considerados funcionais, acessíveis e suficientes para metástases linfáticas em carcinoma de cérvix uterino e gástrico (Botting *et al.*, 2010; Coskun *et al.*, 2009). Em Ohno *et al.* (2007) mostrou-se pela primeira vez a evidência de que linfangiogênese intratumoral no CCEB varia dependendo da área e parece não ser induzida na área intratumoral profunda (Ohno *et al.*, 2007).

Embora a relativa importância de vasos linfáticos peri ou intratumorais nas metástases continuem em debate, parece mais claro que vasos linfáticos associados ao tumor são importantes nas metástases e no prognóstico do câncer (Shayan *et al.*, 2006).

Outra proteína também recentemente identificada e que tem sido usada na análise da densidade de vasos é a endogлина (CD105), uma proteína transmembrana altamente expressa apenas nas células endoteliais em proliferação (Fonsatti *et al.*, 2001). Até o momento, várias evidências suportam a idéia de que a densidade microvascular destacada pelo CD105 tem se mostrado um poderoso marcador de neovascularização (Duff *et al.*, 2003; Martone *et al.*, 2005). Um estudo em CCEB de língua demonstrou a alta expressão de CD105 como um preditor de prognóstico mais agressivo em lesões T1 e T2 (Chuang *et al.*, 2006). Outro estudo, em carcinoma de pulmão, sugere que uma terapia anti-angiogênica, especialmente voltada para o CD105, possa prover uma forma mais efetiva de tratamento para o tipo mais comum desta forma de câncer (Takase *et al.*, 2010). O CD105 tem demonstrado ser expresso principalmente em vasos sanguíneos peri e intratumorais (Yoshitomi *et al.*, 2008).

O aumento da expressão de fatores de crescimento do endotélio vascular - *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF's) linfo-específicos, em tumores primários, tem mostrado associação com o aumento na disseminação das células tumorais para linfonodos regionais (Bolz *et al.*, 2009). A linfangiogênese parece ser induzida

primariamente por um de dois fatores linfangiogênicos bem característicos: VEGF-C e VEGF-D, que têm sido definidos como um subgrupo dentro da família VEGF, devido à achados estruturais distintos e especificidade de receptor (Stacker *et al.*, 2004). Dentre esses dois fatores, o VEGF-C parece ser clinicamente mais significativo, porque sua expressão é frequentemente aumentada em tumores, enquanto o VEGF-D é altamente expresso em tecidos normais (Whitehurst *et al.*, 2007).

O papel do VEGF-C na linfangiogênese, progressão da doença e prognóstico do paciente tem sido extensivamente estudado em vários tipos de tumores humanos, incluindo o CCEB (Sugiura *et al.*, 2009). A expressão do VEGF-C está associada a um aumento de metástases linfáticas em carcinomas como gástrico (Han *et al.*, 2010), mama (Gu *et al.*, 2008), tireóide (Tian *et al.*, 2008), próstata (Trojan *et al.*, 2006) esofágico (Kozłowski *et al.*, 2011) e colorretal (Lin *et al.*, 2011). Em modelos experimentais, a expressão de VEGF-C resultou em linfangiogênese intratumoral e peritumoral associada a aumento de metástases linfáticas (Whitehurst *et al.*, 2007). Em Siriwardena *et al.* (2008), vasos linfáticos intratumorais e peritumorais foram examinados usando o marcador D2-40 em casos de carcinoma de células escamosas de boca e correlacionados com a expressão de VEGF-C e achados clinicopatológicos. Os resultados mostraram que VEGF-C produzido pelas células tumorais pode aumentar a linfangiogênese e invasão do tumor, levando a metástases linfonodais (Siriwardena *et al.*, 2008) .

A regulação do VEGF-C em pacientes linfonodo-positivos sugere que a avaliação dos níveis de VEGF-C em tecidos de cânceres de cabeça e pescoço no momento do diagnóstico talvez permita a identificação de um grupo de pacientes que são mais susceptíveis à disseminação metastática via linfática e permita a aplicação de terapias mais direcionadas. Assim, um manejo mais agressivo em tumores VEGF-C positivos pode ser considerado para evitar uma disseminação linfática tardia (O-charoenrat *et al.*, 2001).

A atividade linfangiogênica do VEGF-C é mediada pelo *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor - 3* (VEGFR-3), também chamado de Flt-4, um receptor de superfície celular tirosina-quinase expresso predominantemente restrito ao endotélio linfático (Lalla *et al.*, 2003; Saharinen *et al.*, 2004), mas que já foi detectado também em vasos sanguíneos de tumores malignos e de processos em cicatrização (Jüttner *et al.*, 2006). VEGF-C e VEGF-D são os únicos membros da família VEGF que se ligam ao VEGFR-3 (Stacker *et al.*, 2004). A ativação do VEGFR-3 através desses dois VEGF's parece induzir linfangiogênese (Stacker *et al.*, 2004).

O significado clínico da expressão de VEGFR-3 tem sido investigado nas células tumorais (Lalla *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Wasburton *et al.*, 2007;) e/ou nas células endoteliais, neste caso, como marcador da densidade vascular linfática (Chen *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004; Myahara *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2010). Tem sido proposto que o VEGF-C secretado pelas células tumorais se liga primariamente ao VEGFR-3 nas células tumorais e que, apenas o VEGF-C residual se liga ao VEGFR-3 nas células endoteliais linfáticas para promover a linfangiogênese (Donnen *et al.*, 2009). Assim, a expressão de VEGFR-3 nas células neoplásicas implica na possível existência de um *loop* autócrino, que possa promover ou sustentar o crescimento das células cancerígenas, além do seu potencial efeito linfangiogênico (Wasburton *et al.*, 2007). A presença de VEGFR-3 nas células endoteliais vasculares suporta os achados que indicam a família VEGF como importante mediadora parácrina para a angiogênese (Lalla *et al.*, 2003).

A ativação do VEGFR-3 parece ser crucial para a disseminação do tumor através de vasos linfáticos, porque o uso de anticorpo bloqueador de VEGFR-3 tem mostrado inibir tanto a formação de vasos linfáticos no tumor quanto a ocorrência de metástase linfática (Whitehurst *et al.*, 2007). Alguns estudos em CCEB sugerem que o VEGFR-3 exerce um papel importante na disseminação linfática e possa ser um marcador prognóstico na predição de metástases linfonodais (Wasburton *et al.*, 2007).

Embora a relação entre a expressão de VEGF-C e VEGFR-3 pelas células cancerígenas e ação linfangiogênica necessite ser melhor esclarecida, o envolvimento desses fatores na regulação da disseminação tumoral linfática pode revelar novos alvos e, com isso, permitir a idéia de uma terapia anti-linfangiogênica contra o câncer (Bolenz *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma de células escamosas de boca tem a via linfática como preferencial para a disseminação das células tumorais e correlações significativas da densidade vascular linfática com o desenvolvimento de metástases têm sido relatadas em muitos estudos. Estudar a linfangiogênese tumoral permitirá avaliar se o desenvolvimento de uma rede vascular linfática é um fator associado ao desenvolvimento de metástases nodais no CCEB. Além disso, a influência do ambiente linfonodal tem sido pouco avaliado em relação à disseminação tumoral, merecendo ser melhor estudado para a compreensão do desenvolvimento das metástases.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a linfangiogênese em carcinomas de células escamosas de boca e em linfonodos metastáticos e não metastáticos, associando esta avaliação ao desenvolvimento de metástases nodais e às demais características clinicopatológicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação da LVD, MVD, através dos anticorpos D2-40 e CD105, e das expressões tumorais de VEGF-C e VEGFR-3 com a presença de metástases nodais e com as demais características clinicopatológicas, tais como gênero, idade, localização, tamanho do tumor, presença de metástase nodal e gradação histológica.
- Avaliar LVD e MVD comparativamente nos linfonodos metastáticos e não metastáticos.
- Avaliar a associação da expressão de VEGF-C e VEGFR-3 com LVD e MVD, tanto no tumor primário como no linfonodo metastático.
- Avaliar a associação da expressão da podoplanina na região do fronte invasivo com a metástase nodal, gradação histológica e densidade vascular linfática.
- Avaliar a relação das variáveis estudadas com a sobrevida global dos pacientes.

5. METODOLOGIA

5.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra selecionada compreendeu 36 espécimes de carcinoma de células escamosas de boca e seus linfonodos associados, metastáticos ou não. Dos 36 espécimes, 22 foram obtidos dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2007 e 2009 e, 14 foram obtidos dos arquivos da Divisão Anatomopatológica do Hospital Araújo Jorge, (Goiânia, GO), entre os anos de 2003 e 2004.

Dados clínicos como gênero, idade, localização, tamanho do tumor, presença de metástase nodal e sobrevida do paciente, foram obtidos dos prontuários e laudos histopatológicos dos arquivos supracitados.

Foram incluídos no estudo materiais de arquivo, como lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina (HE) e blocos de parafina, referentes ao tumor primário e aos linfonodos removidos cirurgicamente. Todos os casos selecionados representavam lesões primárias, de pacientes que receberam como modalidade primária de tratamento a cirurgia.

Foram excluídos os casos localizados em lábio e orofaringe, assim como as lesões que não apresentavam dados clínicos completos, material insuficiente para o preparo das lâminas ou para as análises propostas.

Lâminas coradas em HE foram avaliadas para confirmação do diagnóstico e classificação histopatológica.

Os tecidos emblocados em parafina foram submetidos, em micrótomo por profissional experiente, a cortes histológicos com espessura de 3 μ m e foram montados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas para a realização da técnica imunoistoquímica.

5.2 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Segue abaixo, resumidamente, a sequência do protocolo, de acordo com recomendações dos fabricantes, modificado segundo resultados obtidos no decorrer do estudo de acordo com as condições ideais de trabalho:

1. Desparafinização inicial em estufa a 60°C por 8h seguida de incubação em xilol *overnight*, à temperatura ambiente, por 14h.
2. Desparafinização em xilol por 15 minutos à temperatura ambiente e hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%);
3. Lavagem em 5 banhos de água destilada.
4. Recuperação antigênica, em estufa ou banho-maria, conforme padronização. As lâminas foram imersas nas soluções descritas no quadro 3.
5. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em 5 banhos água destilada
6. Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 10% (v/v) em dois banhos de 15 minutos;
7. Incubação com os anticorpos primários anti-D2-40, anti-CD105, anti-VEGF-C e anti-VEGFR-3, em câmara humidificada, conforme protocolo descrito no quadro 3;
8. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
9. Incubação como sistema de detecção Dako Advance™ HRP (Dako, USA) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
10. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
11. Incubação com solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB) – Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen System – e em seguida, 5 banhos de água destilada;

12. Contracoloração com hematoxilina por 30 segundos e em seguida, 5 banhos de água destilada;

13. Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanização em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Tissue-Mount™(Tissue-Clear® based medium).

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário e como controles positivos foram utilizados os seguintes fragmentos: linfangioma em língua (D2-40); granuloma piogênico em mucosa bucal (CD105); carcinoma de células escamosas em mucosa bucal (VEGF-C); e placenta humana (VEGFR-3).

QUADRO 3

Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo.

Anticorpo Primário	Clone / Fabricante	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
D2-40	Clone D2-40 – Dako Cytomation	Ácido cítrico pH 6.0 em banho-maria por 30', à 96°C	1:100	1h/TA
Anti-CD105	Clone SN6h – Dako Cytomation	Pepsina pH1.8 em estufa por 13', à 37°C	1:30	1h/TA
Anti-VEGF-C	Clone Z-CVC7 – Invitrogen	Ácido cítrico pH 6.0 em banho-maria por 30', à 96°C	1:100	1h/TA
Anti-VEGFR-3	Clone KLT9 – Leyca Byosystems	Ácido cítrico, pH 6.0 em banho-maria por 30', à 96°C	1:10	1h/TA

TA: Temperatura ambiente

5.3 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Todas as reações foram avaliadas em microscópio óptico de luz, marca Zeiss por um único observador, com calibração prévia, sem conhecimento prévio das características clínicas.

5.3.1 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DE D2-40 E CD105

A análise da densidade vascular dos marcadores D2-40 e CD105 foi feita baseada no método proposto por Weidner *et al.* (1991), mas com modificações. Inicialmente, com objetiva para magnificação 10x, foi identificada a área com maior vascularização, denominada *hot spot*. Tendo essa área como referência, a contagem dos vasos foi feita em aumento de 400x em 10 campos, que foram contados ao longo de um único eixo (x ou y) delimitado pela área de *hot spot*, respeitando a seguinte determinação: como apenas 10 campos foram avaliados por cada caso, utilizando um retículo de contagem para delimitação de campos, o seguinte cálculo foi realizado para determinar o período entre um campo a ser avaliado e o outro, dentro do eixo selecionado previamente:

$$l = (n/10) - 1$$

onde “n” é o número total de campos constantes do longo eixo orientado pelo *hot spot*, sendo considerados apenas números inteiros, sem arredondamento. E “l” é o número de campos que constituem o intervalo entre dois campos a serem analisados.

Isso possibilitou a avaliação da maior área possível da seção tecidual e não privilegiou apenas as áreas marcadas.

Esta análise no tumor primário foi feita tanto na área peritumoral quanto na área intratumoral. Nos linfonodos foi realizada contagem em toda a sua extensão, sem a delimitação intratumoral ou peritumoral.

A extração da média obtida nos 10 campos de avaliação determinou a densidade de vasos encontrada em cada caso, considerando uma área de 0.1024 mm² (aumento de 400x). No tumor primário, a soma das densidades intratumoral e peritumoral foi determinada como a densidade vascular total da neoplasia.

Para a análise estatística, a obtenção do ponto de corte na determinação entre tumores com alta densidade vascular e tumores com baixa densidade vascular foi feita

considerando a média (se distribuição normal) ou mediana (se distribuição não normal) dos valores obtidos em todos os tumores.

5.3.2 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DE D2-40 NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

A análise da marcação de D2-40 nas células neoplásicas do parênquima tumoral foi também realizada. Foi considerada como positividade a presença de marcação, independentemente da intensidade.

Considerando que alguns trabalhos têm relacionado a presença desta marcação com uma maior agressividade do tumor (Yuan *et al.*, 2006; Kadota *et al.*, 2009; Kreppel *et al.*, 2010) a avaliação foi feita na área descrita na literatura como a de maior representatividade do comportamento clínico da lesão maligna, o fronte de invasão (Bryne *et al.*, 1992). A análise semiquantitativa foi então realizada no fronte de invasão, onde foi identificado o percentual de células positivamente marcadas pelo D2-40, seguindo os seguintes escores:

- 0- Ausência de marcação
- 1- Menos de 50% das células marcadas
- 2- Entre 50% e 75% das células marcadas
- 3- Mais de 75% das células marcadas

Para a análise estatística, os tumores com escores 0 e 1 foram considerados negativos e os tumores com escores 2 e 3 foram considerados positivos para a marcação.

5.3.3 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DE VEGF-C E VEGFR-3

Devido à variabilidade na intensidade de marcação, foi considerado como positividade as células que expressavam um padrão de marcação francamente evidente. As marcações de VEGF-C e VEGFR-3 das células neoplásicas foram feitas semelhante ao método de avaliação descrito para a análise da densidade vascular. Inicialmente, com objetiva para magnificação 10x, foi identificada a área com maior concentração de

marcação forte, denominada *hot spot*. Tendo essa área como referência, a determinação do percentual de células fortemente marcadas, foi feita em aumento de 400x em 10 campos, que foram contados ao longo de um único eixo (x ou y) delimitado pela área de *hot spot*, respeitando a seguinte determinação: como apenas 10 campos foram avaliados por cada caso, utilizando um retículo de contagem para delimitação de campos, o seguinte cálculo foi realizado para determinar o período entre um campo a ser avaliado e o outro, dentro do eixo selecionado previamente:

$$l = (n/10) - 1$$

onde “n” é o número total de campos constantes do longo eixo orientado pelo *hot spot*, sendo considerados apenas números inteiros, sem arredondamento. E “l” é o número de campos que constituem o intervalo entre dois campos a serem analisados.

Isso possibilitou a avaliação da maior área possível da seção tecidual.

O percentual de marcação francamente evidente em cada campo foi determinado seguindo os seguintes escores:

- 1- Até 25% das células marcadas
- 2- Entre 26 % e 50% das células marcadas
- 3- Entre 51% e 75% das células marcadas
- 4- Mais de 75% das células marcadas

A extração da média entre os escores obtidos nos 10 campos de avaliação determinou o escore final para cada tumor.

Para a análise estatística, a obtenção do ponto de corte na determinação entre tumores positivos para a expressão de VEGF-C ou VEGFR-3 e tumores negativos, foi feita considerando a média (se distribuição normal) ou mediana (se distribuição não normal) do escore final obtido em todos os tumores.

5.4 GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES

A classificação histopatológica dos tumores foi realizada nos cortes histológicos corados em HE, utilizando-se dois sistemas como referência: o método preconizado pela OMS (Barnes *et al.*, 2005) e o desenvolvido por Bryne *et al.* (1992).

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS, em 2005, baseou-se no grau de diferenciação celular e permitiu o agrupamento desta neoplasia em três categorias. Os CCEB foram então classificados em bem, moderadamente e pouco diferenciados (QUADRO 4).

Pela metodologia de Bryne *et al.* (1992), as características histopatológicas do fronte de invasão tumoral são avaliadas, utilizando-se quatro parâmetros morfológicos: queratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e resposta do hospedeiro ao tumor (QUADRO 5), esta avaliada pela intensidade do infiltrado inflamatório. Cada um desses parâmetros é avaliado individualmente e recebem pontuações que variam entre 1 e 4. A soma dos pontos em cada parâmetro, traduz a gradação final da lesão, em que, quanto maior o grau atribuído ao tumor, menor é a sua diferenciação.

Desta forma, o valor final da gradação varia de 4 a 16, sendo que: valores entre 4-7 indicam tumores bem diferenciados; valores entre 8-12 indicam tumores moderadamente diferenciados; e valores entre 13-16 indicam tumores mal diferenciados.

A utilidade de cada um dos métodos de gradação como fator de prognóstico para o CCEB foi testada em análises estatísticas de sobrevida.

Além disso, a associação entre a gradação realizada no fronte invasivo e a marcação neoplásica de D2-40 (podoplanina) foi também avaliada.

QUADRO 4

Sistema de gradação histopatológica para o carcinoma de células escamosas de boca proposto pela OMS (Barnes *et al.*, 2005)

Classificação	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima queratinização
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca queratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

QUADRO 5

Sistema de gradação histopatológica para o carcinoma de células escamosas de boca proposto por Bryne e colaboradores (Bryne *et al.*, 1992).

Parâmetro morfológico	Gradação			
	Valor 1	Valor 2	Valor 3	Valor 4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (> 50% das células)	Moderadamente queratinizado (20-50% das células)	Queratinização mínima (5-20% das células)	Queratinização ausente (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pelomorfismo nuclear pequeno (>75% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear moderado (50-75% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear abundante (25-50% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0-25% das células maduras)
Padrão de invasão	Expansivo, bordas tumorais amplas	Infiltrante, feixes, bandas ou cordões sólidos	Cordões ou pequenos grupos com mais de 15 células	Células individuais ou pequenas grupos com menos de 15 células
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

5.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES

Definiu-se para o estudo da sobrevida dos pacientes, para fins de análise estatística, o início da observação como sendo a data da cirurgia de ressecção do tumor e, definiu-se como evento em estudo, o óbito. O período de acompanhamento foi definido como o tempo entre a data da cirurgia e a data do óbito.

Os pacientes que abandonaram o tratamento nos referidos hospitais (falta de seguimento), ou aqueles que evoluíram a óbito por causas não relacionadas à doença em estudo, ou ainda, aqueles que estavam vivos ao final da observação (Janeiro/2011), foram incluídos no estudo como dados “censurados”. Nestes casos, a data final de acompanhamento foi considerada como sendo o último registro do paciente no prontuário (Clayton e Hills, 1993; Altman *et al.*, 1995).

Desta forma, o período compreendido entre as datas inicial (data da cirurgia) e final (data do óbito ou data do último registro), foi definido como o período de sobrevida global dos pacientes. A partir deste dado foram construídos os modelos uni e multivariados de análise da sobrevida.

Segundo Altman *et al.* (1995), a análise de sobrevida entre mais de dois grupos de uma mesma variável ocasiona diminuição no poder estatístico dos testes (Altman *et al.*, 1995). Desta forma, as variáveis que não eram categorizadas em dois grupos, foram categorizadas. Somente as variáveis gradação histopatológica tipo OMS e gradação histopatológica tipo Bryne, necessitaram de ser dicotomizadas em tumores diferenciados, compreendendo o grupo dos tumores bem diferenciados; e tumores indiferenciados, compreendendo o grupo dos tumores moderadamente e pouco/mal diferenciados.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados usando o programa de estatística SPSS (para Windows versão 17.0, Chicago, IL). A análise da distribuição normal foi feita usando o teste Shapiro-Wilk. Análises comparativas foram feitas usando o *teste t de student* ou Mann-Whitney. Análises de associação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos descritos e as características clínicopatológicas avaliadas (gênero, idade, localização, tamanho do tumor, gradação histológica e presença de metástase nodal) foram feitas usando o teste qui-quadrado de Pearson.

A análise da sobrevida foi inicialmente construída com o modelo de Cox univariado, no qual as variáveis que demonstraram nível de significância $<0,20$ foram incluídas na etapa seguinte do modelo Cox multivariado, com seleção através do método Forward Wald. *Hazard ratios* e intervalos de confiança de 95% foram determinados. Em todas as análises o nível de significância admitido foi $p<0,05$.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEPE-UFMG), sob o número 167/10 (ANEXOS), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS n^o 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste trabalho estão apresentados na forma de artigo: **“Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes”**. E, neste capítulo, os resultados estão também descritos de maneira mais completa.

6.1 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Características clínicopatológicas:

O estudo avaliou 36 espécimes cirúrgicos de carcinoma de células escamosas de boca e seus linfonodos associados, metastáticos ou não. As características clínicopatológicas estão apresentadas na tabela 1. Os pacientes tinham média de idade de 58 anos (intervalo, 24-90 anos) e incluiu 25 homens (69,4%) e 11 mulheres (30,6%). A região de língua e/ou assoalho bucal foi a mais acometida em 30 (88,3%) indivíduos e os demais 6 (16,7%) casos ocorreram em gengiva, região retromolar, palato duro e mucosa jugal. Vinte e quatro tumores (66,7%) tinham tamanho superior a 40 mm e foram classificados como T3T4 e 12 tumores (33,3%) tinham 40 mm ou menos de tamanho e foram classificados como T1T2. Quanto à gradação histopatológica tipo OMS, 10 tumores (27,8%) foram classificados como bem diferenciados e 13 (36,1%) como moderadamente e pouco diferenciados, cada. Na gradação histopatológica tipo Bryne, um tumor não pôde ser avaliado e, entre os 35 avaliados, 10 tumores (28,6%) foram classificados como bem diferenciados, 19 (40,4%) como moderadamente e 6 (12,8%) como mal diferenciados. A metástase nodal foi confirmada histologicamente em 63,9% dos casos e apenas em uma amostra não foi realizada a dissecação nodal, sendo a definição do status nodal neste caso obtido dos dados clínicos.

TABELA 1

Características clinicopatológicas de 36 casos de carcinoma de células escamosas de boca

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	
Masculino	25 (69,4)
Feminino	11 (30,6)
Idade (anos)	
≤ 45	7 (19,4)
> 45	29 (80,6)
Localização	
Língua e/ou assoalho bucal	30 (83,3)
Outras	6 (16,7)
Tamanho	
≤ 4 cm (T1T2)	12 (33,3)
> 4 cm (T3T4)	24 (66,7)
Gradação OMS	
Bem diferenciados	10 (27,8)
Moderadamente	13 (36,1)
Pouco	13 (36,1)
Gradação Bryne*	
Bem	10 (28,6)
Moderadamente	19 (40,4)
Mal	6 (12,8)
Metástase nodal	
Sim	23 (63,9)
Não	13 (36,1)

*Em um caso não foi possível determinar a região do fronte invasivo.

Avaliação do tumor primário:

A densidade de vasos linfáticos média intra e peritumoral foi 2.95 ± 3.30 e 2.96 ± 2.23 , respectivamente, enquanto a densidade de microvasos média intra e peritumoral foi 7.40 ± 4.55 e 6.25 ± 3.92 , respectivamente. Não houve diferença significativa entre as densidades vasculares nas áreas intra e peritumoral ($p > 0,05$). A média da densidade total de vasos linfáticos encontrada nos tumores foi 5.87 ± 4.81 , sendo menor que a média da densidade total de microvasos neoformados que foi 13.66 ± 7.30 ($p > 0,05$).

Nenhuma associação significativa entre a densidade vascular linfática e a presença de metástase nodal foi encontrada, entretanto, considerando os tumores metastáticos, apenas 39% exibiram alta LVD na região intratumoral ($p > 0,05$), enquanto a maioria (52%), demonstrou uma alta LVD na região peritumoral ($p > 0,05$). Uma alta LVD peritumoral esteve associada significativamente também com os tumores localizados na região de língua e/ou assoalho bucal ($p = 0,019$). Além disso, uma forte associação entre a LVD e o tamanho do tumor foi vista: em 83% dos tumores com tamanho T1/T2 houve alta LVD intratumoral e total, enquanto apenas 8 (33%) dos tumores com tamanho T3/T4 tiveram uma alta LVD intratumoral e total ($p = 0,005$). Houve também associação entre uma alta LVD intratumoral e o sexo masculino ($p = 0,015$). Observamos também que os tumores classificados pelo método OMS como bem diferenciados apresentaram mais frequentemente uma alta LVD intra e peritumoral ($p = 0,063$), sendo o resultado estatisticamente significativo ao consideramos a densidade total da neoplasia ($p = 0,02$). Nenhuma outra associação significativa foi observada entre a LVD e as demais características clinicopatológicas.

Tumores com alta densidade microvascular estiveram associados significativamente com a presença de metástase nodal ($p = 0,02$). Esta associação da MVD com a presença de metástase nodal se manteve nos parâmetros intra e peritumoral, embora não estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Não houve nenhuma outra associação

significativa entre MVD e as demais características clinicopatológicas como gênero, idade, localização, tamanho e gradação histológica ($p>0,05$).

Em 15 tumores (43,%) houve expressão da podoplanina na área do fronte invasivo. O teste qui-quadrado mostrou uma associação significativa entre a gradação histopatológica no fronte e a expressão da podoplanina ($p=0,001$). Em 10 (100%) dos tumores bem diferenciados, não houve expressão de podoplanina nas células tumorais, enquanto apenas 1 tumor (5%) mal diferenciado apresentou ausência da expressão da podoplanina. Entre os 15 tumores com expressão positiva para a podoplanina, 11 (73%) tiveram a presença da metástase nodal ($p>0,05$), embora esta não tenha sido uma diferença estatística. Não houve também, diferença significativa na densidade vascular linfática conforme a expressão de podoplanina nas células tumorais ($p>0,05$).

Ao investigarmos a influência do VEGF-C e do receptor VEGFR-3 na proliferação vascular linfática, encontramos associação significativa entre a expressão de VEGFR-3 e uma alta LVD intratumoral ($p=0,04$). Entretanto, não encontramos uma associação significativa entre a expressão de VEGF-C e a LVD, embora tenha sido observado que 56% dos tumores VEGF-C positivos apresentaram alta densidade de vasos linfáticos total ($p>0,05$). Quanto à influência do VEGF-C na densidade de microvasos neoformados, observou-se uma associação significativa entre a expressão de VEGF-C e uma alta MVD intratumoral ($p=0,051$).

Nenhuma associação foi demonstrada entre as expressões de VEGF-C e VEGFR-3 com a metástase nodal, entretanto, observou-se que 75% dos tumores VEGF-C positivos tinham metástase nodal ($p>0,05$). Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a expressão de VEGF-C e VEGFR-3 e as demais características clinicopatológicas ($p>0,05$).

Avaliação dos linfonodos:

Na análise dos linfonodos, a média das densidades de vasos linfáticos nos linfonodos metastáticos e não metastáticos foram 2.39 ± 1.74 e 0.29 ± 0.34 , respectivamente. A média das densidades de microvasos foram 5.95 ± 3.82 (metastático) e 1.99 ± 1.85 (não metastático). MVD e LVD nos linfonodos metastáticos mostraram-se significativamente maiores quando comparadas às densidades nos linfonodos não metastáticos ($p < 0,0001$). Entretanto, não houve associação significativa entre a expressão de VEGF-C e a densidade de vasos linfáticos ou a densidade de microvasos neoformados nos linfonodos ($p > 0,05$). Não houve também nenhuma associação significativa entre a expressão de VEGFR-3 e densidade vascular linfática ($p > 0,05$).

Quanto à expressão de D2-40 pelas células tumorais nos linfonodos metastáticos, observou-se a presença de expressão de podoplanina em apenas 25% (4/16) dos linfonodos metastáticos avaliados. Nestes linfonodos com expressão de podoplanina, 100% dos casos tinham uma alta LVD e os tumores primários na região do fronte invasivo foram classificados como tumores indiferenciados, sendo 3 como moderadamente e 1 mal diferenciado ($p > 0,05$).

Análise da sobrevida:

O período de acompanhamento dos casos, considerado como o de sobrevida dos pacientes, variou entre 0 e 49 meses, com média de 21,4 meses e mediana de 22 meses.

Vinte e quatro indivíduos (64,7% do total de 36 casos) permaneceram vivos ou puderam ser acompanhados até o final do primeiro ano após a cirurgia, 17 indivíduos (47,2%) ao final do segundo ano, 6 indivíduos (16,7 %) ao final do terceiro ano, 2 pacientes (5,6%) ao final do quarto ano e ao final do quinto ano, nenhum paciente estava vivo ou não pôde ser acompanhado até o fim deste ano (0%) (FIGURA 1).

O seguimento foi considerado completo (data de óbito disponível nos registros) para 36,1% dos casos (13/36), sendo os demais considerados “censurados” para a

análise estatística. Dentre os 23/36 censurados (63,9%) da amostra, 25% (9/36) puderam ser acompanhados até o final da observação (Janeiro/2011) e permaneciam vivos e 5,6% (2/36) foram à óbito por causas não relacionadas ao CCEB. Os demais 33,3% (12/36) censurados abandonaram o acompanhamento ou não puderam ser acompanhados até o final da observação (Janeiro/2011) nos referidos hospitais (TABELA 2).

FIGURA 1

Evolução anual da sobrevivência dos 36 pacientes em estudo

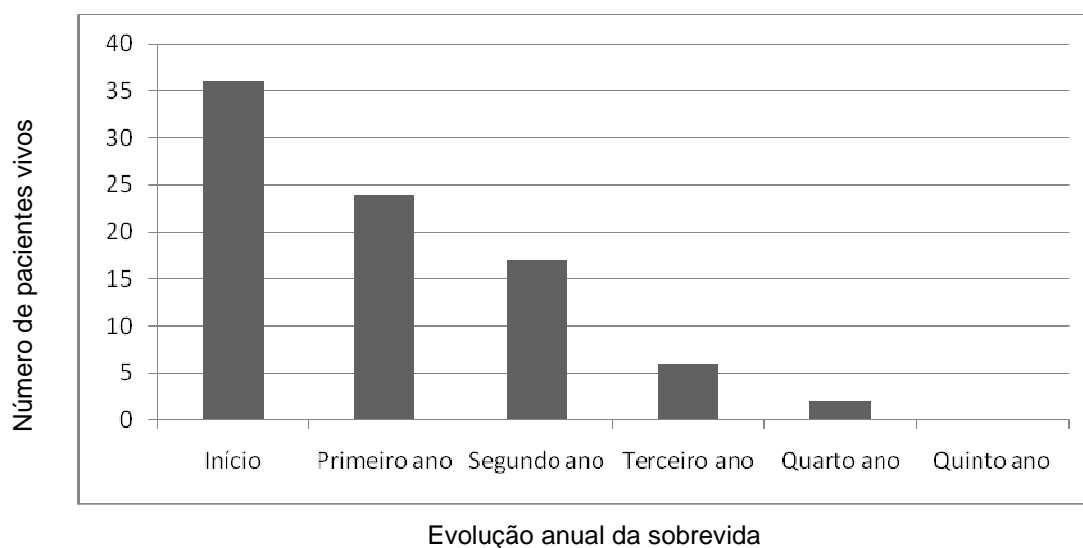


TABELA 2

Distribuição dos casos segundo seguimento

Seguimento	Número de casos (%)
Completo	13 (36,1%)
Censurado	23 (63,9%)
- Vivos ao final da observação	9 (25%)
- Óbito por outras causas	2 (5,6%)
- Perda de seguimento	12 (33,3%)

Na análise univariada da sobrevida construída com o modelo de Cox (TABELA 3), somente as variáveis metástase nodal, classificação histopatológica do tumor tipo OMS, densidade peritumoral de microvasos e densidade microvascular no linfonodo não metastático, demonstraram nível de significância menor que 0.20 e foram incluídas no modelo multivariado de Cox

Após realização da análise multivariada (TABELA 4) com método de seleção *Forward Wald*, obtivemos os seguintes resultados: apenas as variáveis como classificação histopatológica do tumor tipo OMS e densidade microvascular peritumoral é que se mostraram como possíveis indicadores de prognóstico no CCEB.

Observou-se que os indivíduos com tumores indiferenciados tiveram uma tendência de sobrevida menor que os indivíduos com tumores diferenciados (FIGURA 2A) ($p=0.053$). Os tumores com alta MVD peritumoral tiveram sobrevida menor que os tumores com baixa MVD peritumoral (FIGURA 2B) ($p=0.017$). Desta forma, observamos uma tendência dos tumores indiferenciados e tumores com alta densidade de microvasos peritumorais se mostrarem como indicadores de um pior prognóstico em pacientes portadores de CCEB.

TABELA 3

Análise univariada da sobrevida segundo modelo de Cox

Variável	HR (IC95%)	Valor de p
Gênero	1.05 (0.32-3.43)	0,94
Idade	0.8 (0.22-2.95)	0,737
Localização	0.78 (0.17-3.54)	0,748
Tamanho	1.84 (0.51-6.72)	0,354
Gradação OMS	3.52 (0.77-16.22)	0,106*
Gradação Bryne	0.72 (0.22-2.04)	0,593
Metástase nodal	2.64 (0.72-9.7)	0,144*
LVD intratumoral	0.59 (0.19-1.81)	0,353
LVD peritumoral	1.07 (0.36-3.22)	0,9
LVD total	1.18 (0.4-3.54)	0,763
MVD intratumoral	0.78 (0.25-2.38)	0,657
MVD peritumoral	2.61 (0.85-8.02)	0,094*
MVD total	1.32 (0.44-3.94)	0,619
VEGF-C expressão tumoral	0.61 (0.19-1.98)	0,406
VEGFR-3 expressão tumoral	0.76 (0.26-2.28)	0,627
Podoplanina expressão no fronte	1.92 (0.6-6.09)	0,27
LVD no linfonodo metastático	1.01 (0.24-4.22)	0,995
LVD no linfonodo não metastático	1.24 (0.36-4.27)	0,729
MVD no linfonodo metastático	0.91 (0.22-3.73)	0,894
MVD no linfonodo não metastático	3.6 (0.93-13.94)	0,064*
VEGF-C no linfonodo metastático	0.58 (0.13-2.61)	0,48
VEGFR-3 no linfonodo não metastático	1.33 (0.3-5.96)	0,706
Podoplanina no linfonodo não metastático	1.25 (0.25-6.2)	0,785

* Nível de significância <0,20

HR: *Hazard ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%

TABELA 4

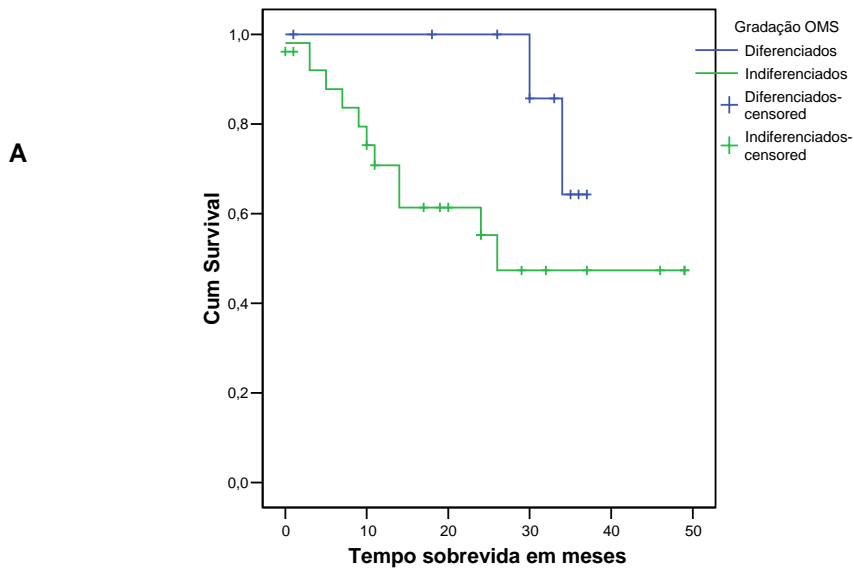
Análise multivariada da sobrevida segundo modelo de Cox

Variável	HR (IC95%)	Valor de p
Gradação OMS		
Indiferenciados	5.926 (0.977-35.94)	0.053
Diferenciados	1	
MVD peritumoral		
Alta	5.78 (1.37-24.42)	0.017*
Baixa	1	

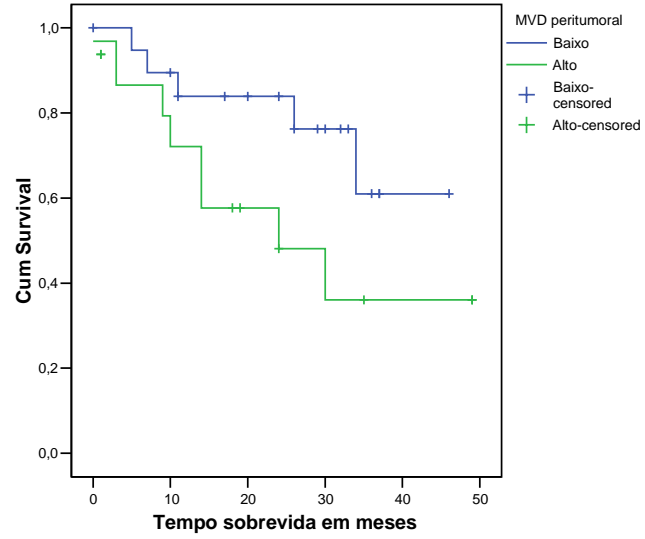
* Diferença estatisticamente significativa

FIGURA 2

Curvas de sobrevida das variáveis gradação histopatológica do tumor tipo OMS e densidade microvascular peritumoral.



B



6.2 ARTIGO

“Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and associated lymph nodes”.

(submetido à *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*).

Title: Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes.

Authors:

Sílvia F SOUSA, DDS^a; Frederico O GLEBER-NETTO, DDS^a;

Helenisa Helena OLIVEIRA-NETO, DDS, MSc^b; Aline C BATISTA, DDS, PhD^c; Mauro

Henrique NG ABREU DDS, PhD^d;

Maria Cássia F AGUIAR, DDS, PhD^{e*}

Authors positions and Institutional affiliations

^aMaster's student. Department of Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ^bDoctoral student. Department of Stomatology (Oral Pathology), School of Dentistry, Federal University of Goiás, Brazil; ^cProfessor, Department of Stomatology (Oral Pathology), School of Dentistry, Federal University of Goiás, Brazil; ^dProfessor, Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ^eProfessor, Department of Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding author**

Maria Cássia Ferreira de Aguiar, PhD
Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Avenida Antônio Carlos, 6627, Sala 3201, Pampulha
CEP: 31.270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.
Telephone number: +55 31 34092476 - Fax number: +55 31 34092430
E-mail: mcaguiar@odonto.ufmg.br, cassiafaster@gmail.com

Disclosure of funding received

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (#143524/2010-0) and from the Pró-Reitoria da Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. Dr. Aguiar and Dr. Batista are research fellows of CNPq.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and in the associated lymph nodes and podoplanin expression in neoplastic cells at the invasive front. Additionally, the association of the considered parameters with lymph node metastasis was also investigated. We used immunohistochemistry to examine primary tumors and lymph nodes, regardless of metastasis. Lymphatic vessel density (LVD) and microvessel density (MVD) were assessed by antibodies D2-40 and CD105, respectively, in intratumoral and peritumoral areas and in lymph node regions. VEGF-C and VEGFR-3 expression was evaluated in tumor cells and D2-40 (podoplanin) expression in parenchymal cells found at the invasive front. The majority of metastatic tumors showed high peritumoral LVD and we found a strong association of LVD with the size and localization of tumors. MVD was statistically associated with metastasis, and a significant association between the lymphangiogenic factors and the density of vessels in the intratumoral region was also seen. The well-differentiated tumors did not express podoplanin. LVD and MVD were higher in metastatic lymph nodes than non-metastatic lymph nodes. The enhanced vascular network in metastatic lymph nodes reinforces the previous reports of lymphangiogenesis occurrence in lymph nodes. Moreover, the expression of podoplanin by more undifferentiated tumor cells suggests that this protein could be an indicator of tumor aggressiveness.

Key words: oral squamous cell carcinoma; angiogenesis; lymphangiogenesis; immunohistochemistry; podoplanin expression; lymph nodes.

INTRODUCTION:

Metastasis is the spread of cancer from its site of origin and the subsequent colonization of distant organs.¹ The penetration of tumor cells into lymphatic vessels within or close to tumors serve as the primary conduit for metastatic tumor cell dissemination in many types of cancer.² This process of local invasion and spread to regional lymph nodes in the neck is commonly seen in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and is facilitated by the highly invasive behavior and rich lymphatic drainage in the cervical region.³

The exact mechanism by which tumor cells move preferentially towards particular lymph nodes remains poorly understood,⁴ but experimental and clinical data suggest that the migration of tumor cells into lymph nodes is facilitated by lymphangiogenesis, a process that generates new lymphatic vessels from preexisting lymphatics.⁵ Tumor cells can actively induce lymphangiogenesis through the production of lymphangiogenic growth factors, such as vascular endothelial growth factor - C (VEGF-C), which binds to VEGF receptor-3 (VEGFR-3). These growth factors seem to be key regulators of lymphangiogenesis.⁶ Changes in lymphatic vessel organization have been observed even at early stages of tumor formation.¹

The expansion of lymphatic networks within the lymph node was shown to be stimulated by VEGF-C overexpression even before the onset of metastasis,⁷ and the new concept of lymph node lymphangiogenesis was established.⁸ However, as compared with tumor lymphangiogenesis, the role of lymph node lymphangiogenesis remains largely unexplored.⁹ The development of the D2-40 antibody, a specific marker for lymphatic vessel endothelium, allows the investigation of lymphangiogenesis in human cancers.¹⁰ Many studies have demonstrated that the quantification of lymphatic vascular density (LVD), indicated by D2-40, is useful for predicting tumor growth, recurrence-free survival and overall survival.^{10,11}

D2-40 is an accepted marker of the M2A antigen, also called podoplanin, and it is known that D2-40 immunoreacts to some cancer cells as well as to lymphatic endothelium.¹² It has been reported that podoplanin acts as a mediator of tumor cell invasion in the absence of epithelial cell dedifferentiation.¹³ Some studies of oral cancer showed that podoplanin expression correlates with lymph node metastasis and poor clinical outcome,^{13,14} which suggests a potential role of podoplanin in neoplastic development and invasion.

Several studies indicate that cells at the invasive tumor margins often are different from cells within other parts of various human cancers.¹⁵ In concert with these findings, we speculate that the significance of podoplanin expression in the most invasive margins of the tumor may be a good indicator of tumor behavior in OSCC. Therefore, the aim of our study was to evaluate lymphangiogenesis in OSCC and the associated lymph nodes and the podoplanin expression in neoplastic cells at the invasive front in OSCC. We also analyzed the association between the above parameters with lymph node metastasis in OSCC.

MATERIALS AND METHODS

Clinical characteristics of the patients and tumor samples:

Thirty-six paraffin-embedded archival tissue blocks of surgically removed OSCC and lymph node-associated resection specimens from the anatomopathology division of Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil and Hospital Araújo Jorge, Brazil were used in this study. Ethical approval for the use of human tissue samples was obtained from the Institutional Ethics Committee. The median age of the patients was 54 (range 24-90) years and included 25 (69.4%) males and 11 (30.6%) females. The tongue and/or floor of the mouth were the most affected regions in 30 (88.3%) of the patients, and the other sites included gingival, retromolar area, buccal mucosa and hard palate, affecting 6 (16.7%) subjects. Twenty-four tumors (66.7%) were greater than 40 mm in size and were considered T3T4; the other 12 (33.3%) tumors were 40 mm or less and were considered T1T2. Histological grade was assigned according to the method proposed by Bryne *et al.* (1992)¹⁵: ten patients (28.6%) had well-differentiated tumors, 19 (40.4%) moderate differentiated tumors and 6 (12.8%) with poorly-differentiated tumors. The outcome of the post-surgery treatment showed that 23 (63.9%) patients had nodal metastases (Table 1). All patients included in this study had surgery as their first treatment, with some receiving additional post-operative therapy.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were sectioned (3 µm) and collected in serial sections on glass slides coated with 2% 3-aminopropyltriethylsilane (Sigma-Aldrich, USA). The sections were deparaffinized by immersion in xylene and then immersed in alcohol. For antigen retrieval, the sections were immersed in citrate buffer (10mM sodium citrate, pH 6.0) at 96°C for 30 min in a water bath (for D2-40, VEGF-C and VEGFR-3) or incubated with pepsin (pH 1.8) for 13 min (for CD105) in a 37°C oven. Endogenous peroxidase activity was then blocked by immersing the sections in 3% hydrogen peroxide twice for 15

minutes each. After washing in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4), the slides were incubated with one of the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-human D2-40 (D2-40, DakoCytomation, USA) at 1:100 dilution; monoclonal mouse anti-human endoglin (anti-CD105) (SN6h, DakoCytomation, USA) at 1:30 dilution; polyclonal rabbit anti-VEGF-C (Z-CVC7, Invitrogen, USA) at 1:100 dilution and monoclonal mouse anti-human VEGFR-3 (KLT9, Leica Biosystems, UK) at 1:10 dilution. The slides were incubated at room temperature for one hour in a humid chamber. Slides were washed in TBS, and the signals were detected with Dako Advance™ HRP (Dako, USA). The slides were then incubated with Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen System (Dako, USA) for 2 minutes at room temperature. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained by the omission of primary antibodies, which were substituted by 1% TBS.

Evaluation of staining

The immunostaining was evaluated by two observers (SFS and MCFA) in a blinded manner without any knowledge of the clinical data, except for the nodal status in lymph node evaluations.

Under a light microscope, the density of lymphatic vessels (D2-40 positive endothelial cells) and microvessels (CD105 positive endothelial cells) were determined by counting 10 fields in the intratumoral, peritumoral and lymph node areas (at x400 magnification). The vessel quantification of these 10 fields was done in a unique axis (horizontal or vertical). The axes chosen had the highest vascularization areas (hot spots) at x100 magnification. The average of vessels obtained in the 10 fields was expressed as the density of vessels in each tumor assessed. In the primary tumor specimens, the sum of intratumoral and peritumoral counting was defined as total vessel density of the neoplasia and was called the total LVD or total MVD. For statistical analysis, the cut-off to

separate tumors with high vs. low density was done considering the mean value (if normal distribution) or median value (if no normal distribution), as described previously.¹¹

VEGF-C and VEGFR-3 expression in tumor parenchyma was assessed similarly. First, the slide was screened in lower magnification (x100) to select the area with the greatest amount of tumor cells with typically evident expression (hot spot). A unique axis, x or y, was selected to assess the hot spot. Under higher magnification (x400), the percentage of strongly positive tumor cells in 10 fields was evaluated as follows: 0 – negative; 1 – 1-25% positive cells; 2 – 26-50% positive cells; 3 – 51-75% positive cells; 4 – more than 75% positive cells. The average of the scores obtained in 10 fields was the final score for each tumor. For statistical analysis, the cut-off to separate tumors with negative vs. positive expression used the mean values (if normal distribution) or median values (if non-normal distribution).

The percentage of tumor cells with D2-40 (podoplanin) positive staining at the invasive margins, independent of intensity, was determined as follows: 0 – negative; 1 – less than 50% of positive cells; 2 – 50-75% of positive cells; 3 – more than 75% of positive cells. For the purpose of statistical analysis, the tumors with scores of 0 or 1, were considered negative, and tumors with scores of 2 or 3, were considered positive.

Statistical analysis

Analyses were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL/USA). Normal distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. Comparative analysis was performed using Student's *t* test or Mann-Whitney, according to normal distribution. The association between LVD, MVD, tumor cell D2-40, VEGF-C and VEGFR-3 positivity and clinicopathological variables were examined by the chi-square test. P-values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Evaluation of primary tumors

Intratumoral vessels stained by D2-40 showed thinner architecture and ill-defined lumina (Fig 1A), differing from the larger and more conventional morphology of vessels found in the peritumoral region (Fig. 1B). CD105 intensively stained intratumoral vessels were frequently found with aberrant, tortuous morphologies and without clear lumina. The mean LVD of the intratumoral and peritumoral areas were 2.95 ± 3.30 and 2.96 ± 2.23 , respectively, while the mean MVD of the intratumoral and peritumoral areas were 7.40 ± 4.55 and 6.25 ± 3.92 , respectively. No statistical difference was seen between the intratumoral and peritumoral areas ($p>0.05$). The associations between density of vessels and clinicopathological parameters in primary tumors are summarized in Table 1. No significant associations were observed between LVD and lymph node metastasis; however, considering the metastatic tumors, only 39% exhibited high LVD in intratumoral region ($p>0.05$), while the majority (52%), showed high peritumoral LVD ($p>0.05$). High peritumoral LVD was associated significantly with tumors localized in the tongue and/or floor of the mouth ($p=0.019$). Also, a strong association between LVD and tumor size was seen ($p=0.005$): 83% of the tumors with size T1/T2 had high intratumoral and total LVDs, while only 8 (33%) tumors with size T3/T4 had high LVD. An association between intratumoral LVD and male gender was also seen ($p=0.015$). A high total MVD was significantly associated with the presence of lymph node metastases ($p=0.02$). No significant associations were observed between vascular densities (LVD and MVD) and age or histological grade ($p>0.05$).

Podoplanin expression was found mainly in the cytoplasm and membrane in the peripheral layer of the tumor nests. A diffuse pattern of podoplanin expression was predominant at the invasive front of tumors (Fig. 1C). In 15 tumors (43%), podoplanin expression was observed at the invasive front. The chi-square test revealed a strong

association between histopathological graduation and podoplanin expression ($p=0.001$) (Table 1). In 10 (100%) of the well-differentiated tumors, the neoplastic cells had no podoplanin expression; conversely, only 1 poorly-differentiated tumor (5%) lacked podoplanin expression. An association between podoplanin expression and age greater than 45-years was also seen. The other clinicopathological parameters did not correlate with podoplanin expression; however, among 15 tumors with podoplanin expression, 11 (73%) had lymph node metastases ($p>0.05$). There was no significant difference in LVD according to tumor cell D2-40 immunoreactivity.

Cytoplasmic VEGF-C and VEGFR-3 expression patterns of variable intensities were seen in all samples evaluated (Fig. 1D, 1E). A significant association between VEGFR-3 and intratumoral LVD was noted ($p=0.04$) (Fig. 2A). No significant association between LVD and VEGF-C expression was found, but VEGF-C positive tumors more frequently had high total LVD ($p>0.05$). The association between VEGF-C expression and intratumoral MVD was significant ($p=0.05$) (Fig. 2B). VEGF-C and VEGFR-3 expression was not significantly associated with lymph node metastasis, although 75% of VEGF-C-positive tumors had lymph node metastases ($p>0.05$).

Evaluation of lymph nodes

The lymphatics and microvessels in metastatic lymph nodes were thin, frequently had ill-defined lumina, and were concentrated in hot spots between the tumor area and surrounding normal lymphatic tissue (Fig.1F). The mean LVDs in metastatic and non-metastatic lymph nodes were 2.39 ± 1.74 and 0.29 ± 0.34 , respectively. The mean MVDs in lymph nodes were 5.95 ± 3.82 (metastatic) and 1.99 ± 1.85 (non-metastatic). LVDs and MVDs in metastatic lymph nodes were significantly higher compared to non-metastatic lymph nodes ($p<0.0001$) (Fig. 3A, 3B). No significant associations were seen between VEGF-C expression and the density of vessels in metastatic lymph nodes ($p>0.05$), and no association was found between LVD and VEGFR-3 expression ($p>0.05$).

DISCUSSION

Despite advances in cancer prevention, treatment and changes in lifestyle habits that have occurred over the last three decades, there has only been a modest improvement in the 5-year survival rate of OSCC patients, which remains at 50%.¹⁶ The main factor affecting prognosis in OSCC patients is still regional lymph node metastasis.⁹

The measurement of vascular density has been used to predict the prognosis of various human tumors with variable success.¹⁷ Some of the reasons for this variability could be explained by issues in immunohistochemical methodology employed, as antibody selection, different types of antigen retrieval, methods of counting vessels, cut-off value for low or high vascularity and observer variability (Vermeulen *et al.*, 2002). Some authors found a lack of reliability in the determination of prognosis when pan-endothelial markers were used.¹⁹ Recently, specific endothelial-type antibodies such as anti-CD105 and anti-D2-40 seem to be more accurate for this purpose.¹⁰

The use of D2-40 antibody allowed studies of the presence and potential function of lymphatic vessels in tumors. Evidence of lymphangiogenesis was reported for head and neck squamous cell carcinoma, including OSCC.^{10,20,21} An association between high LVD and lymph node metastasis has been described;^{10,20} however, like other authors,¹¹ we did not find a statistically significant difference between LVD and lymph node metastasis, although a high peritumoral LVD was more frequently observed in metastatic tumors ($p>0.05$). Peritumoral lymphatic vessels present as large vessels with an open main junction in endothelial cells. We hypothesize that these structural and morphological characteristics are more easily invaded³ supported by the higher number of peritumoral vessels in metastatic tumors. Moreover, our data showed an association between high peritumoral LVD and tumors localized in the tongue and/or floor of the mouth. This finding seems to reflect the anatomical characteristic of that region, which indicates a rich vascularization.

In stage T1/T2, we found association between high intratumoral LVD and small tumors. We believe that the physical stress exerted by the growing tumor could generate a collapse of some of this lymphatic vessels,¹⁸ supporting the presence of more lymphatic vessels in small tumors. Also, this higher presence of lymphatic vessels in T1/T2 tumors indicate that even at early stages the vascular lymphatic network is enhanced, contributing to cancer cell dissemination, although metastasis is commonly detectable only when tumors are in a more advanced stage (T3/T4).

Endoglin (CD105) has been associated with endothelial cell proliferation and is considered to be a powerful marker of neovascularization in solid malignant tumors.¹⁹ In this study, we demonstrated that proliferating intratumoral and peritumoral microvessels enhance the presence of lymph node metastasis; other studies demonstrated this finding evaluating only the intratumoral proliferating vessels.^{10,19,22} Unlike LVD, no association was seen between MVD and tumor size, in contrast to one study¹⁰ but in accordance with another.²³ In addition, no association between MVD and tumor site was seen, suggesting that MVD is not dependent on tumor location, as pointed out by Kyzas *et al.* (2006).²⁴

Among the main factors that regulate lymphangiogenesis in human cancers, VEGF-C and VEGFR-3 produced by tumor cells are of particular importance.⁶ Evidence has emerged in recent years linking the presence of VEGF-C and VEGFR-3 expression in tumor cells to an increased likelihood of lymph node metastasis.^{25,26} In the present study, we identified an association between VEGF-C expression and intratumoral MVD, suggesting a possible role for VEGF-C in the new angiogenesis. It is in accordance with the fact that VEGF-C overexpression seems to induce new lymphatics and new blood vessels in the vicinity of the tumor²⁵ by binding to its other receptor, VEGFR-2, the main regulator of endothelial cell proliferation.⁶ Concerning the occurrence of a crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression, the expression levels of VEGFR-2 and VEGFR-3 in endothelium may determine whether VEGF-C elicits

angiogenic or lymphangiogenic effects (Scavelli *et al.*, 2004). A statistical association between intratumoral LVD and VEGFR-3 tumor cell expression was also shown, confirming the possible role of this receptor as an inductor in the generation of lymphatic vessels.^{26,27}

VEGF-C expression was not associated with LVD. Moreover, VEGF-C and VEGFR-3 expression was not associated with lymph node metastasis, in contrast to some studies^{25,26} but in accordance with another.¹⁰ These discrepancies could be the result of the heterogeneous cytoplasmic immunostaining pattern of VEGF-C and VEGFR-3 in the tumoral tissue, which varies from case to case and within the same field, causing difficulty in the evaluation of immunohistochemistry with variable results. Considering this situation, we analyzed only typically evident expression of these markers and evaluated a great number of microscopic fields and as great an expanse of the neoplasia as possible. In 44.4% and 50% of tumors, we found VEGF-C and VEGFR-3 expression, respectively, in accordance with data from literature that shows a variation of 24% to 100% of VEGF positive OSCC cases.⁶

It has been reported that cells from the deeply invasive parts of a tumor have an aggressive profile, are prone to metastatic behavior¹⁵ and that podoplanin expression is indicative of some tumor aggressiveness.^{11-13,28} Therefore, we investigated the significance of podoplanin expression at the invasive front. We found a strong association between podoplanin expression and tumor differentiation; podoplanin was not expressed in well-differentiated tumors. Undifferentiated cells usually acquire more mobility, permitting migration and invasion. This process involves remodeling of the actin cytoskeleton, and podoplanin has a pivotal role in cytoskeletal reorganization and cell motility.²⁹ In the rearrangement of the cytoskeleton, podoplanin interacts indirectly with actin, via ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) proteins.³⁰ Our data corroborate with this statement, confirming the findings of similar studies in other types of cancer.¹² It is also thought that podoplanin

is expressed in tumoral stem cells, in which it is expressed mainly in the cytoplasm and membrane of cells located in the peripheral layer of the tumor proliferation region.³¹ In our work, this expression pattern was observed along the tumor extension; however, the invasive front predominantly showed a diffuse pattern.

In contrast to some studies^{13,28} but in accordance with another,¹¹ we did not find a significant association of podoplanin expression with lymph node metastasis. Although in this investigation 73% of tumors with podoplanin expression exhibited metastasis, the number of samples may be not enough to show a statistical difference between the groups. Our analysis indicated a possible association between podoplanin expression and age. This can be a casual finding, but also may suggest that tumors in people older than 45 years-old are likely to be more aggressive. Although the precise biological significance of podoplanin in OSCC is still unclear, our results suggest that podoplanin expression in tumor cells plays an important role in tumorigenesis.

Several studies indicate changes in the lymphatic vessels of metastatic sentinel lymph nodes, such as increased lymph flow, lymph node enlargement, an increase in the number of lymphatic sinuses and diameter in their lumina,^{5,7,32} suggesting that primary tumors continue to induce lymphangiogenesis in metastatic foci.⁸ Recently, a study showed that primary tumors induce sentinel lymph node lymphangiogenesis in patients with OSCC, with VEGF-C in the primary tumor probably playing a role.⁹ In our study, we investigated for the first time, to our knowledge, the expression of lymphangiogenic factors in metastatic lymph nodes and the vascular densities in metastatic and non-metastatic lymph nodes by immunohistochemistry. Significantly high LVD and MVD were shown in metastatic lymph nodes compared to non-metastatic. It was not possible to prove that tumors induce new lymphatic vessel growth in draining lymph nodes before metastasis,^{8,9} but our results confirm a remarkable vascular network in metastatic lymph nodes supporting that lymphangiogenesis in draining lymph nodes could probably contribute to

the metastatic process.⁸ Moreover, no association was found between VEGF-C and VEGFR-3 expression in metastatic lymph nodes with LVD or MVD. This suggests that in the lymph node microenvironment, regulatory mechanisms other than VEGF-C and VEGFR-3 expression could be promoting vessel expansion in lymph nodes.

In summary, a high number of lymphatic vessels in tumors and expression of the main lymphangiogenic factors in tumor cells are signs indicating the occurrence of lymphangiogenesis in OSCC in this study. Lymphatic vessels and microvessels seem to regulate dissemination and cancer progression, but this relationship between LVD and MVD should be explored further. The enhanced vascular network in metastatic lymph nodes compared to non-metastatic support previous reports of lymphangiogenesis occurring in lymph nodes. However, the lack of association between vascular densities with the main lymphangiogenic factors in lymph nodes highlight the necessity of further studies explaining the mechanisms involved in lymphatic metastasis in the lymph nodes and further dissemination to distant sites. Moreover, the expression of podoplanin by more undifferentiated tumor cells at the invasion front suggests this expression could be an indicator of tumor aggressiveness.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Maria Inês do Nascimento Ferreira for her technical support.

REFERENCES

1. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7:737-749.
2. Bolenz C, Fernández MI, Trojan L, *et al.* Lymphangiogenesis occurs in upper tract urothelial carcinoma and correlates with lymphatic tumour dissemination and poor prognosis. *BJU Int* 2009;103:1040-1046.
3. Zhang Z, Helman JI, Li LJ. Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer – a review of mechanisms. *Int J Oral Sci* 2010;2:5-14.
4. Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* 2006;27:1729-1738.
5. Ran S, Volk L, Hall K, *et al.* Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 2010;17:229-251.
6. Margaritescu C, Pirici D, Simionescu C, *et al.* VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2009;50:527-548.
7. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, *et al.* VEGF-C induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007;109:1010-1017.
8. Hirakawa S. From tumor lymphangiogenesis to lymphvascular niche. *Cancer Sci* 2009;100:983-989.
9. Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, *et al.* Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2010;46:373-378.
10. Myahara M, Tanuma J, Sugihara K, *et al.* Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007;110:1287-1294.

11. Longatto-Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, *et al.* How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? *World J Surg Oncol* 2007;11:140-148.
12. Kadota K, Huang CL, Liu D, *et al.* The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;70:88-93.
13. Kreppel M, Scheer M, Drebber U, *et al.* Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* 2010;456:473-482.
14. Yuan P, Temam S, El-Naggar S, *et al.* Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006;107:563-569.
15. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinoma has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-381.
16. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, *et al.* Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350:1937-1944.
17. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, *et al.* Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008;23:601-607.
18. Botting SK, Fouad H, Elwell K, *et al.* Prognostic significance of peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor receptor 3 in invasive squamous cell cervical cancer. *Transl Oncol* 2010;3:170-5.
19. Martone T, Rosso P, Albera R, *et al.* Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol* 2005;41:147-155.
20. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-177.

21. Zhao D, Pan J, Li XQ, *et al.* Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med* 2008;37:616-625.
22. Chung HC, Su CH, Huang HY, *et al.* High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope* 2006;116:1175-1179.
23. Schimming R, Marmè D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002;24:151-156.
24. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:768-775.
25. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003;32:455-460.
26. Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, *et al.* Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:475-484.
27. Chen F, Takenaka K, Ogawa E, *et al.* Flt-4 – positive endothelial cell density and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:8548-8553.
28. Huber GF, Fritzsche FR, Züllig L, *et al.* Podoplanin expression correlates with sentinel lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2010 – ahead of print.
29. Raica M, Cimpean A, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res* 2008;28:2997-3006.
30. Martín-Villar E, Megiás D, Castel S, *et al.* Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2006;119:4541-4553.

31. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, *et al.* Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005;166: 913-921.
32. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, *et al.* Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:10365-10376.
33. Vermeulen PB, Gasparin G, Fox SB, *et al.* Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38:1564-1579.
34. Scavelli C, Vacca A, Di Pietro G, *et al.* Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia* 2004;18:1054-1058.

Figure legends:

Figure 1 – Immunohistochemical findings in samples of oral squamous cell carcinoma and lymph nodes. **A** – Intratumoral vessels in the primary tumor stained by D2-40 had thin architecture and ill-defined lumina (Immunohistochemical stain, original magnification x400). **B** – Peritumoral vessels in the primary tumor stained by D2-40 showed more conventional morphology and open lumen (Immunohistochemical stain, original magnification x100). **C** – VEGF-C expression in the tumor parenchyma (Immunohistochemical stain, original magnification x400). **D** – VEGFR-3 expression in the tumor parenchyma (Immunohistochemical stain, original magnification x400). **E** – Podoplanin expression in tumor cells at the invasive front (Immunohistochemical stain, original magnification x100). **F** – Intranodal vessels highlighted by CD105 antibody in metastatic lymph nodes (Immunohistochemical stain, original magnification x100).

Figure 2 – Lymphangiogenic factors and density of vessels. **A** – The association of VEGFR-3 expression in primary tumor parenchyma with intratumoral LVD (Chi-square test, $p < 0.05$). **B** – The association of VEGF-C expression in primary tumor parenchyma with intratumoral MVD (Chi-square test, $p = 0.05$).

Figure 3 – Density of vessels in metastatic and non-metastatic lymph nodes. **A** – LVD and **B** – MVD higher in metastatic lymph nodes compared to non-metastatic lymph nodes (Mann-Whitney test, $p < 0.0001$).

Figures:

Figure 1:

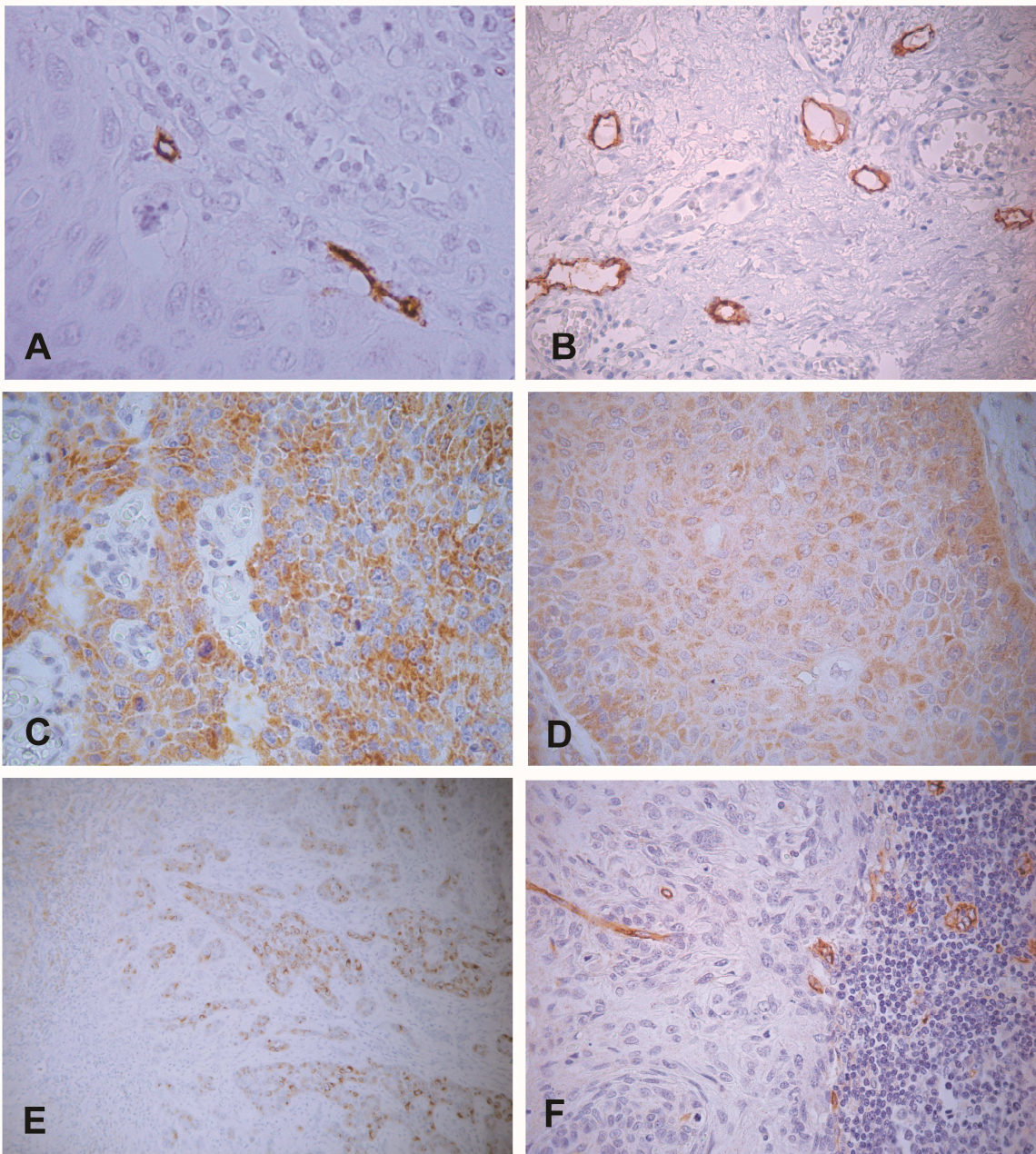
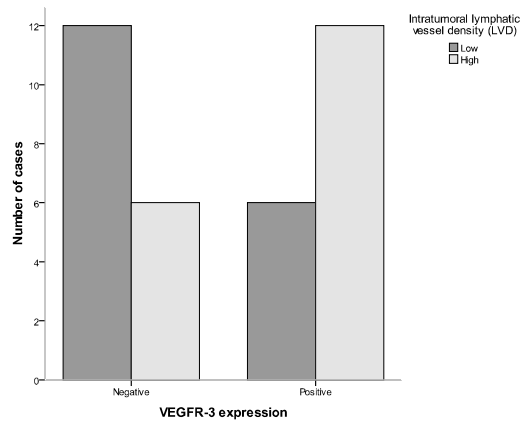


Figure 2:

A



B

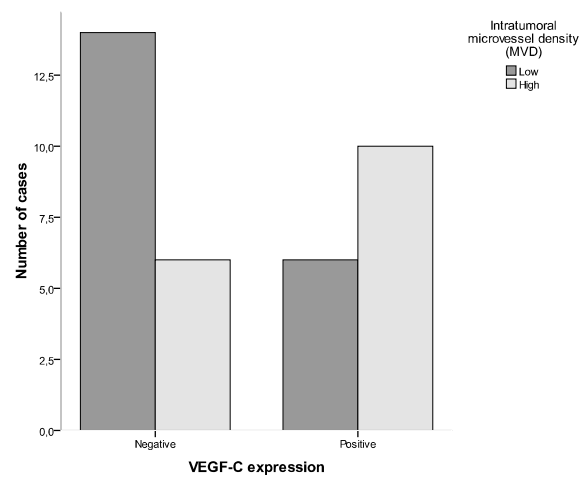
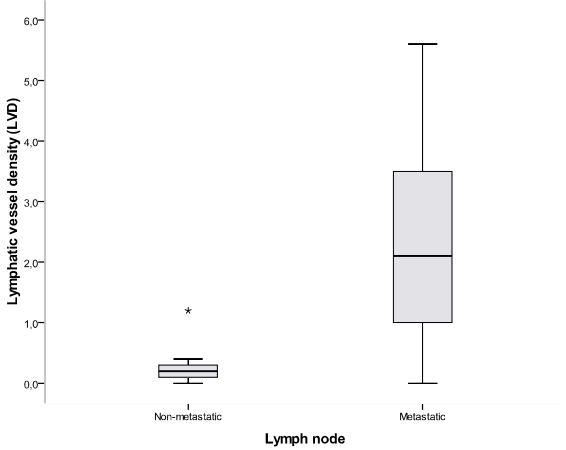


Figure 3:

A



B

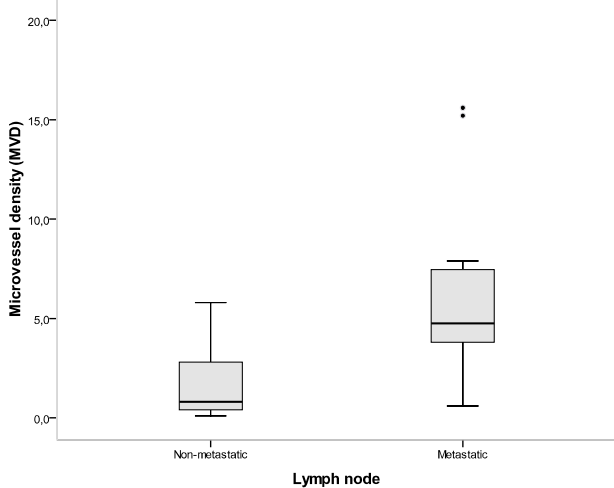


Table:

TABLE 1: Association between density of vessels and podoplanin expression with clinicopathological parameters in primary tumor										
	Number of Patients (%)	HIGH LVD			HIGH MVD			Podoplanin expression		
		Intra	Peri	Tot	Intra	Peri	Tot	Positive	Negative	p
Gender										
Male	25 (69.4)	35%	52%	44%	48%	48%	57%	41%	59%	
Female	11 (30.6)	77%	46%	62%	39%	39%	31%	46%	54%	
p		0.015*	0.729	0.298	0.587	0.587	0.137			1.000
Age (years)										
≤ 45	7 (19.4)	43%	29%	43%	43%	43%	57%	0%	100%	
> 45	29 (80.6)	52%	55%	52%	45%	45%	45%	54%	46%	
p		1.000	0.402	1.000	1.000	1.000	0.684			0.012*
Localization										
Tongue/floor of mouth	30 (83.3)	53%	60%	57%	47%	47%	50%	41%	59%	
Others	6 (16.7)	33%	0%	17%	33%	33%	33%	50%	50%	
p		0.658	0.019*	0.177	0.672	0.672	0.662			1.000
Size										
T1T2	12 (33.3)	83%	67%	83%	58%	67%	58%	33%	67%	
T3T4	24 (66.7)	33%	42%	33%	38%	33%	42%	48%	52%	
p		0.005*	0.157	0.005*	0.236	0.058	0.345			0.411
Histological grade										
Well	10 (28.6)	50%	60%	60%	60%	60%	70%	0%	100%	
Moderate	19 (40.4)	58%	53%	53%	37%	32%	37%	53%	47%	
Poor	6 (12.8)	33%	33%	33%	50%	67%	50%	83%	17%	
p		0.637	0.331	0.331	0.557	0.931	0.303			0.001*
Lymph node metastasis										
Positive	23 (63.9)	39%	52%	48%	52%	57%	61%	48%	52%	
Negative	13 (36.1)	69%	46%	54%	31%	23%	23%	33%	67%	
p		0.083	0.729	0.729	0.214	0.052	0.029*			0.411

Chi-square test; * Difference statistically significant;

LVD, lymphatic vessel density; MVD, microvessel density; Intra, intratumoral; Peri, peritumoral; Tot, total.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Antes da descoberta de anticorpos específicos para os vasos linfáticos, dentre eles, o D2-40, os mecanismos envolvidos na disseminação linfática dos tumores não podia ser adequadamente avaliado. Entretanto, com a descoberta desses marcadores e disponibilização no mercado, observou-se um crescimento de trabalhos, tanto os que sugeriam a ocorrência da linfangiogênese (Myahara *et al.*, 2007; Longatto-Filho *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2007; Marinho *et al.*, 2008), como aqueles que contestavam a sua ocorrência nas neoplasias malignas (Clarijjs *et al.*, 2001). Com o carcinoma de células escamosas de boca não foi diferente. Após a publicação em 2007 de um dos estudos pioneiros na investigação do tema (Myahara *et al.*, 2007), outros estudos surgiram (Zhao *et al.*, 2008; Siriwardena *et al.*, 2008; Sugiura *et al.*, 2009), trazendo algumas questões a respeito desta avaliação: alguns se focaram apenas em quantificar os vasos, e com isso, surgiram estudos questionando a funcionalidade dos vasos intra ou peritumorais, outros investigaram não apenas o número de vasos, mas também os fatores de crescimento que estariam envolvidos neste processo.

Nosso estudo, assim como outro (Zhao *et al.*, 2008), identificou que os vasos linfáticos intratumorais apresentavam-se mais finos e com lúmen reduzido, quando comparados à morfologia mais frequentemente vista dos vasos peritumorais (vasos convencionais, maiores e lúmen amplo). Estes achados nos permitem sugerir que os vasos linfáticos neoformados no CCEB são preferencialmente os intratumorais e que os vasos linfáticos peritumorais sejam vasos pré-existentes. Dados controversos na literatura não esclarecem se as células malignas metastatizam por infiltração dos vasos linfáticos peritumorais, ou através da introdução e invasão dos vasos linfáticos neoformados intratumorais (Kyzas *et al.*, 2005A; Zhao *et al.*, 2008). Entretanto, resultados mostrando uma correlação entre uma alta LVD peritumoral e o envolvimento linfonodal no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Kyzas *et al.*, 2005A) e nossos achados de alta LVD peritumoral em mais da metade dos tumores metastáticos fazem com que os

vasos peritumorais não sejam descartados como possível rota de disseminação metastática, sendo portanto, importante sua avaliação também na investigação da linfangiogênese.

Quanto aos vasos intratumorais nenhuma associação deles com a presença da metástase nodal foi observada, diferentemente de outros autores (Kyzas *et al.*, 2005A; Myahara *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Essa falta de associação em nosso estudo talvez possa ser explicada pela quantidade relativamente pequena de espécimes avaliados, quando comparado aos demais estudos. Além disso, nossa metodologia de quantificação dos vasos difere da metodologia empregada por eles. Em nossa análise, um maior número de campos microscópicos foram avaliados e a neoplasia era investigada em uma maior extensão, não sendo a contagem restrita às áreas mais vascularizadas. Desta forma, acreditamos que nossa metodologia retratou de maneira mais real as características da neoplasia como um todo.

Os microvasos neoformados, intra ou peritumorais, evidenciados pelo anticorpo CD105 (endoglina), por sua vez, apresentaram características morfológicas de vasos imaturos, frequentemente tortuosos e com lúmen indefinido. A densidade de microvasos neoformados visualizados na região intratumoral foi ligeiramente maior que os vasos peritumorais, similar aos dados de Kyzas *et al.* (2006), mas contrastando com resultados que encontraram valores mais altos de MVD na região peritumoral (Margaritescu *et al.*, 2008). A expressão de CD105 em vasos linfáticos é descrita como rara (Kyzas *et al.*, 2006), sendo portanto, o CD105 fortemente expresso em vasos sanguíneos. A associação da densidade microvascular com a presença da metástase nodal observada em nosso estudo, assim como previamente descrito (Chien *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2006; Myahara *et al.*, 2007), confirma a importância da angiogênese na formação de novos vasos sanguíneos e no crescimento de um tumor sólido como o CCEB, como apontado por Folkman *et al.* (1990).

Em 2008, quando o nosso grupo começou a também estudar a linfangiogênese no CCEB, o tema era ainda, de alguma forma, pouco estudado. Com o avanço dos estudos, percebemos uma nova forma de avaliação desta linfangiogênese: o ambiente linfonodal (Hirakawa, 2009). E assim, nos prontificamos a estudar a linfangiogênese nos dois ambientes: tumoral e linfonodal. A ausência na literatura de estudos com análise imunoistoquímica semelhante à nossa nos linfonodos, fez com que utilizássemos uma metodologia própria de análise, que visou investigar a densidade de vasos intranodais, sem que houvesse a divisão intratumoral ou peritumoral. Embora nossos resultados mostrem uma vascularização maior nos linfonodos metastáticos quando comparados aos não metastáticos, como nosso estudo é retrospectivo, não foi possível com estes resultados provar que o tumor induz o crescimento de vasos no linfonodo antes dele metastatizar, como proposto anteriormente (Hirakawa, 2009).

Com o início dos trabalhos laboratoriais, ainda durante a fase de padronização dos anticorpos, nos deparamos também com uma imunomarcagem do D2-40 não apenas nos vasos linfáticos, como esperado, mas também nas células tumorais. Recorrendo à literatura, percebemos que a expressão da podoplanina vinha sendo associada com características de malignidade do tumor (Longatto-Filho *et al.*, 2007; Kadota *et al.*, 2009; Kreppel *et al.*, 2010A; Huber *et al.*, 2010), entretanto, ainda não havia sido investigada no local reconhecido como o de maior agressividade do tumor: o fronte invasivo. Com isso, nos empenhamos em realizar esta análise buscando uma associação da marcação com a gradação histopatológica que avalia as margens invasivas. Nossos resultados realçaram o que esperávamos e suportou ainda mais os estudos em câncer de boca que já associavam a podoplanina com características de malignidade do tumor.

A análise da sobrevida se mostra uma das principais formas de predizer o comportamento clínico do tumor e desde o início, era um dos objetivos do estudo. Entretanto, durante o período de atualização dos dados de sobrevida dos pacientes,

percebemos a dificuldade em achar prontuários atualizados. Nossa análise assim, contou com um número considerável de perda de seguimento. Embora a gradação histológica seja descrita como pobremente correlacionada com o desfecho do paciente (Barnes *et al.*, 2005), encontramos uma tendência dos pacientes com tumores indiferenciados terem uma sobrevida global menor que os pacientes com tumores diferenciados. A gradação da OMS, embora seja um método bastante subjetivo de análise (Woolgar, 2006), é frequentemente usada nos artigos para classificação da amostra e associações com as características em estudo (Margaritescu *et al.*, 2010).

Ainda com relação à análise da sobrevida global, nossos achados de uma alta densidade microvascular peritumoral como indicadora de um pior prognóstico no CCEB estão de acordo com estudos prévios que também encontraram uma alta MVD associada a um pior prognóstico (Chien *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2006; Myahara *et al.*, 2007). Esse resultado reitera também a funcionalidade e importância dos vasos peritumorais neoformados na progressão do CCEB.

Ao final deste estudo, consideramos que o nosso trabalho contribuiu para demonstrar que a linfangiogênese ocorre no CCEB, que ela está associada às características clinicopatológicas do tumor e que esta interação contribui para o desenvolvimento e progressão da neoplasia. O melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo da linfangiogênese e de sua associação com a metástase direciona a criação de novas estratégias terapêuticas para o câncer de boca, que busquem melhorar a sobrevida dos indivíduos portadores desta enfermidade. Acreditamos também que os resultados encontrados na avaliação dos linfonodos abrem um caminho para novos estudos no ambiente linfonodal, que visem uma melhor compreensão da interação linfonodo-disseminação metastática.

8. CONCLUSÕES

- A formação de novos vasos linfáticos (linfangiogênese) ocorre tanto em carcinoma de células escamosas primário de boca, quanto em seus linfonodos, metastáticos e não metastáticos.
- A LVD no tumor primário não está associada com a presença da metástase nodal, mas está associada com o tamanho e localização do tumor.
- A MVD no tumor primário está associada com a presença da metástase nodal, mas não está associada com as demais características clinicopatológicas.
- VEGF-C e seu receptor VEGFR-3 não estão associados com características clinicopatológicas do tumor, mas estão associados com a MVD e a LVD, respectivamente, no tumor primário.
- Linfonodos metastáticos apresentam LVD e MVD mais desenvolvidas que linfonodos não metastáticos.
- Novos estudos são necessários sobre os mecanismos da regulação da LVD e MVD no linfonodo.
- A expressão da podoplanina nas células tumorais do fronte invasivo está associada a tumores mal diferenciados. Esta expressão sugere maior agressividade.
- Houve relação da sobrevida global apenas com a gradação histológica e a MVD peritumoral. Este resultado pode estar associado ao tamanho da amostra e não descarta a importância dos outros fatores estudados, em especial, a LVD, como fator preditivo para o CCEB.

9. REFERÊNCIAS

1. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438(7070):946-53.
2. Altman DG, De Stavola BL, Love SB, Stpniewska KA. Review of survival analysis published in cancer journals. *Br J Cancer*. 1995;72(2):511-8.
3. American Joint Committee on Cancer. Lip and oral cavity. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 23-32.
4. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010;46(6):414-7.
5. Barasch A, Morse DE, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Smoking, gender, and age risk factors for site-specific intraoral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1994;73(3):509-13.
6. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumors. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon:IARC Press;2005.
7. Bolenz C, Fernández MI, Trojan L, Hoffmann K, Herrmann E, Steidler A, Weiss C, Ströbel P, Alken P, Michel MS. Lymphangiogenesis occurs in upper tract urothelial carcinoma and correlates with lymphatic tumour dissemination and poor prognosis. *BJU Int*. 2009;103(8):1040-6.
8. Botting SK, Fouad H, Elwell K, Rampy BA, Salama SA, Freeman DH, Diaz-Arrastia CR. Prognostic significance of peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor receptor 3 in invasive squamous cell cervical cancer. *Transl Oncol*. 2010;3(3):170-5.
9. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinoma has high prognostic value. *J Pathol*. 1992;166(4):375-81.

10. Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Filho MA. Álcool e câncer bucal: considerações sobre os mecanismos relacionados. *Revista Brasileira de Cancerologia* . 2008;54(1):49-56.
11. Chen F, Takenaka K, Ogawa E, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F. Flt-4 – positive endothelial cell density and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8548-53.
12. Chien CY, Su CY, Hwang CF, Cuang HC, Chen CM, Huang CC. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol*. 2006;94(5):413-7.
13. Chuang HC, Su CH, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1175-9.
14. Clayton D, Hills M. *Statistical models in epidemiology*. 1st. Edition. London: Oxford University Press, 1993. 367 p.
15. Coskun U, Akyurek N, Dursun A, Yamac D. Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Surg Res*. 2010;164(1):110-5.
16. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(3):194-200.
17. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*. 2008;30(1):75-84.
18. Donnem T, Al-Shibli K, Al-Saad S, Delghandi MP, Busund LT, Bremnes RM. VEGF-A and VEGFR-3 correlate with nodal status in operable non-small cell lung cancer: inverse correlation between expression in tumor and stromal cells. *Lung Cancer*. 2009;63(2):277-83.

19. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-92.
20. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: bayesian approach. *Mod Pathol.* 2005;18(11):1490-7.
21. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1(1):27-31.
22. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4-6.
23. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M. Endoglin: an accessory component of the TGF- β – binding receptor – complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 2001;188(1):1-7.
24. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumor angiogenesis. *APMIS.* 2004;112(7-8):413-30.
25. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. *Head Neck.* 2002;24(2):165-80.
26. Greene F, Sobin L. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(3):180-190.
27. Gu Y, Qi X, Guo S. Lymphangiogenesis induced by VEGF-C and VEGF-D promotes metastasis and a poor outcome in breast carcinoma: a retrospective study of 61 cases. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(7):717-25.
28. Han FH, Li HM, Zheng DH, He YL, Zhan WH. The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2010;36(12):1172-9.

29. Harrel MI, Tritani BM, Rudell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol.* 2007;170(2):774-86.
30. Hirakawa S. From tumor lymphangiogenesis to lymphvascular niche. *Cancer Sci.* 2009;100(6):983-9.
31. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Agência de notícias. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/>. Acessado em 27 de Abril, 2011.
32. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.
33. Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(5):373-8.
34. Issa A, Le TX, Shoushtari AN, Shields JD, Swartz MA. Vascular endothelial growth factor-C and C-C chemokine receptor 7 in tumor cell – Lymphatic cross-talk promote invasive phenotype. *Cancer Res.* 2009;69(1):349-57.
35. Jackson DG. New molecular markers for the study of tumor lymphangiogenesis. *Anticancer Res.* 2001;21(6B):4279-83.
36. Jüttner S, Wibmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Grestchel S, Schlag PM, Kimmner W, Höcker M. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(2):228-40.
37. Kadota K, Huang CL, Liu D, Nakasima N, Yokomise H, Ueno M, Haba R. The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;70(1):88-93.

38. Khan HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest.* 2002;82(9):1255-7.
39. Kozlowski M, Naumnik W, Niklinski J, Milewski R, Dziegielewski P, Laudanski J. Vascular endothelial growth factor C and D, expression correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with resected esophageal cancer. *Neoplasma.* 2011;58(4):311-9.
40. Kramer RH, Shen X, Zhou H. Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):35-45.
41. Kreppel M, Eich HT, Kübler A, Zöller JE, Scheer M. Prognostic value of the sixth edition of the UICC's TNM classification and stage grouping for oral cancer. *J Surg Oncol.* 2010;102(5):443-9. B.
42. Kreppel M, Scheer M, Drebber U, Ritter L, Zöller JE. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch.* 2010;456(5):473-82. A.
43. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:768-775.
44. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2005;206(2):170-7. A.
45. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131(9):624-30. B.
46. Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(8):882-8.

47. Lin M, Lin HZ, Ma SP, Ji P, Xie D, Yu JX. Vascular endothelial growth factor - A and - C: expression and correlation with lymphatic metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2011;28(1):151-8.
48. Longatto-Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, de Carvalho MB, Curioni AO, Mercante AMC, Schmitt FC, Gattás GJF. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? *World J Surg Oncol*. 2007;11(5):140.
49. Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas oral: revisão de sistemas propostos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):325-33.
50. Margaritescu C, Pirici D, Simionescu C, Mogoanta L, Raica M, Stinga A, Ciurea R, Stepan A, Stinga A, Ribatti D. VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(4):527-48.
51. Margaritescu C, Pirici D, Stinga A, Simionescu C, Raica M, Mogoanta L, Stepan A, Ribatti D. VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clin Exp Med*. 2010;10(4):209-14.
52. Margaritescu C, Simionescu C, Mogoanta L, Badea P, Pirici D, Stepan A, Ciurea R. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(3):321-6.
53. Marinho VFZ, Sanches FSF, Rocha GFS, Metze K, Gobbi H. D2-40, a novel lymphatic endothelial marker: identification of lymphovascular invasion and relationship with axillary metastases in breast cancer. *J Bras Pathol Med Lab*. 2008;44(1):45-50.
54. Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, Pruneri G, Cortesina G. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol*. 2005;41(2):147-55.

55. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngo Clin North Am.* 2006;39(2):277-94.
56. Mohammed RA, Ellis IO, Elshikh S, Paish EC, Martin SG. Lymphatic and angiogenic characteristics in breast cancer: morphometric analyses and prognostic implications. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(2):261-73.
57. Myahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2007;110(6):1287-94.
58. Niimi K, Yooshizawa M, Nakajima T, Saku T. Vascular invasion in squamous cell carcinomas of human oral mucosa. *Oral Oncol.* 2001;37(4):357-64.
59. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer.* 2001;92(3):556-68.
60. Ohno F, Nakanishi H, Abe A, Seki Y, Kinoshita A, Hasegawa Y, Tatematsu M, Kurita K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(5):281-9.
61. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipanen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in human tissues and cell lines. *Cancer Res.* 1992;52(20):5738-43.
62. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, Hayes DN, Shores C, Chera BS. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1488-94.
63. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist.* 2010;15(9):994-1001.

64. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Bruch M, Kort EJ, Ditlev J, Tsarfaty I, Hudson E, Jackson DG, Petillo D, Chen J, Resau JH, Teh BT. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(21):10365-76.
65. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology.* 2010;17(4):229-51.
66. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):737-49.
67. Saharinen P, Tamella T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol.* 2004;25(7):387-95.
68. Sathyan KM, Sailasree R, Jayasurya R, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari KR, Abraham EK, Kannan S. Carcinoma of tongue and the buccal mucosa represent different biological subentities of the oral carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(9):601-9.
69. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(4A):2351-5.
70. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):301-8. B.
71. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;16(6):388-99.A.
72. Scully C, Fellix DH. Oral medicine - update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J.* 2006;200(1):13-7.

73. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000;36(3):256-63.
74. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer – surgery. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):394-401.
75. Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis.* 2006;27(9):1729-38.
76. Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama MN, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61(1):103-8.
77. Sleeman J, Schmid A, Thiele W. Tumor lymphatics. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(5):285-97.
78. Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, Strenov Y, Shpitzer T. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol.* 2010;35(4):307-12.
79. Stacker SA, Williams RA, Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as marker of tumor metastasis. *APMIS.* 2004;112(7-8):539-49.
80. Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, Shirasuna K. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol.* 2009;34(3):673-80.
81. Takase Y, Kai K, Masuda M, Akashi M, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract.* 2010;206(11):725-30.
82. Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol.* 2005;15(8):434-41.

83. Tian X, Cong M, Zhou W, Zhu J, Liu Q. Relationship between protein expression of VEGF-C, MMP-2 and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *J Int Med Res.* 2008;36(4):699-703.
84. Trojan L, Rensch F, Voss M, Grobholz R, Weiss C, Jackson DG, Alken P, Michael MS. The role of the lymphatic system and its specific growth factor, vascular endothelial growth factor C, for lymphogenic metastasis in prostate cancer. *BJU Int.* 2006;98(4):903-6.
85. Vermeulen PB, Gasparin G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JAM, de Wall RMW, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38(12):1564-79.
86. Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ, Ord RA, Wahl SM. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(3):475-84.
87. Weidner N, Sample JP, Weich WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8.
88. Whitehurst B, Flister MJ, Bagaitkar RJ, Volk L, Bivens CM, Pickett B, Castro-Rivera E, Brekken RA, Gerard RD, Ran S. Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. *Int J Cancer.* 2007;121(10):2181-91.
89. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006;42(3):229-39.

90. Yoshitomi H, Kobayashi S, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M. Specific expression of endoglin (CD105) in endothelial cells of intratumoral blood and lymphatic vessels in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2008;37(3):275-81.
91. Yuan P, Temam S, El-Naggar S, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 2006;107(3):563-9.
92. Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME, Horwath LG, Achen MG, Stacker SA, Sutherland RL, Williams ED. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):5137-44.
93. Zhang G, Guo ZL, Gao Y. Podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia and its correlation with lymph vessels density. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009;44(8):488-91.
94. Zhang Z, Helman JI, Li LJ. Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer – a review of mechanisms. *Int J Oral Sci*. 2010;2(1):5-14.
95. Zhao D, Pan J, Li XQ, Wang XY, Tang C, Xuan M. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(10):616-25.
96. Zhou X, Temam S, Oh M, Pungpravat N, Huang BL, Mao L, Wong DT. Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006;8(11):925-932.

10. ANEXOS

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

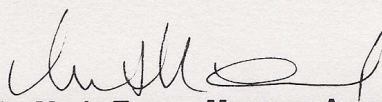
Parecer nº. ETIC 0167.0.203.000-10

Interessado(a): Profa. Maria Cássia Ferreira Aguiar
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de julho de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da linfangiogênese e angiogênese em carcinoma de células escamosas de boca e de sua associação com metástases regionais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ATIVIDADES COMPLEMENTARES EXERCIDAS DURANTE O MESTRADO

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração “Microdissecção a laser – Princípios técnicos e sua aplicabilidade em pesquisa e na rotina diagnóstica.”
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Brasil.
- 2010 - 2010** Curso de curta duração “Workshop em Imunoistoquímica” promovido pela Biogen.
Faculdade de Medicina da UFMG, Brasil.
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em “Diagnóstico por imagem”.
Faculdade de Odontologia da UFMG, Brasil.
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em “Neoplasias Malignas dos tecidos linfóides”.
Centro de Prevenção e Tratamento de Doenças Neoplásicas, ONCOMED, Brasil.

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUSA, S. F., CALDEIRA, P. C., GROSSMANN, S. M. C., AGUIAR, M. C. F., MESQUITA, R. A.
Desmoplastic fibroblastoma (collagenous fibroma): a case identified in the buccal mucosa. *Head and Neck Pathology*. 2011;5:175-9.
2. BERNARDES, V. F., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., SILVA, T. A., AGUIAR, M. C. F.
Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2010;29:40-7.
3. CALDEIRA, P.C., SOUSA, S. F., SILVA, T. A., GOMEZ, R. S.
Diffuse pigmentation of the oral mucosa. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics*, 2010;110:550-3.
4. CALDEIRA, PC, SOUSA, S. F., JOHANN, A. C. B. R., SILVA, J. F. C., LACERDA, J. C. T., AGUIAR, M. C. F., CARMO, M. A. V.
A submucosal tumor of the upper lip. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics* 2009;108:650-6.

Artigos aceitos para publicação

1. OLIVEIRA-NETO, H. H., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., FRANCA, C. M., AGUIAR, M. C. F., SILVA, T. A., BATISTA, A. C.
A comparative study of microvessel density in squamous cell carcinoma of the oral cavity and lip. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics*, 2011.
2. ALVES, C. C. M., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., BERNARDES, V. F., AGUIAR, M. C. F.
Carcinoma de células escamosas de boca: relação entre graduação histopatológica e

características clínicas da neoplasia. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, 2011.

3. BERNARDES, V. F., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., ABREU, M. H. N. G., SILVA, T. A., AGUIAR, M. C. F.

EGF in saliva and tumor samples of oral squamous cell carcinoma. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUTO, G. R., SOUSA, S. F., NETTO, F. O. G., AGUIAR, M. C. F., MESQUITA, R. A. Densidade de mastócitos, vasos neoformados e vasos linfáticos no carcinoma de células escamosas de boca com e sem metástases nodais In: XVIII Jornada Mineira de Estomatologia, 2011, Diamantina.

Anais de XVIII Jornada Mineira de Estomatologia. , 2011.

2. ARAUJO, L. R. A., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., FREITAS, J. B., CARMO, M. A. V. Estomatite urêmica In: XVIII Jornada Mineira de Estomatologia, 2011, Diamantina.

Anais de XVIII Jornada Mineira de Estomatologia. , 2011.

3. NETTO, F. O. G., FLORENCIO, T. N. G., SOUSA, S. F., MENDONCA, E. F., AGUIAR, M. C. F.

Angiogênese e linfangiogênese em carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares menores. In: VII Simpósio Internacional, 2011, Belo Horizonte.

Anais de VII Simpósio Internacional "Diálogos entre a clínica e as neurociências: psiquiatria molecular". , 2011.

4. SOUSA, S. F., NETTO, F. O. G., OLIVEIRA-NETO, H. H., BATISTA, A. C., AGUIAR, M. C. F.

Densidade de vasos linfáticos e microvasos neoformados em carcinoma de células escamosas de boca e nos linfonodos associados In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011, Belo Horizonte.

Anais de XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG. , 2011.

5. NETTO, F. O. G., FLORENCIO, T. N. G., SOUSA, S. F., MENDONCA, E. F., AGUIAR, M. C. F.

Angiogênese e linfangiogênese em carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares menores In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011, Belo Horizonte.

Anais de XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG. , 2011.

6. SOUTO, G. R., SOUSA, S. F., NETTO, F. O. G., PEREIRA, T. S. F., AGUIAR, M. C. F., MESQUITA, R. A.

Avaliação da relação mastócitos/neoformação vascular e linfática no carcinoma de células escamosas de boca com e sem metástases nodais In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011, Belo Horizonte.

Anais de XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG. , 2011.

7. SOUSA, S. F., NETTO, F. O. G., OLIVEIRA-NETO, H. H., BATISTA, A. C., GOMES, C. C., GOMEZ, R. S., AGUIAR, M. C. F.

Lymphatic vessels and neoformed microvessels density in primary oral squamous cell carcinoma and associated lymph nodes In: 102nd Annual Meeting Innovation and Collaboration: the path to progress, 2011, Orlando, FL..

Proceedings supplement: Late-Breaking Abstracts-AACR. , 2011. p.110 - 110

8. NETTO, F. O. G., FLORENCIO, T. N. G., SOUSA, S. F., MENDONCA, E. F., GOMES, C. C., AGUIAR, M. C. F.

Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary glands In: 102nd Annual Meeting Innovation and collaboration: the path to progress, 2011, Orlando, FL..

Proceedings supplement: Late-Breaking Abstracts- AACR. , 2011. p.84 – 84

9. OLIVEIRA-NETO, H. H., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., FRANCA, C. M., AGUIAR, M. C. F., SILVA, T. A., BATISTA, A. C.

A comparative study of vessels density in squamous cell carcinoma of oral cavity and lip In: 89th General Session and Exhibition of the IADR, 2011, San Diego, CA.

Abstracts from International Association for Dental Research. , 2011.

10. SOUSA, S. F., PEREIRA, T. S. F., NETTO, F. O. G., SOUTO, G. R., MESQUITA, R. A., AGUIAR, M. C. F.

Avaliação da relação mastócitos/neoformação vascular no carcinoma de células escamosas bucal com e sem metástases nodais In: 27a Reunião Anual da SBPqO, 2010, Águas de Lindóia.

Brazilian Oral Research. , 2010. v.24. p.353 - 353

11. NETTO, F. O. G., BERNARDES, V. F., SOUSA, S. F., SILVA, T. A., ABREU, M. H. N. G., AGUIAR, M. C. F.

Fator de crescimento epidérmico: níveis salivares e imunexpressão em carcinoma de células escamosas de boca-estudo caso-controle In: 27a Reunião Anual da SBPqO, 2010, Águas de Lindóia.

Brazilian Oral Research. , 2010. v.24. p.279 – 279

12. BERNARDES, V. F., NETTO, F. O. G., SOUSA, S. F., SILVA, T. A., AGUIAR, M. C. F. Significado clínico de EGFR, HER-2 e EGF em carcinoma de células escamosas de boca: estudo caso-controle In: II Encontro de Patologia da UFMG, 2010, Belo Horizonte.

Anais de II Encontro de Patologia da UFMG. , 2010.

13. PEREIRA, T. S. F., SOUSA, S. F., NETTO, F. O. G., SOUTO, G. R., AGUIAR, M. C. F., MESQUITA, R. A.

Mastócitos/neoformação vascular no carcinoma de células escamosa de boca com e sem metástase nodal In: XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2010, Belo Horizonte.

Anais de XIX Semana de Iniciação científica da UFMG. , 2010.

14. TANURE, B. B., SOUSA, S. F., CALDEIRA, PC, AGUIAR, M. C. F., MESQUITA, R. A. Fibroblastoma desmoplásico em mucosa jugal In: XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010, Belo Horizonte.

Anais da XVII Jornada Mineira de Estomatologia. , 2010. v.11. p.116 - 116

15. SANTOS, T. P. M., CALDEIRA, PC, SOUSA, S. F., SILVA, T. A., GOMEZ, R. S. Melanoacantoma multifocal In: XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010, Belo

Horizonte.

Anais da XVII Jornada Mineira de Estomatologia. , 2010. v.11. p.107 - 107

16. SOUSA, S. F., RIBEIRO, D. C., NETTO, F. O. G., BERNARDES, V. F., AGUIAR, M. C. F.

Avaliação Imunoistoquímica do EGFR/Her-1 em leucoplasias bucais e sua associação com as proteínas Ki-67 e p27. In: Interantional Association of Oral Pathologists-Seção Latino Americana e Caribenha-2009, 2009, Águas de São Pedro.

Anais de IAOP-Seção Latino Americana e Caribenha 2009. , 2009.

Eventos

Participação em eventos e apresentação de trabalhos

1. **VII Simpósio Internacional "Diálogos entre a clínica e as neurociências: psiquiatria molecular"**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2011.

2. Apresentação de Poster / Paineis no **XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2011.

Densidade vasos linfáticos e neoformados em carcinoma de células escamosas de boca e linfonodos associados.

3. Apresentação de Poster / Paineis no **102nd Annual Meeting Innovation and Collaboration: the path to progress**, Orlando, FL, EUA, 2011.

Lymphatic vessels and neoformed microvessels density in primary oral squamous cell carcinoma and associated lymph nodes.

4. **II Encontro de Patologia da UFMG**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2010

5. Apresentação de Poster / Paineis na **27^a Reunião Anual da SBPqO**, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2010. Avaliação da relação mastócitos/neoformação vascular no carcinoma de células escamosas bucal com e sem metástases nodais.

6. Organização do evento científico **XVII Jornada Mineira de Estomatologia**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2010.

Atuou como membro efetivo da Comissão Avaliadora de Painéis Científicos e Painéis de Casos Clínicos.

7. Apresentação de Poster / Paineis no **International Association of Oral Pathologists-Seção Latino Americana e Caribenha-2009**, São Pedro, SP, Brasil, 2009.

Avaliação Imunoistoquímica do EGFR/Her-1 em Leucoplasias Bucalis e sua associação com as proteínas Ki-67 e p27.