

Frederico Omar Gleber Netto

Neoformação vascular, densidade linfática e expressão  
dos fatores de crescimento vascular A e C em carcinomas  
mucoepidermóides de glândulas salivares menores

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-  
graduação da Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia  
Área de Concentração: Patologia Bucal  
Orientadora: Prof.ª. Dr.ª. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Belo Horizonte / MG

Faculdade de Odontologia / Universidade Federal de Minas Gerais

2011

G554n Gleber Netto, Frederico Omar  
2011 Neoformação vascular, densidade linfática e expressão dos fatores de  
T crescimento vascular A e C em carcinomas mucoepidermóides de glândulas  
salivares menores / Frederico Omar Gleber Netto. 2011.  
71 f.: il.  
Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar  
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Odontologia.  
1. Carcinoma mucoepidermóide – Teses. 2. Glândulas salivares menores  
– 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 "**Neoformação vascular, densidade linfática e expressão dos fatores de crescimento vascular A e C em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores**", área de concentração em **Patologia Bucal**, apresentada por **Frederico Omar Gleber Netto**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia, APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

*Maria Cássia Ferreira de Aguiar*

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

*Sandra Beatriz Chaves Tarquinio*

Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio  
FO-UFPEl

*Vanessa de Fátima Bernardes*

Dra. Vanessa de Fátima Bernardes  
PNPD/CNPq-UFMG

*Efigênia Ferreira e Ferreira*

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**, do candidato **Frederico Omar Gleber Netto**.

Aos 15 de julho de 2011, às 14:00 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. Ao candidato foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho **"Neoformação vascular, densidade linfática e expressão dos fatores de crescimento vascular A e C em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores"**. 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 ao candidato. A Comissão Examinadora opta pela **..APROVAÇÃO.....** do candidato. 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

*“...são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”*

Charles Darwin

*Dedico este trabalho ao meu querido avô que desde cedo me mostrou o valor do conhecimento.*

## **Agradecimentos**

À Ivana por estar sempre ao meu lado, por me apoiar e me incentivar incessantemente, e por ser a fonte de onde eu tiro forças para seguir.

À minha mãe e minha irmã pelo apoio incondicional, pelo carinho e por todas as gargalhadas.

Aos meus queridos avô e avó por terem acreditado e investido tanto em mim.

Ao meu tio Emerson por ser minha maior fonte de inspiração.

À minha tia Beth pelo carinho e incentivo.

À Eliana por me receber tão bem em sua casa em tantas horas de estudo.

À minha orientadora Maria Cássia, pelos valiosos conhecimentos, por todas as oportunidades de crescimento e pela confiança.

À Vanessa pela amizade, por ter confiado e me ensinado tudo o que era preciso saber.

À minha aluna Taynara pela dedicação e pelo bom humor.

Ao professor Elismauro e a professora Aline por terem permitido que esse trabalho fosse realizado.

Aos professores Ricardo Mesquita, Ricardo Gomez, Vagner, Mauro, Dorinha, Carolina e Tarcília pelos valiosos conhecimentos passados e pelos momentos de descontração.

Aos colegas João, Silvinha, Alessandra, Patrícia, Giovanna, Daniela, Telma, Juliana, Soraya, Fabrício, Cláudia, Renata, Alfonso, Elizete, Thiago, Janine, Márcio, Vladimir e Comparth por terem feito esses dois anos mais intensos e divertidos.

Às funcionárias Inês, Zuleica, Beth e Laís por estarem sempre prontas a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fomentar essa pesquisa.

## PREFÁCIO

Esta dissertação de mestrado foi elaborada a partir de uma pesquisa desenvolvida no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, num período de 22 meses, coordenada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar. Este trabalho foi editado na forma de uma compilação de dados através de um artigo científico e está dividido nas seguintes partes:

- Resumo e *Abstract*
- Introdução, abordando os dados mais relevantes descritos na literatura
- Justificativa
- Objetivos (geral e específicos), evidenciando os pontos a serem estudados
- Metodologia, onde serão descritos os processos de obtenção de dados e formas de análise
- Resultados, incluindo um artigo
- Considerações finais, ressaltando os pontos mais relevantes
- Conclusões
- Referências

## Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

- CD105 – *Cluster of differentiation 105*
- CD31 – *Cluster of differentiation 31*
- CD34 – *Cluster of differentiation 34*
- CME – Carcinoma mucoepidermoide
- D2-40 – Anticorpo anti-podoplanina
- DAB – Diaminobenzidina
- HE – Hematoxilina e eosina
- HIF – *Hypoxia inducible fator (Fator induzido por hipóxia)*
- HPF – *High power fields (Campos em maior aumento)*
- Ki-67 – Marcador de proliferação celular
- mM – Milimolar
- mm<sup>2</sup> – Milímetros quadrados
- OMS – Organização mundial da saúde
- PIGF – *Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein*
- SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*
- T1-T2 – Tumores com até 4 centímetros
- T3-T4 – Tumores com mais de 4 centímetros
- Tris-HCl – Hidroximetil amino metano – ácido clorídrico
- USA – *United States of America*
- VEGF – *Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento vascular)*
- VEGF-A – *Vascular endothelial growth factor A*
- VEGF-B – *Vascular endothelial growth factor B*
- VEGF-C – *Vascular endothelial growth factor C*
- VEGF-D – *Vascular endothelial growth factor D*
- VEGF-E – *Vascular endothelial growth factor E*
- VEGFR-1 – *Vascular endothelial growth factor receptor 1*
- VEGFR-2 – *Vascular endothelial growth factor receptor 2*
- VEGFR-3 – *Vascular endothelial growth factor receptor 3*
- vWF – *von Willebrand Factor*



## **Lista de tabelas**

*Tabela 1* – Sistema de gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Auclair et al. (1992)

***Página 3***

*Tabela 2* – Sistema de gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al. (2001)

***Página 3***

*Tabela 3* – Características clinico-patológicas da amostra

***Página 22***

*Tabela 4* – Gradação histopatológica dos casos com desfechos desfavoráveis

***Página 24***

*Tabela 5* – Correlação entre a expressão proteica e a densidade vascular

***Página 29***

*Table 1* – Artigo – Clinicopathological characteristics and microvessel density

***Página 47***

## **Lista de gráficos**

*Gráfico 1* – Associação entre a densidade de vasos neoformados intratumorais e a recorrência tumoral

***Página 25***

*Gráfico 2* – Associação entre a densidade de vasos neoformados intratumorais e a ocorrência de metástases nodais

***Página 26***

*Gráfico 3* – Associação entre a expressão de VEGF-A nas células tumorais e a recorrência tumoral

***Página 27***

*Gráfico 4* – Associação entre a expressão de VEGF-A nas células tumorais e a ocorrência de metástase nodal

***Página 28***

## **Lista de figuras**

*Figure 1* – (Artigo)

***Página 48***

## Resumo

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares menores. Esse tumor é caracterizado por uma grande variabilidade na sua evolução clínica, e até agora, não existem métodos confiáveis para a predição do seu comportamento. A angiogênese representa um passo importante na progressão tumoral, e é considerada um evento essencial para a disseminação metastática. Neste trabalho, procuramos investigar o papel da angiogênese no CME através da avaliação imunohistoquímica das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40, e da mensuração da densidade de vasos neoformados e vasos linfáticos. Foram estudados 26 casos de CME. Apesar de apresentarem uma grande atividade angiogênica, foi observada uma baixa densidade de vasos linfáticos entre esses tumores. As proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 foram comumente observadas no CME, mas apenas a expressão da proteína VEGF-A apresentou correlação com a densidade de vasos neoformados. Recorrências e metástases nodais foram associadas com baixa expressão de VEGF-A e baixa densidade de vasos neoformados, indicando que deficiências na angiogênese podem levar ao desenvolvimento de um fenótipo agressivo. Apesar de a angiogênese parecer importante na modulação da evolução clínica do CME, nenhum dos parâmetros estudados foi capaz de predizer o comportamento desse tumor.

Unitermos:

Carcinoma mucoepidermóide, angiogênese, vasos linfáticos, VEGF-A, VEGF-C

## **Abstract**

Angiogenesis, lymphatic density and expression of vascular endothelial growth factors A and C in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant tumor of salivary glands. This tumor is characterized by a great variability in clinical behavior, and there is no entirely reliable method to determine prognosis of this tumor. Angiogenesis is an important step in tumor progression and is believed to be an essential event for metastatic dissemination. We aimed to investigate the role of angiogenesis in MEC through immunohistochemical evaluation of VEGF-A, VEGF-C and D2-40 proteins and measuring the density of neoformed and lymphatic vessels. We studied 26 cases of MEC, which showed great angiogenic activity measured by neoformed vessel density. However, a low density of lymphatics was observed. VEGF-A, VEGF-C and D2-40 were commonly detected in MEC, but only VEGF-A expression correlated with neoformed vessel density. Recurrence and nodal metastasis were associated with low VEGF-A expression and low neoformed vessel density, indicating that impaired angiogenesis could lead to an aggressive phenotype. Although angiogenesis seems important in the modulation of MEC compartment, none of the parameters analyzed could predict tumor behavior.

Key Words:

Mucoepidermoid carcinoma, angiogenesis, lymphatic vessels, VEGF-A, VEGF-C

# Sumário

<b>Introdução</b>	1
Carcinoma mucoepidermóide	2
Angiogênese tumoral	4
Densidade vascular tumoral	6
<b>Justificativa</b>	11
<b>Objetivos</b>	13
Objetivos específicos	14
Objetivos gerais	14
<b>Metodologia</b>	15
Seleção de casos e obtenção da amostra	16
Realização da técnica imunoistoquímica	16
Análise da marcação imunoistoquímica	18
Análise de dados	19
Aspectos éticos e legais	20
<b>Resultados</b>	21
Densidade vascular	23
Expressão de VEGF-A, VEGF-C e D2-40 nas células tumorais	23
Expressão de VEGF-A e VEGF-C nas células inflamatórias relacionadas ao tumor	24
Associações clinico-patológicas	24
Densidade de vasos neoformados e características clinico-patológicas	25
Densidade de vasos linfáticos e características clinico-patológicas	26
Imunoexpressão de VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e características clinico-patológicas	27
Correlações entre a imunoexpressão de VEGF-A, -C e D2-40 e a densidade vascular	28
<b>Artigo</b>	30
<b>Considerações finais</b>	49
<b>Conclusões</b>	52
<b>Referências</b>	54
<b>Anexos</b>	58

# ***Introdução***

## *Carcinoma mucoepidermóide*

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares menores, podendo representar até 41% de todos os carcinomas que se desenvolvem nesses sítios. (Brandwein 2001) Desde a sua primeira descrição, por Stewart e colaboradores em 1945, essa lesão tem sido alvo de várias controvérsias, principalmente devido à diversidade de comportamento clínico observado entre indivíduos afetados pela mesma doença. (Luna et al. 2006) Enquanto a maioria dos pacientes apresenta curso clínico bom após a remoção cirúrgica da lesão, um pequeno grupo de casos revela um tumor altamente agressivo, caracterizado por descontrole regional e disseminação à distância, muitas vezes levando o paciente ao óbito. Essa disparidade de características clínicas levou os profissionais da área da saúde a tentar estabelecer critérios que pudessem separar os tumores de comportamento distinto. (Guzzo et al. 2002)

O CME se origina a partir de dois grupos celulares denominados células luminais e células não-luminais, que são componentes básicos da estrutura morfológica da glândula salivar, mas que possuem participação variável na formação de cada tumor. Assim, os padrões de arquitetura histológica e de constituição celular variam bastante entre diferentes lesões. Considerando esse aspecto, sugeriu-se que a distinção entre lesões de comportamentos diferentes poderia ser feita a partir das suas características morfológicas, através da gradação histopatológica, tornando-se a ferramenta mais utilizada para esse propósito. (Dardick 2009 3rd Edition)

Entretanto, os critérios utilizados para a gradação histopatológica eram bastante variados, invariavelmente subjetivos e ainda não se consolidaram como um sistema plenamente aceito e seguro. (Luna 2006, Speight & Barret 2009)

Dentre os diferentes sistemas de gradação destacam-se os propostos por Auclair et al. (1992) (Tabela 1), que é o sistema atualmente preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e por Brandwein et al. (2001) (Tabela 2). Esses dois sistemas são os mais utilizados e se baseiam na classificação do CME em 3 graus, denominados baixo grau, grau intermediário e alto grau. Quanto maior o grau do tumor maior é a

probabilidade de ocorrência de um prognóstico desfavorável para o paciente. Entretanto, ambos apresentam limitações importantes. Enquanto o sistema de Auclair et al. (1992) tende a classificar lesões agressivas em graus mais baixos, promovendo o sub-tratamento do paciente, o sistema de Brandwein et al. (2001) tende a classificar em graus mais altos lesões clinicamente favoráveis, podendo levar à utilização de intervenções terapêuticas desnecessárias. (Ozawa et al. 2008, Goode et al. 1998, Luna 2006) Portanto, mesmo os métodos de gradação histopatológica mais utilizados e preconizados não são eficazes e seguros para todos os pacientes.

*Tabela 1. Sistema de gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Auclair et al. (1992)*

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>PONTOS</b>
Componente intracístico menor que 20%	+2
Invasão neural	+2
Necrose	+3
Mitoses (4 ou mais / 10 HPF*)	+3
Anaplasia	+4
<b>GRAU DE MALIGNIDADE</b>	<b>PONTOS</b>
• Baixo	0-4
• Intermediário	5-6
• Alto	7 ou mais

\*HPF – high power fields (campos de maior aumento)

*Tabela 2. Sistema de gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al. (2001)*

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>PONTOS</b>
Componente intracístico menor que 25%	2
Padrão de invasão do tumor em pequenos ninhos e ilhas	2
Atipia nuclear pronunciada	2
Invasão linfática e/ou vascular	3
Invasão óssea	3
Acima de 4 mitoses / 10 HPF*	3
Extensão perineural	3
Necrose	3
<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>PONTOS</b>
• Grau I	0
• Grau II	2-3
• Grau III	4 ou mais

\*HPF – high power fields (campos de maior aumento)



Considerando essas limitações, diversos estudos têm procurado determinar características biológicas que auxiliem a melhor compreensão da lesão e permitam uma predição prognóstica mais confiável. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares pode ser uma possível solução para estas questões. (Shi et al. 2007)

### *Angiogênese tumoral*

Angiogênese é o processo biológico caracterizado pela formação de novos vasos, podendo ocorrer tanto em condições fisiológicas quanto em processos patológicos. (Korpelainen & Alitalo 1997) Desde 1971, quando Judah Folkman propôs que o crescimento tumoral e a disseminação metastática são processos dependentes da ocorrência da angiogênese, diversos trabalhos se propuseram a investigar esse fenômeno em praticamente todas as neoplasias malignas humanas. (Carmeliet & Jain 2000)

A formação desses novos capilares ocorre a partir de vasos pré-existentes, através de um processo de brotamento (*sprouting*) ou invaginação (*intussusception*) de células endoteliais. Durante este processo essas células degradam a membrana basal subjacente, migram pelo tecido circunjacente, proliferam e se reúnem em estruturas tubulares que coalescem, permitindo assim a circulação. (Korpelainen & Alitalo 1997) Nas neoplasias, esse processo pode ser estimulado após o tumor atingir um tamanho no qual a vasculatura local se torna insuficiente para a nutrição do tecido. Em termos estruturais esses novos vasos podem se apresentar anormais, muitas vezes não funcionais, ou mesmo, altamente permeáveis devido a sua má-formação, sendo mais susceptíveis à invasão por células neoplásicas invasoras. Assim, o desenvolvimento de novos vasos no estroma tumoral é importante não só para suprir este tecido de nutrientes e oxigênio, mas também para servir como rota de disseminação das células tumorais para sítios distantes ao tumor. (Fox 1996)

Atualmente, é bem estabelecido que a angiogênese é um processo controlado por fatores pró-angiogênicos e fatores anti-angiogênicos. Quando a ação dos fatores pró-angiogênicos excede os outros fatores diz-se que

existe um “switch” angiogênico. Diversos eventos têm sido descritos como iniciadores do “switch” angiogênico, como o estresse metabólico, causado por baixas tensões de oxigênio, baixo pH ou hipoglicemia; estresse mecânico, causado, por exemplo, pela proliferação das células neoplásicas; resposta imune/inflamatória; e mutações genéticas, como ativações de oncogenes ou deleções de genes supressores de tumor. As moléculas envolvidas nesse balanço pró e anti-angiogênese podem ser produzidas por diversas células, como as endoteliais, estromais, sanguíneas, da matriz extracelular, ou mesmo pelas células neoplásicas, sendo que a participação de cada componente pode variar de acordo com o tipo e local do tumor e estágio de desenvolvimento do mesmo. São diversas as moléculas envolvidas neste mecanismo, mas destacam-se as moléculas da família dos fatores de crescimento vascular (VEGF), por possuir um papel fundamental neste processo. (Carmeliet & Jain 2000)

As moléculas da família do VEGF são reguladoras primárias da angiogênese atuando diretamente sobre as células endoteliais. Essa família de moléculas é composta por seis membros ligantes, sendo eles o PlGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, e três receptores, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Quando ligantes e receptores se interagem, podem ser observados fenômenos como o crescimento, migração e sobrevivência de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e degradação da matriz extracelular. (Korpelainen & Alitalo 1998, Hicklin & Ellis 2005) Entretanto, existem diferentes níveis de afinidade entre os diferentes ligantes e receptores, e neste trabalho nos concentraremos nos ligantes VEGF-A e VEGF-C.

O VEGF-A é o ligante mais conhecido desta família, sendo expresso em várias isoformas, devido a *splicings* alternativos que levam a formação de proteínas com 121, 165, 189 e 206 aminoácidos. O VEGF-A possui afinidade pelos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, tendo como principais efeitos a proliferação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular, sendo também um importante fator de sobrevivência para células endoteliais, através da inibição de moléculas pró-apoptóticas. Sua produção é estimulada intensamente em ambientes de hipóxia, onde o fator induzido por hipóxia, ou HIF, é estimulado, e promove a sua transcrição. A expressão do VEGF-A já

foi observada em diversas neoplasias sólidas humanas, revelando uma associação significativa com o aumento da densidade vascular tumoral e com comportamento clínico agressivo. Apesar de, nos tumores, as células neoplásicas serem a principal fonte de VEGF-A, outros tipos celulares, como as células inflamatórias, também podem expressar esta proteína influenciando significativamente no ambiente tumoral. (Ferrara 2004, Tammela et al. 2005)

O ligante VEGF-C, da mesma forma, possui afinidade pelo receptor VEGFR-2, promovendo a angiogênese. Entretanto, seu papel mais estudado é relacionado à sua ação sobre o receptor VEGFR-3. Ao se ligar a esse receptor, o VEGF-C estimula exclusivamente a proliferação de vasos linfáticos, fenômeno denominado linfangiogênese. A expressão de VEGF-C têm sido detectada em inúmeros tumores humanos, como os de cabeça e pescoço, mostrando forte correlação com o aumento da densidade de vasos linfáticos tumorais e com o aumento da ocorrência de metástases nodais. A relação entre a ocorrência de metástase nodal e a expressão de VEGF-C pelas células tumorais não se restringe ao fato de essa proteína induzir a proliferação de vasos linfáticos, mas também por atuar sobre receptores VEGFR-3 expressos pelas próprias células neoplásicas. Esse mecanismo autócrino induz o aumento da mobilidade e capacidade invasora da célula neoplásica, culminando em um fenótipo invasor mais propenso a desenvolver metástases. (Tammela et al. 2005, Su et al. 2006, Su et al. 2007)

Portanto, o estudo dessas proteínas no CME pode indicar possíveis variações biológicas que expliquem melhor a variabilidade de comportamento clínico desse tumor.

### *Densidade vascular tumoral*

A técnica imunoistoquímica tem se mostrado uma ferramenta importante para o estudo da angiogênese tumoral. Através da utilização de anticorpos específicos é possível identificar morfológica e não só a localização da expressão dos fatores de crescimento vascular, como também, mensurar e visualizar a microvasculatura tumoral.

A investigação dos vasos tumorais se iniciou em 1972, quando Brem e colaboradores propuseram a sua mensuração microscópica. Diversos pesquisadores foram influenciados por este trabalho, e alguns demonstraram que, com o aumento da vascularização no tumor várias medidas de agressividade tumoral também aumentavam, como a ocorrência de metástase e diminuição da sobrevida do paciente. (Nico et al. 2008) Entretanto, esses estudos possuíam limitações importantes relacionadas a forma da contagem de vasos e a ausência de marcadores específicos de endotélio, tornando a técnica pouco confiável e reprodutível.

Em 1991, Weidner e colaboradores desenvolveram um novo método de mensuração da densidade microvascular a partir de microscópio de luz e marcação imunoistoquímica de células endoteliais. Esses autores realizavam a mensuração da densidade de vasos em áreas específicas do tumor caracterizadas por alta vascularização, chamadas de *hotspots*. A partir dessa metodologia Weidner et al. (1991) demonstrou que a densidade microvascular intratumoral em tumores mamários com mau prognóstico e metástase era duas vezes maior do que em tumores de pacientes com bom prognóstico e sem metástases. A mesma metodologia foi aplicada em tumores de próstata, revelando resultados semelhantes.

Entretanto, alguns estudos subsequentes não foram capazes de demonstrar associação entre a densidade vascular e o prognóstico dos pacientes, e muitos questionamentos em relação a essa ferramenta foram levantados. De fato, a avaliação da densidade vascular apresenta grande variabilidade entre diferentes estudos. Estas variações se relacionam à falta de padronização da técnica imunoistoquímica, à especificidade do anticorpo utilizado, à forma de seleção da área a ser avaliada, ao número de campos a serem contados ou mesmo às interpretações do próprio observador. Porém, segundo Fox (1997), todos esses trabalhos que não encontraram relação entre o prognóstico e a mensuração da vascularização se afastaram, de alguma forma, da metodologia proposta por Weidner et al. (1991), ou nem ao menos a utilizaram. Sendo assim, essa metodologia continua sendo a mais aceita e indicada para este fim.

Para que essa mensuração seja fidedigna, é necessário o emprego de marcadores imunoistoquímicos que destaquem os vasos com considerável

especificidade, a fim de evitar falsas interpretações. Anticorpos pan-endoteliais, que possuem reatividade para diversos tipos de endotélio, como os anticorpos CD31, CD34 e vWF, tornaram-se populares para este fim. Entretanto, esses anticorpos possuem alta capacidade de marcar células endoteliais de vasos sanguíneos calibrosos, mas falham em reconhecer o endotélio de microvasos, podendo assim, subestimar a densidade vascular do tumor. (Duff et al. 2003) Além disso, eles apresentavam a limitação de não distinguir os diferentes tipos de vasos, e não discriminavam o endotélio quiescente do endotélio em proliferação. (Nico et al. 2008) Dessa forma, novos anticorpos foram criados para suprir essas necessidades e tentar melhorar o potencial preditivo desta ferramenta.

As células endoteliais são normalmente estáveis e possuem uma baixa taxa de *turnover*, com um tempo de replicação em torno de 1000 dias. Já o endotélio angiogênico, denominado de endotélio ativado, possui um *turnover* extremamente maior e, devido à sua ativação, revela um padrão de expressão proteica diferenciado do endotélio quiescente. Recentemente, foi desenvolvido um anticorpo com afinidade bastante significativa para o endotélio ativado, possuindo a capacidade de se ligar a uma proteína denominada CD105. CD105 ou endogлина é uma proteína associada à proliferação celular, abundantemente expressa e praticamente restrita à células endoteliais angiogênicas. Sua expressão é significativamente diferenciada entre tecidos normais e tecidos neoplásicos, sendo basicamente encontrada nesses últimos. Devido a sua alta expressão em tecidos neoplásicos, acredita-se que ela possui papel importante na angiogênese tumoral. Foi verificado que a mensuração dos níveis de expressão de CD105 se correlacionava significativamente com o estágio de progressão do tumor e com a ocorrência de metástase. Kumar et al. (1999) comparou a densidade vascular de tumores de mama utilizando anticorpos anti-CD105 e anti-CD34, e constatou que a contagem de microvasos utilizando o CD105 se correlacionava significativamente com a sobrevida total e livre de doença, o que não foi observado com a utilização do anticorpo anti-CD34. Assim, foi sugerido que a mensuração vascular através do anticorpo anti-CD105 representaria melhor a atividade angiogênica tumoral e que este seria melhor

preditor de comportamento neoplásico do que outros marcadores pan-endoteliais. (Duff et al. 2003, Martone et al. 2005, Dallas et al. 2008)

O papel dos vasos linfáticos na carcinogênese permaneceu obscuro durante muitos anos devido à inexistência de marcadores específicos para esse tipo de endotélio e à dificuldade de discriminação morfológica dos mesmos. (Clarijs et al. 2001, Kahn & Marks 2002) Semelhantes aos vasos sanguíneos, os linfáticos são formados uma única camada de células endoteliais, entretanto, não são circundados por pericitos ou células musculares lisas, apresentam uma membrana basal pouco desenvolvida ou mesmo ausente e não apresentam junções celulares firmes, o que permite um acesso fácil de macromoléculas, fluidos e células para o lúmen do vaso. Dessa forma, acredita-se que estes vasos são extremamente susceptíveis à invasão por células neoplásicas, facilitando a disseminação do tumor para os linfonodos. De fato, a disseminação metastática a partir de vasos linfáticos constitui a via de disseminação mais comum entre os tumores humanos. Em adultos, a vasculatura linfática permanece quiescente, entretanto têm sido sugerido que em processos neoplásicos possa ocorrer a proliferação desses vasos próximos ao parênquima tumoral, processo denominado de linfangiogênese. (Hajjami & Petrova 2008) Os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda são pouco entendidos e muitos autores questionam se este realmente ocorre. (Clarijs et al. 2001)

Com a descoberta de padrões de expressão proteica específicos das células endoteliais linfáticas, foi possível a criação de marcadores moleculares específicos que possibilitaram o esclarecimento do papel dos vasos linfáticos no tumor. Verificou-se que estes vasos apresentavam a particularidade de expressar uma proteína denominada podoplanina, ausente em células endoteliais de vasos sanguíneos. Alguns anticorpos com afinidade para esta molécula foram criados, e dentre eles destaca-se o anticorpo D2-40, que possui grande especificidade e reatividade a um epitopo da podoplanina resistente à formalina. (Evangelou et al. 2005) Com o advento deste anticorpo foi verificado que, em diversos tumores, inclusive em carcinomas de boca, o aumento da densidade de vasos linfáticos esteve associado ao aumento da ocorrência de metástases nodais, sugerindo que

esse aumento seria um facilitador para a disseminação metastática. (Miayahara et al. 2007, Siriwardena et al. 2008)

A utilização do anticorpo D2-40 associado a marcadores de proliferação celular como o Ki-67, revelou que, em alguns tumores, os vasos linfáticos apresentavam atividade proliferativa. (Soares et al. 2007) Entretanto, é questionado se esses vasos linfáticos neoformados são funcionais, já que alguns trabalhos demonstram que estes podem ser malformados e não apresentar conexão com a vasculatura linfática pré-existente. (Hajjami & Petrova 2008, Beasley et al. 2002)

Como muitos outros marcadores moleculares, o anticorpo D2-40 não reage exclusivamente com células endoteliais linfáticas, revelando reatividade, por exemplo, a queratinócitos basais, células mioepiteliais, células dendríticas foliculares, e inclusive a algumas células neoplásicas. Essa expressão da podoplanina nas células tumorais foi verificada em diversas neoplasias humanas como o carcinoma de células escamosas, tumores ovarianos e do sistema nervoso central. O achado dessa expressão têm sido relacionado a tumores agressivos e de prognóstico ruim. Acredita-se que isso se deva ao fato de que a podoplanina é uma molécula que possui a habilidade de remodelar a actina no citoesqueleto, contribuindo para uma motilidade celular aumentada. Dessa forma células neoplásicas com a expressão dessa proteína estariam mais aptas a disseminação e geração de metástase. (Raica et al. 2008)

Considerando a potencialidade do estudo dos fenômenos relacionados à angiogênese na determinação prognóstica das neoplasias, este trabalho se propôs a verificar a expressão das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e mensurar a densidade de vasos neoformados e vasos linfáticos no CME de glândulas salivares menores com o objetivo de melhor compreender a biologia desse tumor e verificar o potencial prognóstico desses marcadores nessa doença.

## ***Justificativa***



O estudo da angiogênese tem promovido uma significativa melhora na compreensão e na predição prognóstica de diversas neoplasias humanas. Considerando que o CME carece de entendimento sobre a sua biologia e pouco se sabe sobre os mecanismos que levam alguns tumores a desenvolver comportamento agressivo, acreditamos que o estudo das proteínas relacionadas à proliferação vascular e à mensuração da densidade de vasos ofereça respostas para melhor compreender esse tumor.

## ***Objetivos***

## **Objetivos gerais**

Avaliar, por método imunohistoquímico, a expressão das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e mensurar a densidade de vasos neoformados (CD105) e linfáticos (D2-40) em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores.

## **Objetivos específicos**

Verificar a densidade de vasos neoformados e vasos linfáticos no tumor, e sua relação com características clínico-patológicas da doença, tais como gênero, idade, localização e tamanho do tumor, presença de metástase nodal ou à distância, recorrências, graduação histopatológica e mortes decorrentes do tumor.

Verificar o padrão de expressão das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e a relação entre a expressão dessas proteínas com características clínico-patológicas da doença, tais como gênero, idade, localização e tamanho do tumor, presença de metástase nodal ou à distância, recorrências, graduação histopatológica e mortes decorrentes do tumor.

Verificar se há correlação entre a expressão das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40, e a densidade de vasos neoformados e linfáticos.

Verificar, através da análise de sobrevida, o potencial prognóstico das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e da densidade de vasos neoformados e linfáticos no carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares menores.

## ***Metodologia***

Realizou-se um estudo retrospectivo, sendo que a obtenção dos dados foi feita através de pesquisa documental e observacional. Foram utilizados dados referentes às características clínicas dos pacientes e da neoplasia descritos nos prontuários médicos, características histopatológicas obtidas a partir de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) e cortes histológicos obtidos de blocos de parafina para realização de imunohistoquímica.

#### *Seleção de casos e obtenção da amostra*

A amostra selecionada compreendeu a totalidade de casos de CME ocorridos em glândulas salivares menores, obtidos no momento da exérese da neoplasia, fixados em formol tamponado, incluídos em parafina, diagnosticados e arquivados no Laboratório de Patologia do Hospital Araújo Jorge de Goiânia. A utilização do material deste arquivo foi possível devido à participação no Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad – UFGO/UFMG/UNICAMP/UFCE).

O diagnóstico foi confirmado através da avaliação das lâminas coradas em HE em microscópio ótico de luz e, em seguida, as amostras foram graduadas histopatologicamente de acordo com os critérios estabelecidos por Auclair et al. (1992) (Tabela 1). Novas lâminas foram obtidas e, em seguida, submetidas à técnica imunohistoquímica para identificação de vasos neoformados, vasos linfáticos e das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40.

Casos com diagnóstico histopatológico duvidoso e insuficiência de material foram critérios de exclusão.

#### *Realização da técnica imunohistoquímica*

Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro com carga para a realização da técnica imunohistoquímica. A sequência de passos desta técnica segue abaixo:

- 1 – Desparafinização em xileno, hidratação do tecido em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%) e lavagem em água destilada.
- 2 – Recuperação antigênica específica para cada anticorpo:
  - a) CD105 – Pepsina pH1.8 por 13 minutos em estufa a 37°C

- b) D2-40 – Ácido cítrico pH6.0 por 30 minutos em banho maria a 96°C
  - c) VEGF-A – Ácido cítrico pH6.0 por 30 minutos em banho maria a 96°C
  - d) VEGF-C – Ácido cítrico pH6.0 por 30 minutos em banho maria a 96°C
- 3 – Resfriamento dos tecidos e lavagem com água destilada.
- 4 – Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%.
- 5 – Lavagem com tampão Tris-HCl 20 mM pH7.4
- 6 – Incubação com anticorpo primário por 1 hora em temperatura ambiente, seguindo as seguintes diluições:
- a) Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano CD105, Endoglin (clone SN6h) (DakoCytomation, USA) – 1:30.
  - b) Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano D2-40 (clone D2-40) (DakoCytomation, USA) – 1:100.
  - c) Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano VEGF (clone VG1) (DakoCytomation, USA) – 1:25.
  - d) Anticorpo policlonal de coelho anti-humano VEGF-C (clone Z-CVC7) (Invitrogen, USA) – 1:100.
- 7 – Lavagem em Tris-HCl 20mM pH7.4
- 8 – Amplificação da reação através de incubação com o sistema Dako Advance™ HRP (DakoCytomation, USA) de dois passos por 30 minutos cada.
- 9 – Lavagem em Tris-HCl 20mM pH7.4
- 10 – Detecção da marcação com Dako Liquid DAB + Substrate-Chromagen System.
- 11 – Contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 30 segundos.
- 12 – Lavagem em água destilada.
- 13 – Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e 100%) e diafanização em xileno.
- 14 – Montagem das lâminas com laminulas de vidro e Tissue-Mount™.

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário. O controle positivo para todas os anticorpos foram estruturas histológicas normais presentes adjacentes ao tumor.

### *Análise da marcação imunoistoquímica*

A avaliação da expressão imunoistoquímica foi realizada sem o conhecimento prévio das características clínicas do tumor ou do grau de malignidade, através de microscópio óptico de luz (Carl Zeiss, USA).

A avaliação da densidade vascular obtida a partir da reação com os anticorpos CD105 e D2-40 foi realizada de acordo com o método proposto por Weidner et al. (1991), como descrito a seguir:

- a) Escaneamento da lâmina em menor aumento (100x) buscando identificar as áreas de maior densidade de vasos marcados, e seleção de 3 desses campos na região intratumoral e 3 campos na região peritumoral adjacente ao tumor.
- b) Contagem, em maior aumento (400x), do total de vasos marcados por campo, equivalente à área de 0.1024 mm<sup>2</sup>.
- c) Estabelecimento da média de vasos nos 3 campos intratumorais e nos 3 campos peritumorais avaliados. O valor final de cada região (intra e peritumoral) foi expressa na forma de média ± desvio padrão.

A avaliação da expressão das proteínas VEGF-A e VEGF-C nas células tumorais foi realizada como exposto a seguir:

- a) Escaneamento da lâmina em menor aumento (100x) buscando identificar o eixo do tumor (horizontal ou vertical) com maior densidade de células positivas.
- b) Contagem do número total de campos presentes no eixo escolhido em aumento de 400x.
- c) O número total de campos foi dividido por 10 e subtraído por 1 para a obtenção do número de campos a serem saltados durante a análise
- d) Avaliação de 10 campos no eixo escolhido. Cada campo recebeu um escore de acordo com o seguinte critério: 0 – ausência de expressão; 1 – até 25% de células positivas; 2 – de 26% a 50% de células positivas; 3 – 51% a 75% de células positivas; 4 – mais de 76% de células positivas.

- e) Determinação do escore final da lâmina a partir da média dos escores de cada campo.

A avaliação da expressão das proteínas VEGF-A e VEGF-C nas células inflamatórias adjacentes ao tumor foi realizada da seguinte forma:

- a) Escaneamento da lâmina em menor aumento (100x) buscando identificar as regiões com maior densidade de células inflamatórias positivas.
- b) Contagem, em 3 desses campos, do número total de células inflamatórias e contagem do número de células positivas.
- c) Estabelecimento da porcentagem de células positivas por campo e a média total nos três campos, sendo o resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

A expressão da proteína D2-40 nas células neoplásicas foi avaliada de acordo com o seguinte critério: Ausência de marcação – negativo; presença de marcação em qualquer proporção de células – positivo.

#### *Análise de dados*

Os dados obtidos a partir da expressão imunoistoquímica das proteínas CD105, D2-40, VEGF-A e VEGF-C foram associados às características clinicopatológicas de acordo com os seguintes testes estatísticos realizados no Software SPSS (Ver.17.0 – USA):

- A associação entre os achados imunoistoquímicos e características clinico-patológicas foram verificados a partir do teste T para dados paramétricos e a partir do teste Mann-Whitney para os dados não-paramétricos.
- A correlação entre a densidade de vasos e a expressão das proteínas VEGF-A, VEGF-C e D2-40 foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson para os dados paramétricos e através do coeficiente de Spearman para os dados não-paramétricos.
- Para as associações entre os dados clinico-patológicos e a expressão de D2-40 nas células neoplásicas foi utilizado o teste do qui-quadrado.
- Para determinar fatores prognósticos foi utilizada a análise univariada do modelo de riscos proporcionais de Cox. A avaliação dos efeitos



combinados foi realizada através da análise multivariada do modelo de riscos proporcionais de Cox.

- As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ .

#### *Aspectos éticos e legais*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número 043-2011 (Anexo 1), obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 e 347/05 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

## ***Resultados***

Foram estudados 26 casos de carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares menores. Os dados clínico-patológicos encontram-se descritos na tabela 3.

**Tabela 3 – Características clínico-patológicas da amostra**

	<i>Total de casos</i>	<i>N (%)</i>
<b>Gênero</b>	<i>Masculino</i>	<b>26 (100)</b>
	<i>Feminino</i>	10 (38.5)
		16 (61.5)
<b>Idade (anos)</b>	<i>10 a 19</i>	5 (19.2)
	<i>20 a 29</i>	6 (23.1)
	<i>30 a 39</i>	4 (15.4)
	<i>40 a 49</i>	4 (15.4)
	<i>50 a 59</i>	2 (7.7)
	<i>60 a 69</i>	2 (7.7)
	<i>70 a 79</i>	3 (11.5)
<b>Sítio acometido</b>	<i>Palato</i>	13 (50)
	<i>Mucosa jugal</i>	5 (19.2)
	<i>Língua</i>	5 (19.2)
	<i>Assoalho bucal</i>	2 (7.7)
	<i>Trígono retromolar</i>	1 (3.8)
<b>Tamanho</b>	<i>T1-T2</i>	20 (76.9)
	<i>T3-T4</i>	6 (23.1)
<b>Metástase nodal</b>	<i>Ausente</i>	21 (80.8)
	<i>Presente</i>	5 (19.2)
<b>Metástase à distância</b>	<i>Ausente</i>	25 (96.2)
	<i>Presente</i>	1 (3.8)
<b>Recorrência</b>	<i>Ausente</i>	23 (88.5)
	<i>Presente</i>	3 (11.5)
<b>Gradação histopatológica</b>	<i>Baixo grau</i>	21 (80.8)
	<i>Moderado grau</i>	2 (7.7)
	<i>Alto grau</i>	3 (11.5)
<b>Óbitos</b>		3 (11.5)

A prevalência da doença foi maior entre as mulheres, afetando diferentes faixas etárias, inclusive indivíduos jovens na segunda década de vida. O palato foi o sítio mais acometido com 50% dos casos localizados nesta região. Tumores pequenos (T1-T2) foram os mais prevalentes no momento do diagnóstico (20 casos, 76.9%). Cinco casos apresentaram metástase nodal e apenas 1 caso desenvolveu metástase à distância para olho e cérebro. As recorrências ocorreram em 3 casos, mesmo número de

pacientes que morreram em decorrência do tumor. A maior parte dos tumores foi graduada como de baixo grau de malignidade (21 casos, 80.8%).

#### *Densidade vascular*

A neoformação vascular foi um achado comum nos casos estudados. Este evento só não foi observado em 3 tumores, considerando tanto a região intratumoral quanto a peritumoral. A atividade angiogênica foi maior no interior do tumor do que na sua periferia, sendo a densidade de vasos neoformados no seu interior de  $19.58 \pm 13.91$  vasos, e no estroma peritumoral de  $10.90 \pm 7.79$  vasos.

Contrariamente, a presença de vasos linfáticos no interior do tumor foi um evento raro, apenas 6 (23%) casos revelaram vasos linfáticos intratumorais. Ainda assim, nos casos em que foram observados estes eram escassos, sendo a densidade média de  $0.54 \pm 1.15$  vasos por campo. Por outro lado, vasos linfáticos peritumorais foram mais comuns, sendo a densidade média de  $5.66 \pm 3.43$  vasos. Apenas dois casos não revelaram vasos linfáticos no estroma peritumoral.

#### *Expressão de VEGF-A, VEGF-C e D2-40 nas células tumorais*

A expressão de VEGF-A foi observada em grande parte dos casos como uma marcação de fraca a moderada no citoplasma e núcleo das células tumorais. Apenas um caso não revelou expressão de VEGF-A.

A expressão de VEGF-C foi observada em todos os casos estudados, presente no citoplasma e núcleo celular com intensidade predominantemente de moderada a forte.

A expressão de D2-40 nas células neoplásicas apresentou padrão distinto entre os diversos tumores. Quatro (15.4%) casos não revelaram nenhuma expressão de D2-40, oito (30.8%) casos revelaram expressão fraca restrita às células periféricas dos ninhos tumorais e os casos restantes (n=14, 53.8%) revelaram expressão de moderada a forte nas demais células neoplásicas.

## *Expressão de VEGF-A e VEGF-C nas células inflamatórias relacionadas ao tumor*

A média de expressão de VEGF-A no estroma peritumoral foi de  $8.17 \pm 8.11$  células positivas por foco de células inflamatórias. Em 4 (15.4%) casos esta expressão não foi identificada. Já a expressão de VEGF-C foi observada em todos os casos, sendo a média igual a  $34.76 \pm 20.90$  células positivas por foco, bem mais representativa do que a expressão de VEGF-A.

## *Associações clínico-patológicas*

Metástases nodais ocorreram em lesões que se originaram na língua (2 casos), assoalho bucal (2 casos) e palato (1 caso). Embora não tenha sido notada diferença significativa estatisticamente, isso representa 100% dos casos de tumores do assoalho bucal, 40% dos tumores de língua e apenas 7.7% dos tumores do palato. Foi observado que indivíduos jovens apresentavam maior propensão em ter lesões no palato ( $n=10$ , 66%) enquanto indivíduos mais velhos revelavam lesões em sítios mais variados ( $p=0.01$ ).

Tumores avançados (T3-T4), metástase nodal e metástase a distância ocorreram preferencialmente em indivíduos com idade avançada (acima de 40 anos), onde 5 (83.3%) dos 6 casos de tumores avançados (T3-T4), 4 (80%) dos 5 casos de metástase nodal e o único caso de metástase à distância, ocorreram em indivíduos desse grupo etário.

A gradação histopatológica não se relacionou a nenhum dado clínico-patológico, sendo que metástases nodais, recorrências e óbitos ocorreram principalmente em tumores de baixo grau. (Tabela 4)

***Tabela 4 – Gradação histopatológica dos casos com desfechos desfavoráveis***

<b>Gradação histopatológica</b>	<b>Recorrência (<math>n=3</math>)</b>	<b>Metástase nodal (<math>n=5</math>)</b>	<b>Metástase à distância (<math>n=1</math>)</b>	<b>Óbitos (<math>n=3</math>)</b>
<i>Baixo grau</i>	2 (66.6%)	3 (60%)	0	2 (66.6%)
<i>Grau moderado</i>	1 (33.3%)	1 (20%)	1 (100%)	1 (33.3%)
<i>Alto grau</i>	0	1 (20%)	0	0

O desfecho morte esteve associado significativamente com tumores mais avançados (T3-T4) ( $p=0.008$ ) e apresentou tendência de associação com a idade do paciente, sendo que todos os óbitos ocorreram em indivíduos com mais de 40 anos ( $p=0.06$ ).

### *Densidade de vasos neoformados e características clínico-patológicas*

A densidade de vasos neoformados intratumorais foi significativamente maior em pacientes até a quarta década de vida ( $23.7\pm 15.78$ ) quando comparados a pacientes acima desta faixa etária ( $13.98\pm 8.66$ ) ( $p=0.05$ ). Tumores que recorreram apresentaram densidade de vasos neoformados menor ( $2.33\pm 4.04$ ) do que tumores que não recorreram ( $21.83\pm 13.13$ ) ( $p=0.019$ ). (Gráfico 1) Os casos que apresentaram disseminação nodal da doença apresentaram densidade de vasos neoformados ( $9.04\pm 9.23$ ) significativamente menor do que os casos sem doença nodal ( $22.10\pm 13.79$ ) ( $p=0.05$ ). (Gráfico 2) Embora não tenha sido observada associação estatisticamente significativa, tumores de indivíduos que vieram a óbito apresentavam média de vasos neoformados intratumorais menor ( $9.96\pm 9.25$ ) do que o grupo de tumores de pacientes vivos ( $20.84\pm 14.06$ ) ( $p=0.20$ ).

Gráfico 1. Associação entre a densidade de vasos neoformados intratumorais e a recorrência tumoral

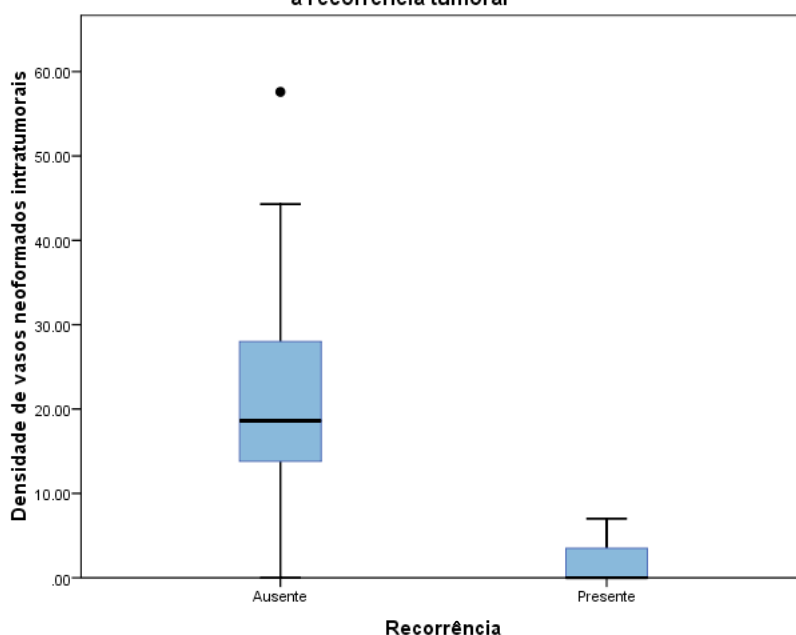
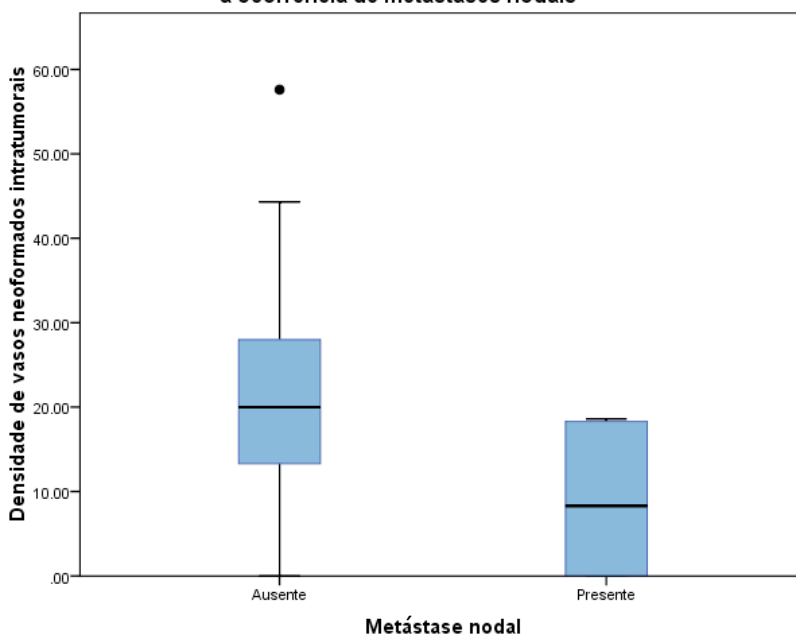


Gráfico 2. Associação entre a densidade de vasos neoformados intratumorais e a ocorrência de metástases nodais



Não foram observadas associações significativas entre as características clínico-patológicas da doença e a densidade de vasos neoformados peritumorais.

#### *Densidade de vasos linfáticos e características clínico-patológicas*

Foi observada uma tendência de aumento na densidade de vasos linfáticos intra-tumorais ( $1.30 \pm 1.30$ ) nos casos que recorreram quando comparados aos casos não recorrentes ( $0.44 \pm 1.13$ ) ( $p=0.06$ ).

Tumores T3-T4 revelaram tendência em apresentar maior densidade de vasos peritumorais ( $7.91 \pm 4.14$ ) quando comparados à tumores T1-T2 ( $4.99 \pm 2.98$ ) ( $p=0.06$ ). Apesar da ausência de associação estatística significativa, tumores de pacientes que foram a óbito ( $8.63 \pm 6.14$ ) e que geraram metástase nodal ( $8.44 \pm 5.16$ ) apresentaram densidade de vasos linfáticos peritumorais maior do que o grupo de pacientes vivos ( $5.27 \pm 2.93$ ) e que não apresentaram metástase nodal ( $5.00 \pm 2.64$ ) ( $p=0.44$  e  $p=0.21$ , respectivamente).

### *Imunoexpressão de VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e características clínico-patológicas*

Casos com expressão baixa de VEGF-A no parênquima tumoral revelaram associação significativa com casos recorrentes ( $p=0.028$ ) (Gráfico 3) e aqueles que apresentaram doença metastática ( $p=0.038$ ) (Gráfico 4). O grupo de casos que foram a óbito expressaram menos VEGF-A ( $1.96\pm 1.32$ ) do que o grupo de pacientes vivos ( $2.32\pm 1.08$ ), embora essa diferença não tenha sido significativa estatisticamente ( $p=0.60$ )

**Gráfico 3. Associação entre a expressão de VEGF-A nas células tumorais e a recorrência tumoral**

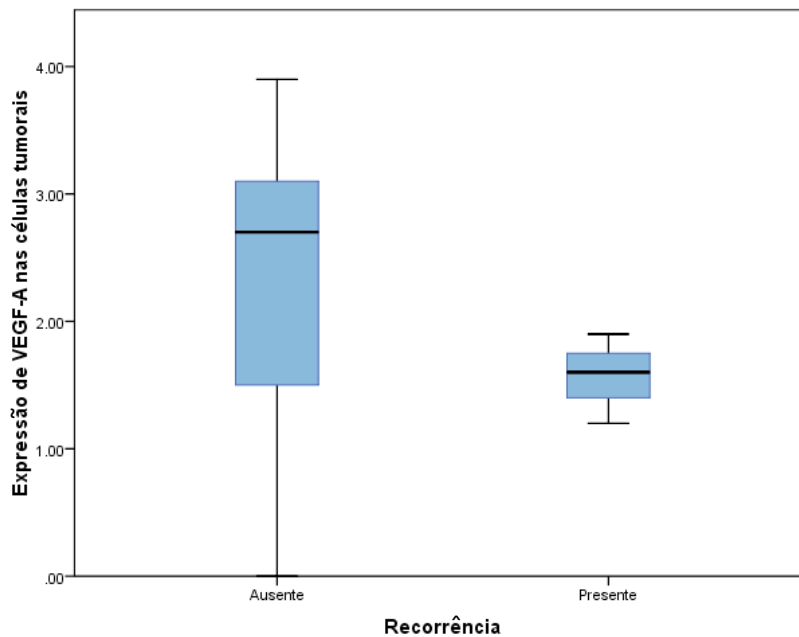
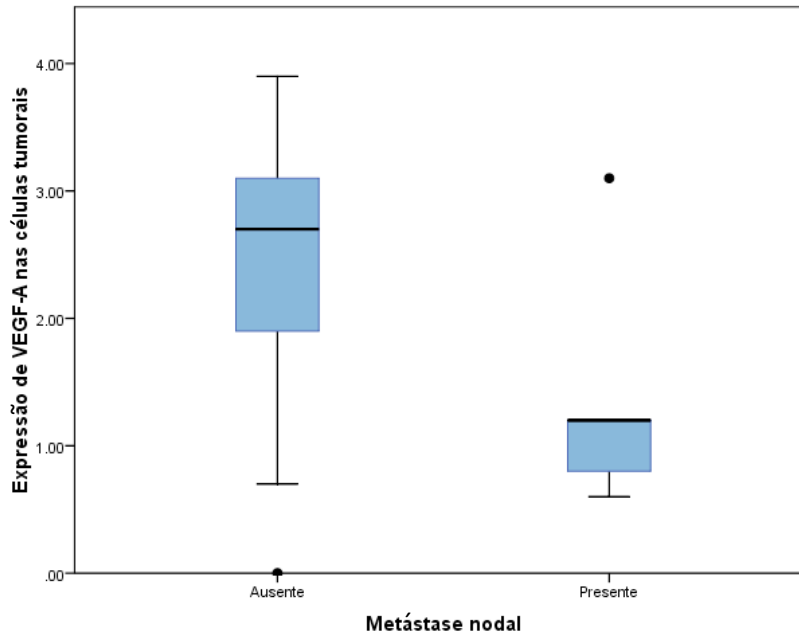




Gráfico 4. Associação entre a expressão de VEGF-A nas células tumorais e a ocorrência de metástase nodal



Já a expressão aumentada de VEGF-A nas células inflamatórias relacionadas ao tumor apresentou uma tendência de associação com a ocorrência de metástase nodal ( $p=0.06$ ), e foi significativamente maior em pacientes que foram a óbito ( $17.0\pm 7.62$ ) do que nos pacientes vivos ( $7.02\pm 7.59$ ) ( $p=0.04$ ).

Apesar da ampla expressão de VEGF-C nas células tumorais e inflamatórias relacionadas ao tumor, nenhuma associação foi observada entre essa expressão e características clínico patológicas da doença.

A expressão de D2-40 nas células neoplásicas não esteve associada a nenhuma característica clínica estudada. Entretanto, foi observada sua expressão em todos os tumores avançados (T3-T4), em todos os tumores que levaram o paciente ao óbito, em 80% ( $n=4$ ) dos casos que desenvolveram metástase nodal e no único caso em que ocorreu metástase à distância.

#### *Correlações entre a imunoexpressão de VEGF-A, VEGF-C e D2-40 e a densidade vascular*

Foi constatada correlação positiva entre o aumento da expressão de VEGF-A no parênquima tumoral e o aumento de vasos neoformados intra-

tumorais (p=0.021, Correlação de Pearson = 0.451). Já o aumento da expressão de VEGF-A nas células inflamatórias apresentou correlação com a diminuição do número de vasos neoformados intratumorais (p=0.048, Correlação de Spearman = -0,391).

Observou-se correlação positiva entre a presença da expressão de D2-40 pelas células neoplásicas e o aumento da densidade de vasos neoformados intratumorais. (Tabela 5)

**Tabela 5 – Correlação entre a expressão proteica e a densidade de vascular**

	<i>VEGF-A</i> <i>parênquima</i> <i>p/CC</i>	<i>VEGF-A</i> <i>estroma</i> <i>p/CC</i>	<i>VEGF-C</i> <i>parênquima</i> <i>p/CC</i>	<i>VEGF-C</i> <i>estroma</i> <i>p/CC</i>	<i>D2-40</i> <i>parênquima</i> <i>p/CC</i>
<b>Vasos neoformados intratumorais</b>	0.02*/0.451 <sup>P</sup>	0.04*/-0.391 <sup>S</sup>	0.18/0.266 <sup>P</sup>	0.98/0.003 <sup>S</sup>	0.04*/0.401 <sup>P</sup>
<b>Vasos neoformados peritumorais</b>	0.47/-0.145 <sup>P</sup>	0.18/-0.266 <sup>S</sup>	0.90/0.025 <sup>P</sup>	0.76/-0.061 <sup>S</sup>	0.07/0.353 <sup>P</sup>
<b>Vasos linfáticos intratumorais</b>	0.39/-0.175 <sup>S</sup>	0.95/0.012 <sup>S</sup>	0.90/0.024 <sup>S</sup>	0.67/0.086 <sup>S</sup>	0.18/-0.270 <sup>S</sup>
<b>Vasos linfáticos peritumorais</b>	0.21/-0.251 <sup>P</sup>	0.48/-0.143 <sup>S</sup>	0.30/0.183 <sup>P</sup>	0.41/-0.168 <sup>S</sup>	0.59/0.110 <sup>P</sup>

p/CC = Valor de p / Coeficiente de Correlação

\* = Valor significativo estatisticamente

<sup>P</sup> = Correlação de Pearson

<sup>S</sup> = Correlação de Spearman

***Artigo***

*Submetido ao periódico Tumor Biology*

**Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands.**

Authors:

Frederico Omar Gleber-Netto <sup>a</sup>

Taynara Nunes Guedes Florêncio <sup>a</sup>

Sílvia Ferreira de Sousa <sup>a</sup>

Mauro Henrique Nogueira Guimarães Abreu <sup>b</sup>

Elismauro Francisco Mendonça <sup>c</sup>

Maria Cássia Ferreira de Aguiar <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Oral Medicine (Oral Pathology), School of Dentistry, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Corresponding author: Maria Cássia Ferreira de Aguiar. Faculdade de Odontologia, Laboratório de Patologia Experimental, Sala 3201, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. CEP: 31270-901. Email: [cassiafa@ufmg.br](mailto:cassiafa@ufmg.br) Phone number: +55(31)34092476

Abstract:

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant tumor of salivary glands. This tumor is characterized by a great variability in clinical behavior, and there is no entirely reliable method to determine prognosis of this tumor. Angiogenesis is an important step in tumor progression and is believed to be an essential event for metastatic dissemination. We aimed to investigate the role of angiogenesis in MEC through immunohistochemical evaluation of VEGF-A, VEGF-C and D2-40 proteins and measuring the density of neoformed and lymphatic vessels. We

studied 26 cases of MEC, which showed great angiogenic activity measured by neoformed vessel density. However, a low density of lymphatics was observed. VEGF-A, VEGF-C and D2-40 were commonly detected in MEC, but only VEGF-A expression correlated with neoformed vessel density. Recurrence and nodal metastasis were associated with low VEGF-A expression and low neoformed vessel density, indicating that impaired angiogenesis could lead to an aggressive phenotype. Although angiogenesis seems important in the modulation of MEC compartment, none of the parameters analyzed could predict tumor behavior.

**Key Words:**

Mucoepidermoid carcinoma, angiogenesis, lymphatic vessels, VEGF-A, VEGF-C

## Introduction

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common type of malignancy of minor salivary glands and is characterized by a great deal of variability in its clinical behavior [1]. Lymphonodal metastases are common in high-grade MEC, but they have also been described in the low-grade counterpart. Various methods have been developed to determine the prognosis of this neoplasm, but there are no clear parameters to predict its clinical course [2].

Angiogenesis is an important step in tumor progression and is believed to be the main feature of metastatic dissemination. Novel immunohistochemical tools have recently been developed to assess angiogenic and lymphangiogenic status in human tumors. Among them are CD105 and D2-40 antibodies, which show specificity against neoformed and lymphatic endothelium, respectively. Microvessel density evaluation through CD105 is a reliable method to determine the clinical course of various human tumors. As well as neoformed vessels, lymphatics are considered essential in tumor dissemination, mainly to lymph nodes that are the main metastatic site of head and neck cancer. It is believed that the increased microvessel density highlighted by D2-40 indicates a high propensity to develop nodal metastasis [3,4].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a family of proteins involved in angiogenesis, and considered to be important in tumor development. VEGF-A acts specifically on VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors, inducing blood vessel formation, while VEGF-C acts on VEGFR-2 and VEGFR-3, stimulating both blood vessel and lymphatic vessel proliferation. The increase in expression of these proteins in various tumors is in some cases a marker of aggressiveness [5].

The aim of this study was to investigate through immunohistochemistry the neoformed and lymphatic microvessel density; the expression of VEGF-A, VEGF-C, and D2-40; and to verify the relationships of these findings with clinicopathological characteristics of MEC of minor salivary glands.

## **Materials and methods**

### *Patients and samples*

The present study was approved by the Research Ethics Committee from Universidade Federal de Minas Gerais (043/2011). Paraffin-embedded surgical specimens of 26 MEC were obtained from the archives of the Hospital Araujo Jorge de Goiânia, Brazil. All tumor samples were pathologically diagnosed as MEC, revisited by an experienced pathologist, and graded as proposed by Auclair et al. [6]. All patients were followed up by consulting their medical records and telephoning. Clinicopathological parameters, including age, gender, tumor location, size, lymph node and distant metastasis, recurrence and histological grade, are summarized in Table 1.

### *Immunohistochemical staining*

Paraffin-embedded sections 4  $\mu\text{m}$  thick were dewaxed in xylene and rehydrated in alcohol. Antigen retrieval was performed with boiling citrate buffer (pH 6.0) for 30 min in a water bath at 96°C for D2-40, VEGF-A, and VEGF-C and with pepsin (pH 1.8) for 13 min at 37°C for CD105. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 30 min. The sections were then incubated with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-human CD105, Endoglin clone SN6h (DakoCytomation, USA; 1:30), monoclonal mouse anti-human D2-40 clone D2-40 (DakoCytomation, USA; 1:100), monoclonal mouse anti-human VEGF clone VG1 (DakoCytomation, USA; 1:25), and polyclonal rabbit anti-human VEGF-C clone Z-CVC7 (Invitrogen, USA; 1:100) for 1 h at 37°C. The primary antibodies were detected using the Dako Advance™ HRP (Dako, USA). Reaction products were visualized with the Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System and then counterstained with hematoxylin. Negative controls were subjected to the same procedure but omitting the primary antibodies. Positive controls were adopted as recommended by primary antibody suppliers.

### *Evaluation of staining*

Microvessel density was quantified in accordance with Weidner et al. [7]. Briefly, the sections were scanned at low power to select the three areas with the highest degree of vascularization, or “hotspots”, in which the microvessels were counted at 400x magnification. Any brown-stained single cell or cell cluster, with or without discernible lumen, that was clearly separated from the adjacent microvessels, tumor cells or other elements of connective tissue was considered a countable vessel. The results of vascular density are expressed as mean  $\pm$  standard deviation considering an area of 0.1024 mm<sup>2</sup> (400x-power field).

VEGF-A and VEGF-C expression in tumor parenchyma was evaluated on the basis of the extent of immunolabeling. The entire tumor was scanned at low power (100x) to select the axis (horizontal or vertical) that showed the most positive areas. Ten random fields of the selected axis were evaluated at high power (400x) considering the percentage of positive cells per field according to the following score: 0 = no expression; 1 = 1% to 25% positive cells; 2 = 26% to 50% positive cells; 3 = 51% to 75% positive cells; and 4 = more than 76% positive cells. The mean value of the 10 fields was the final score. The expression of VEGF-A and VEGF-C in tumor cells were expressed as the mean score per case.

To evaluate VEGF-A and VEGF-C expression in inflammatory cells, the tumor was scanned at low power (100x) to select three areas with the highest percentage of positive cells adjacent to the tumor. The three selected areas were evaluated at high power (400x). In each area the total number of cells and the number of positive cells were measured and the percentage of positive cells established. The average percentage of positive cells of the three fields was the final score. The expression was described as the mean of percentage of positive cells per field  $\pm$  standard deviation.

D2-40 expression in tumor cells was graded with the following criteria: no expression = negative; expression in any neoplastic cells = positive.



### *Statistical analysis*

All statistical analyses were carried out using SPSS software (Ver. 17.0, USA). The associations between immunohistochemical findings and clinicopathological parameters were assessed by T Test for parametric data and the Mann-Whitney test for non-parametric data. The association between MVD and protein expression was assessed by Pearson's coefficient of correlation for parametric data and Spearman's coefficient of correlation for non-parametric data. For D2-40 and clinicopathological data analyses, the chi-square test was employed. Univariate analysis with a Cox proportional-hazards model was used to determine prognostic factors, and multivariate analysis with a Cox proportional-hazards model was used to explore combined effects. Differences were considered statistically significant at p-values <0.05.

## **Results**

### *Microvascular density*

Neoformed vessels were a common finding in intratumoral and peritumoral MEC (Fig. 1a). Only three cases did not show neoformed vessels in any area of the tumor. Angiogenesis was more commonly observed in intratumoral than in peritumoral areas, with neoformed microvessel densities of  $19.58 \pm 13.91$  and  $10.90 \pm 7.79$ , respectively.

Lymphatic vessels in the intratumoral area were rare, and appeared in just 6 (23%) cases (Fig. 1b). However, even when they were observed they were scarce; the intratumoral lymphatic vessel density was  $0.54 \pm 1.15$ . Peritumoral lymphatics were, however, more common, and only two cases revealed no peritumoral lymphatics. The peritumoral LVD was  $5.66 \pm 3.43$ .

### *VEGF-A, VEGF-C and D2-40 expression in tumor parenchyma*

VEGF-A expression was observed in a great number of cases, characterized by weak to moderate staining in the cytoplasm and nucleus of

intermediate and epidermoid tumor cells (Fig.1c). Only one case was negative for VEGF-A.

VEGF-C expression was observed in all cases of MEC, characterized by moderate to strong staining in the cytoplasm and nucleus of intermediate and epidermoid tumor cells (Fig.1d).

D2-40 expression was very distinctive among the tumors (Fig.1b). Four (15.4%) cases were negative, 8 (30.7%) showed weak expression restricted to cells of the periphery of tumor nestles, and 14 revealed moderate to strong expression in the peripheral cells and in intermediate and epidermoid cells. Tumors were considered positive when any kind of expression was observed. Some cells of normal salivary glands, morphologically myoepithelial cells, showed discrete expression of podoplanin.

#### *VEGF-A and VEGF-C expression in peritumoral inflammatory cells*

VEGF-A was positive in  $8.17 \pm 8.11$  peritumoral inflammatory cells per field (Fig.1e). VEGF-A expression was not observed in 4 (15.4%) cases. VEGF-C expression in inflammatory cells was observed in all cases and was more marked than VEGF-A, with a mean of expression of  $34.76 \pm 20.90$  cells per field (Fig.1f).

#### *Clinicopathological associations*

Although not statistically significant, patients older than 40 years showed more nodal metastasis (4 of 5 positive cases, 80%) and more advanced tumors (5 of 6 T3-T4 cases, 83.3%). Nodal metastasis was more common in the tongue and floor of the mouth (4 of 5 cases, 80%) than in any other site.

Death was associated with advanced tumors, as 3 of 6 advanced cases died of the disease, while no patient with T1–T2 tumors died ( $p=0.008$ ). We observed a tendency towards an association between age and death from the disease: all dead patients were older than 40 years ( $p=0.063$ ).

Histopathological grade was not associated with any clinicopathological data. Nodal metastasis, recurrence and death from the disease occurred even in low-grade tumors.

#### *Microvessel density and clinicopathological characteristics*

Associations between microvessel density and clinicopathological characteristics are described in Table 1. Intratumoral neoformed vessel density was higher in young patients than in older ones ( $p=0.05$ ). Low density of intratumoral neoformed vessels was associated with recurrence ( $p=0.019$ ) and nodal dissemination ( $p=0.05$ ).

High intratumoral lymphatic density showed a tendency of association with recurrence ( $p=0.06$ ), as did high density of peritumoral lymphatics with T3–T4 tumors ( $p=0.06$ ).

#### *Immunoexpression of VEGF-A, VEGF-C, and D2-40 and clinicopathological aspects*

Low VEGF-A expression in tumor parenchyma was associated with recurrence ( $p=0.028$ ) and nodal metastasis ( $p=0.038$ ). Inversely, high VEGF-A expression in inflammatory peritumoral cells showed a tendency to associate with occurrence of nodal metastasis ( $p=0.06$ ).

Although VEGF-C and D2-40 expression in tumor parenchyma and VEGF-C in inflammatory cells were commonly observed, no association with clinicopathological characteristics was found.

#### *VEGF-A, VEGF-C and D2-40 expression and microvascular density*

High VEGF-A expression in tumor parenchyma was correlated with an increase of intratumoral neoformed vessels ( $p=0.021$ , Pearson's  $r = 0.451$ ). However, high expression of VEGF-A in inflammatory cells was correlated with fewer intratumoral neoformed vessels ( $p=0.048$ , Spearman's  $\rho = -0.391$ ). Increased D2-40 expression in neoplastic cells was correlated with high density of intratumoral neoformed vessels ( $p=0.042$ , Pearson's  $r = 0.401$ ).

## *Survival analysis*

The Cox proportional-hazard model showed no significance for any variables studied.

## **Discussion**

MEC is a difficult-to-manage disease because of its unpredictable outcome. Although histopathological grading is believed to help in determining the prognosis of MEC, this tool is inefficient in many cases. Indeed, as stated by Seethala [8], there are various fragile points in MEC grading systems. The most common systems are the WHO system [6] and Brandwein system [1]. The first issue concerning these systems is the difficulty of application. Grading is cumbersome and time-consuming, and many of the criteria are not well defined. Beyond that, the correlation of the grading system with outcome varies, and this variation has serious implications on therapy. While the WHO system appears to downgrade tumors, the Brandwein system tends to upgrade tumors. In our own opinion, the Brandwein system is more difficult to apply and more prone to individual mistakes. For this reason, we applied the WHO grading system, and as expected, there was no association between histopathological grading and clinical findings and outcome. We observed recurrence, nodal metastasis and death even in low-grade and intermediate-grade tumors. Actually, the intermediate grade is a matter of debate because there does not appear to be a definite answer on the management of patients of this category [8]. Considering these issues, we aimed to find molecular markers associated with angiogenesis that could help in the understanding and prediction of outcome of MEC.

The reasons to study angiogenesis in tumors are based on the works of Folkman, who since 1971 proposed that tumor growth and metastasis are angiogenesis-dependent. The so-called angiogenic switch is believed to be an essential phenomenon to allow tumor growth, through the induction of endothelial proliferation and the formation of a vascular bed to maintain tumor parenchyma [9]. The ways to assess this angiogenic switch were clarified by Weidner et al. [7], who developed a new method to perform tumor

microvascular density counting. After this, various works demonstrated that the extent of tumor vascularization, assessed by immunohistochemistry, correlates with prognosis in breast, lung, colon and gastric cancers. Briefly, the higher the tumor vascular density is, the higher the probability of aggressive behavior [10].

Although various antibodies have been used to assess tumor vascularity, such as CD31, CD34, and von Willebrand factor, none of them is able to discriminate between quiescent versus activated or proliferating endothelium, i.e., they not allow tumor angiogenesis evaluation [4]. Furthermore, until recently, the role of lymphatic vessels in cancer was obscure because no antibody was able to identify them. These limitations were overcome by the advent of CD105 and D2-40 antibodies, which have demonstrated great accuracy and allowed the evaluation of active endothelium and lymphatics, respectively.

In our study, we verified a high angiogenic activity by CD105 immunoexpression. In fact, others have demonstrated that MEC has high angiogenic activity when compared with other benign and malignant salivary gland tumors [11,12]. Myoepithelial cells, which are believed to have an anti-angiogenic potential, are absent in MEC but are present in other salivary gland tumors. This difference in cell population among these neoplasms could explain these distinct phenotypes. Proliferating vessels were more commonly observed in the intratumoral than in the peritumoral area, in accord with Costa et al. [11]. We believe that the peritumoral area is formed by a well-vascularized stroma, prior to tumor development, that maintains the local demand, while the stroma related to tumor tissue has a higher need for oxygen and nutrients because the stimulus for angiogenesis is more intense.

To the best of our knowledge, this was the first time that MEC lymphatic vessels were assessed. In MEC, intratumoral lymphatics were very scarce, being present in just 6 cases. On the other hand, peritumoral lymphatics were more common. Although in this study we were unable to determine the occurrence of lymphangiogenesis, Soares et al. [13] assessed lymphangiogenesis in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma through immunohistochemistry for D2-40 and Ki-67. They did not find any proliferative lymphatic vessels in the tumor area. Furthermore, the

density of intratumoral and peritumoral lymphatics was similar to normal salivary gland tissue, indicating that the lymphatics were pre-existing. Similar results have been found in breast cancer, where Williams et al. [14] observed that intratumoral lymphatics were rare in invasive breast carcinoma and found no evidence of lymph vessel proliferation. Interestingly, other head and neck cancers, such as squamous cell carcinoma, are characterized by intense lymphangiogenesis. It is believed that tissue-specific tumor features are responsible for the presence or absence of a lymphangiogenic switch [14]. We suppose that as was observed in other gland tumors, MEC lymphatics exist prior to tumor development. Furthermore, there was no correlation between the density of neoformed vessels and the density of lymphatic vessels in our immunohistochemistry evaluation.

Various molecular players are involved in angiogenesis, but among these, VEGF family proteins have a predominant role. For this reason we decided to investigate the roles of VEGF-A and VEGF-C in MEC. While all VEGF-A isoforms binds specifically on VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors, inducing blood vessel formation, VEGF-C interacts with both VEGFR-2 and VEGFR-3, stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis [5].

In our samples, both VEGF-A and VEGF-C were commonly expressed in tumor parenchyma and in inflammatory cells. However, unlike VEGF-C, VEGF-A was absent in some cases, and in general its expression seemed more faint. Nevertheless, VEGF-A tumor expression, but not VEGF-C, correlated significantly with intratumoral neoformed microvessel density. This finding suggests that tumor production of VEGF-A plays an important role in sustaining tumor angiogenesis in MEC. On the other hand, VEGF-A expression by inflammatory cells revealed an inverse correlation with intratumoral neoformed vessels, where increased VEGF-A expression was observed in low–intratumoral microvessel density cases. Probably, the nutrient needs of the tissue and the inefficiency of tumor cells in promoting angiogenesis induce the recruitment of inflammatory cells that produce VEGF-A. Interestingly, the absence of lymphangiogenesis could not be explained by the lack of VEGF-C expression, considering the wide expression of this protein in MEC. Breast cancer cases studied by Williams et al. [14] that did not show lymphangiogenesis were highly positive for VEGF-C.

In addition to reacting with lymphatic vessels, D2-40 antibody shows strong reactivity to various cell types. In our cases, we verified a discrete reaction against myoepithelial cells of normal salivary parenchyma adjacent to the tumor mass. Schacht et al. [15] have found that D2-40 reacts with podoplanin protein, which is present constitutively in myoepithelial cells of breast and salivary gland tissue. They suggest that podoplanin has a role in cytoskeletal reorganization, because these cells are very contractile and frequently show changes in their shape, mediated by myofilaments. We also identified the expression of podoplanin in MEC cells, as described by Kanner et al. [16]. These authors observed that MEC shows greater expression of podoplanin when compared to pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma. In our cases, this expression showed two distinct patterns, one restricted to cells at the periphery of the tumor mass and the other involving peripheral cells and epidermoid and intermediate cells of the tumor. This protein is also found in squamous cell carcinoma of the skin, mainly in recurrent and poorly differentiated cases [15]. Those authors believe that up-regulation of podoplanin promotes cell motility and migration, inducing an aggressive behavior. However, in our cases, this expression was not associated with any clinical findings. Nevertheless, the presence of podoplanin in tumor cells correlated significantly with the increase of intratumoral neofomed vessels. The reasons for this relationship should be investigated further.

Recurrence, nodal and distant metastasis, and death are possible upshots of worse-behaved tumors. Among all parameters investigated, only VEGF-A expression by tumor cells and neofomed vessel density showed relationships with these outcomes. The associations of the extent of tumor vascularization and expression of VEGF with prognosis have been demonstrated by various studies, in a variety of cancer patients, including those with breast, lung, colon or gastric carcinomas [10]. However, in these cancers, the worsening in prognosis is correlated with increases of vascularization and expression of VEGF, while in our study, on the contrary, low VEGF-A expression and low density of neofomed vessels were associated with recurrence and nodal metastasis. We believe that in our cases, this phenotype indicates that tumors have an impairment of

angiogenesis, probably due to genetic or epigenetic factors. Interestingly, studies with animal models show that the use of VEGFR inhibitors and tumors carrying a genetic deletion of VEGF-A elicits an adaptive-evasive response involving an augmented invasive phenotype, increased dissemination, and metastasis [17]. One of the explanations of this phenomenon is the occurrence of hypoxia. Although hypoxia is toxic to both cancer cells and normal cells, cancer cells can undergo genetic and adaptive changes that allow them to survive and even proliferate in hypoxic environments. These processes contribute to the malignant phenotype and to aggressive behavior. It is noteworthy that under hypoxic conditions, cells switch their methods of glucose metabolism from the oxygen-dependent cycle to the oxygen-independent glycolysis [18]. This switch leads to increased glucose transporter expression, particularly GLUT-1, which has been correlated with tumor aggressiveness. Demasi et al. [19] investigated the expression of GLUT-1 in MEC and concluded that the increase of its expression was associated with more aggressive tumors. In another study with the same sample, Costa et al. (2008) showed that tumors with aggressive phenotypes, which expressed high levels of GLUT-1, showed considerably lower microvessel density compared to non-aggressive tumors. Considering these facts, we believe that the impairment of angiogenesis observed in our cases is an important factor for MEC prognosis and should be better studied.

In this study we verified that MEC indeed show substantial variability in clinical behavior, and the aggressive tumors could lead to patient death. The grading system used in this study was not able to predict the outcomes of these patients, reinforcing the need for a more accurate tool for prognosis prediction. Unfortunately, none of the parameters analyzed in this work could predict the behavior of this neoplasm. Nevertheless, angiogenesis seems important in the compartment modulation of MEC, as recurrence and nodal metastasis were associated with impaired angiogenesis. The number of samples of our study and the short follow-up are limitations, and new studies should be done to better understand and explain the findings of this paper.



## Acknowledgments

Funding was provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 144798/2010-07) and by Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais. Dr. Aguiar is research fellow of CNPq.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- 1 – Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, et al. (2001) Mucoepidermoid carcinoma. A clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 25(7):835-845.
- 2 – Luna MA. (2006) Salivary mucoepidermoid carcinoma: Revisited. *Adv Anat Pathol* 13:293-307.
- 3 – Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. (2005) Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 18:1490-1497.
- 4 – Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. (2008) Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23:601-607.
- 5 – Hicklin DJ and Ellis LM. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23:1011-1027.
- 6 – Auclair PL, Goode RK, Ellis GL (1992) Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 69:2021-2030.
- 7 – Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 32:1-8.
- 8 – Seethala RR. (2009) An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head and Neck Pathol* 3:69-77.
- 9 – Carmeliet P and Jain RK. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257.
- 10 – Doi R, Kuratate I, Okamoto E, Ryoike K, Ito H. (1999) Expression of p53 oncoprotein increases intratumoral microvessels formation in human salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28:259-263.
- 11 – Costa AF, Demasi APD, Bonfitto VLL, Bonfitto JFL, Furuse C, Araújo VC, et al. (2008) Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. *Virchows Arch* 453:359-367.

- 12 – Cardoso SV, Souza KCN, Faria PR, Eisenberg AL, Dias FL, Loyola AM. (2009) Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. *BMC Cancer* 9:391-398.
- 13 – Soares AB, Ponchio L, Juliano PB, Araújo VC, Altemani A. (2007) Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumor progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Clin Pathol* 60:995-1000.
- 14 – Williams CSM, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. (2003) Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 200:195-206.
- 15 – Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong Y-K, Detmar M. (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166:913-921.
- 16 – Kanner WA, Galgano MT, Atkins KA. (2010) Podoplanin expression in basal and myoepithelial cells. Utility and potential pitfalls. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18(3):226-230.
- 17 – Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, et al. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220-231.
- 18 – Harris AL. (2002) Hypoxia – A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1):38-47.
- 19 – Demasi APD, Costa AF, Altemani A, Furuse C, Araújo NS, Araújo VC. (2010) Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy. *Int J Exp Pathol* 91:107-113.

Table 1:

Table 1 – Clinicopathological characteristics and microvessel density

		N (%) 26 (100)	Intratumoral NMVD		Peritumoral NMVD		Intratumoral LVD		Peritumoral LVD	
			Mean ± SD	p	Mean ± SD	p	Mean ± SD	p	Mean ± SD	p
<b>Gender</b>	Male	10 (38.5)	20.88±13.73	0.71	11.74±8.30	0.67	0.69±1.55	0.91	6.04±4.45	0.66
	Female	16 (61.5)	18.78±14.40		10.38±7.68		0.45±0.87		5.43±2.75	
<b>Age</b>	< 40 years	15 (57.7)	23.70±15.78	0.07	11.16±7.86	0.84	0.46±0.84	0.83	5.74±3.13	0.89
	≥ 40 years	11 (42.3)	13.98±8.66		10.55±8.05		0.65±1.52		5.55±3.94	
<b>Location</b>	Palate	13 (50)	22.40±16.35	0.80	11.22±9.22	0.69	0.35±0.72	0.67	5.35±2.49	0.08
	Buccal mucosa	5 (19.2)	17.12±7.22		13.44±5.70		0.46±1.02		3.78±3.20	
	Tongue	5 (19.2)	19.18±14.99		11.04±5.82		1.44±2.09		9.30±4.59	
	Floor of mouth	2 (7.7)	9.30±13.15		6.50±9.19		0.00		4.15±1.20	
	Retromolar area	1 (3.8)	18.00		2.30		0.00		4.00	
<b>Size</b>	T1–T2	20 (76.9)	20.24±14.57	0.67	10.44±8.63	0.43	0.47±0.90	0.83	4.99±2.98	0.06
	T3–T4	6 (23.1)	17.41±12.35		12.46±4.08		0.76±1.87		7.91±4.14	
<b>Nodal Metastasis</b>	Absent	21 (80.8)	22.10±13.79	0.05*	11.36±8.23	0.54	0.45±0.88	0.96	5.00±2.64	0.21
	Present	5 (19.2)	9.04±9.23		8.98±5.87		0.92±2.05		8.44±5.16	
<b>Distant Metastasis</b>	Absent	25 (96.2)	20.37±13.60	---	10.8±7.93	---	0.56±1.17	---	5.64±3.49	---
	Present	1 (3.8)	0.00		13.60		0.00		6.30	
<b>Recurrence</b>	Absent	23 (88.5)	21.83±13.13	0.01*	11.55±7.79	0.25	0.44±1.13	0.06	5.62±3.61	0.87
	Present	3 (11.5)	2.33±4.04		5.96±6.95		1.30±1.30		5.96±1.82	
<b>Grade</b>	Low	21 (80.8)	19.71±13.93	0.96	10.14±8.31	0.47	0.67±1.25	0.41	5.21±3.41	0.14
	Intermediate	2 (7.7)	17.15±24.25		10.95±3.74		0.00		4.95±1.90	
	High	3 (11.5)	20.30±13.30		16.20±3.38		0.00		9.30±2.42	
<b>Patient status</b>	Alive	23 (88.4)	20.84±14.06	0.20	11.03±8.21	0.82	0.41±0.85	0.44	5.27±2.93	0.48
	Dead	3 (11.5)	9.96±9.25		9.96±3.81		1.53±2.65		8.63±6.14	

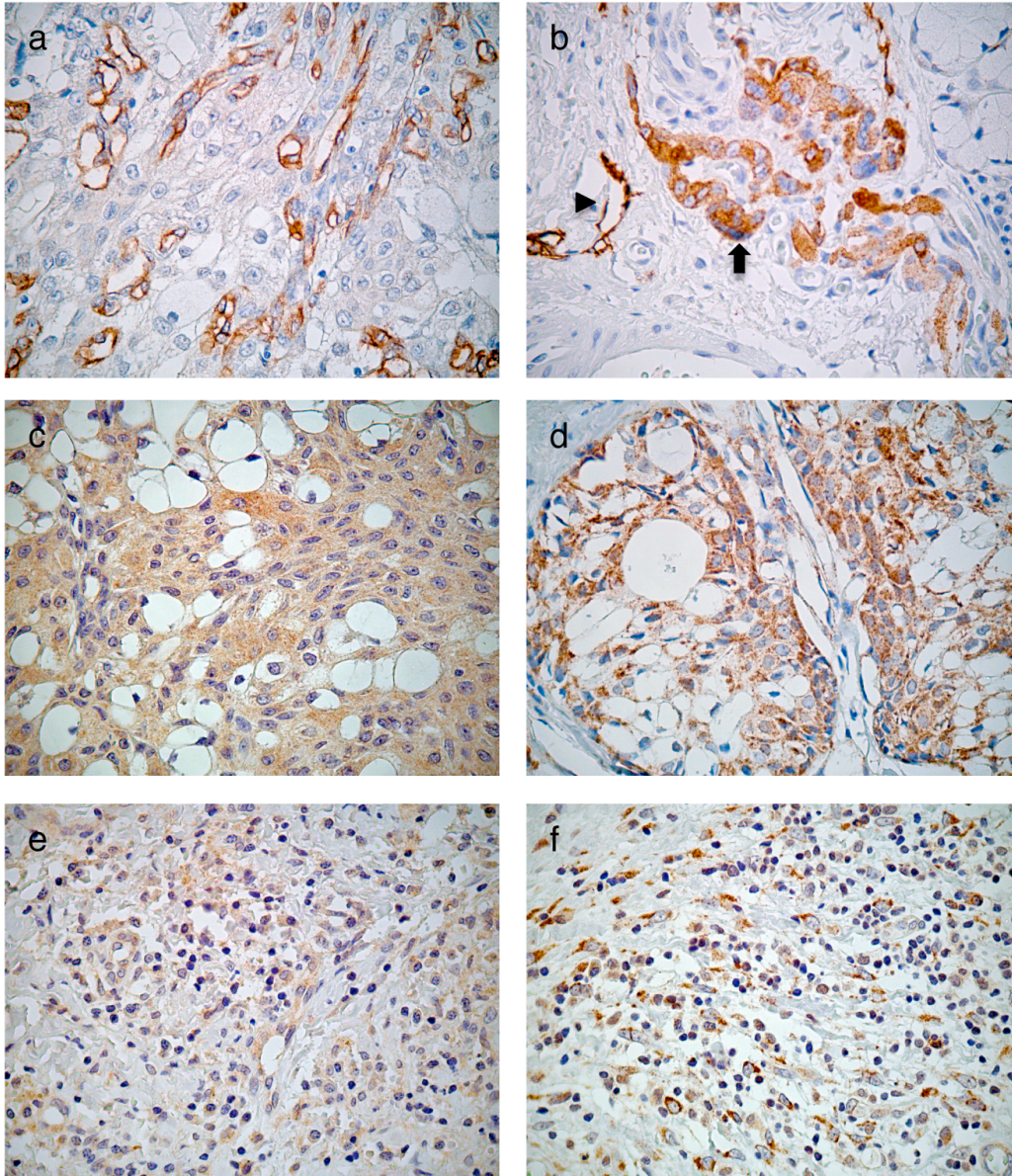
\*Difference statistically significant

NMVD – neoformed microvessel density

LVD – lymphatic vessel density

Figure captions:

**Fig. 1** Detection of (a) neoformed vessels through CD105 immunohistochemistry; (b) lymphatic vessels (arrowheads) and podoplanin expression in neoplastic cells (arrow) through D2-40 immunohistochemistry; (c) VEGF-A expression in neoplastic cells through immunohistochemistry; (d) VEGF-C expression in neoplastic cells through immunohistochemistry; (e) VEGF-A expression in inflammatory cells of MEC through immunohistochemistry; (f) VEGF-C expression in inflammatory cells of MEC through immunohistochemistry



## ***Considerações finais***

Compreender os mecanismos que modulam o comportamento do CME é um dos principais desafios para que se desenvolvam terapias mais eficientes e personalizadas, evitando que os portadores dessa doença sejam submetidos a tratamentos insuficientes, ou mesmo, a intervenções terapêuticas desnecessárias.

Observamos que o CME realmente apresenta uma grande variabilidade no seu curso clínico, e que a gradação histopatológica é pouco eficaz para a predição do seu comportamento. As razões para a limitação dessa ferramenta provavelmente se devem ao fato de que os critérios utilizados para a gradação, como a mensuração da porcentagem de componente cístico, identificação da presença de anaplasia e de figuras de mitose, são extremamente subjetivos, sendo, portanto, sujeitos a interpretações imprecisas e com baixa reprodutibilidade. Além dessas variáveis, a detecção da invasão neural é limitada tanto pela variabilidade na interpretação da sua ocorrência, quanto pelo acaso de ocorrer exatamente no nível de corte avaliado. Esses fatos demonstram a fragilidade desse sistema que, sabidamente, tende a classificar os tumores em graus mais baixos. Apesar do método de Brandwein et al. (2001), ser considerado mais fidedigno, este se baseia no mesmo sistema de Auclair et al. (1992) e, além disso, requer a verificação de outros parâmetros, como a presença da invasão vascular por células neoplásicas, que é de difícil identificação e diferenciação com falsos êmbolos produzidos durante o processo de preparação histológica da lâmina. De fato, essas limitações são preocupantes já que podem gerar prejuízos para o paciente.

Neste trabalho, observamos algumas particularidades do CME, como a intensa atividade angiogênica, a escassez de vasos linfáticos, a expressão de VEGF-A diretamente relacionada à atividade angiogênica, a ampla expressão de VEGF-C sem associação com a densidade linfática e, o achado mais peculiar, a associação da atividade angiogênica com o comportamento biológico do CME. Também verificamos que parâmetros clínicos como o tamanho do tumor e a idade do paciente possuem maior associação com a morte decorrente do tumor do que qualquer outro fator. Entretanto, nenhum dos nossos dados foi suficiente para prever o desenvolvimento agressivo de alguns tumores.

Apesar da hipótese de que, quanto maior a densidade de vasos sanguíneos ou linfáticos na proximidade do tumor, maiores serão as chances de esse tumor invadir o leito vascular e gerar metástase, outros fatores como algumas características fenotípicas das células neoplásicas são também importantes para que essa disseminação ocorra. Para isto, a célula metastática deve possuir a capacidade proteolítica e migratória para chegar até o leito vascular, deve ser capaz de evadir os mecanismos de defesa do organismo e precisa estar apta a criar um ambiente favorável para o seu crescimento no sítio metastático. Portanto, embora a densidade vascular possa aumentar as chances de uma célula gerar metástase, outros mecanismos não investigados neste trabalho podem ser necessários para que este fenômeno ocorra.

Diferentes padrões de expressão gênica são observados em diferentes células de um mesmo tumor, sendo que alguns desses grupos celulares podem ser mais importantes no desenvolvimento de um caráter agressivo do que outros. Assim, reconhecer padrões de lesões agressivas representa uma informação valiosa no estudo do câncer, e dessa forma, nossos resultados são de grande importância.

Os efeitos insatisfatórios da terapia anti-angiogênica que, muitas vezes, causa a piora do quadro clínico dos pacientes, mostra que devemos compreender melhor as diversas interações moleculares da célula neoplásica antes de elegermos uma proteína ou via de sinalização como a única responsável por um determinado fenótipo. Portanto, além de verificar a validade dos nossos achados, outros trabalhos devem estabelecer novos padrões que ajudem a separar lesões agressivas de lesões indolentes. Tecnologias que possibilitem uma visão global do câncer, dissecando os diferentes padrões de expressão gênica e proteica, podem ser ferramentas úteis na demonstração mais efetiva do conjunto de diferenças que caracterizam os diversos comportamentos tumorais.



## ***Conclusões***

Diante dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- O CME apresenta alta densidade de vasos neoformados caracterizando uma alta atividade angiogênica, entretanto, os vasos linfáticos são raros.
- O CME apresenta ampla expressão da proteína VEGF-A, VEGF-C e podoplanina.
- A densidade de vasos neoformados no CME apresenta associação com a recorrência tumoral e com a ocorrência de metástase nodal.
- A proteína VEGF-A no CME apresenta associação com a recorrência tumoral e com a ocorrência de metástase nodal.
- Apenas as proteínas VEGF-A e D2-40 apresentam correlação com a atividade angiogênica no CME.
- As proteínas VEGF-C e D2-40 não apresentam associação com as características clinicopatológicas do CME.
- Nenhuma das variáveis estudadas mostrou-se importante na determinação da sobrevida dos pacientes com CME na amostra estudada.

## ***Referências***

- 1 – Auclair PL, Goode RK, Ellis GL (1992) Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 69:2021-2030.
- 2 – Beasley NJP, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, et al. (2002) Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research* 62:1315-1320.
- 3 – Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, et al. (2001) Mucoepidermoid carcinoma. A clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 25(7):835-845.
- 4 – Carmeliet P and Jain RK. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257.
- 5 – Clarijs R, Ruitter DJ, De Wall RM. (2001) Lymphangiogenesis in malignant tumours: Does it occur? *J Pathol* 193:143-146.
- 6 – Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. (2008) Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 14(7):1931-1937.
- 7 – Dardick I, Bradley G, Lee L, Leong I. Atlas of Salivary Gland Tumor Cytopathology, Oral and Surgical Pathology 3<sup>rd</sup> Edition. Canada, Pathology Images Inc. 2009.
- 8 – Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17:984-992.
- 9 – Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. (2005) Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 18:1490-1497.
- 10 – Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: Basic Science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611.
- 11 – Fox SB, Gatter KC, Harris AL. (1996) Tumor angiogenesis. *Journal of Pathology* 179(3):232-237.
- 12 – Fox SB. (1997) Tumor angiogenesis and prognosis. *Histopathol* 30:294-301.
- 13 – Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. (1998) Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. Clinical and histopathological analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer* 82:1217-1224.

- 14 – Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. (2002) Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol* 9(7):688-695.
- 14 – Hajjami HM-E and Petrova TV. (2008) Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* 130:1063-1078.
- 15 – Hicklin DJ and Ellis LM. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23:1011-1027.
- 16 – Kahn HJ and Marks A. (2002) A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Laboratory Investigation* 82(9):1255-1257.
- 17 – Korpelainen EI and Alitalo K. (1998) Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 10:159-164.
- 18 – Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. (1999) *Cancer Research* 59(4) 856-861.
- 19 – Luna MA. (2006) Salivary mucoepidermoid carcinoma: Revisited. *Adv Anat Pathol* 13:293-307.
- 20 – Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, et al. (2005) Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncology* 41:147-155.
- 21 – Miyahara M, Tanuma J-i, Sugihara K, Semba I. (2007) Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 110:1287-1294.
- 22 – Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. (2008) Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23:601-607.
- 23 – Ozawa H, Tomita T, Sakamoto K, Tagawa T, Fujii R, Kanzaki S, et al. (2008) Mucoepidermoid carcinoma of the head and neck: clinical analysis of 43 patients. *Jpn J Clin Oncol* 38(6):414-418.
- 24 – Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. (2008) The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Research* 28:2997-3006.

- 25 – Shi L, Chen X-M, Wang L, Zhang L, Chen Z. (2007) Expression of Caveolin-1 mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome. *Cancer* 109:1523-31
- 26 – Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama MNGPK, Tilakaratne WM, Takata T. (2008) VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol.* 61:103-108.
- 27 – Speight PM, and Barrett AW. (2009) Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 47(8):587-593.
- 28 – Su J-L, Yang P-C, Shih J-Y, Yang C-Y, Wei L-H, Hsieh C-Y, et al. (2006) The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 9:209-223.
- 29 – Su J-L, Yen C-J, Chen P-S, Chuang S-E, Hong C-C, Kuo I-H, et al. (2007) The role of the VEGF-C/VEGFR3 axis in cancer progression. *British Journal of Cancer* 96:541-545.
- 30 – Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research* 65:550-563.
- 31 – Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 32:1-8.

## ***Anexos***

## Anexo 1



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

Parecer nº. ETIC 0043.0.203.000-11

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

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de abril de 2011, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo da Angiogênes e Linfangiogênese em Carcinomas Mucoepidermóides de Glândulas Salivares"** e 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



## Anexo 2

### *Atividades realizadas durante o período do mestrado*

- Participação no Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) na Universidade Federal de Goiás

### *Eventos:*

- Encontro da International Association of Oral Pathologists (IAOP) – Águas de São Pedro, SP - 2009
- X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG e VIII Encontro das Faculdades de Odontologia de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG – 2009
- III Semana de Biologia Celular – Belo Horizonte, MG – 2010
- XIII Jornada de Patologia do Hospital A. C. Camargo – São Paulo, SP – 2010
- XVII Jornada Mineira de Estomatologia – Belo Horizonte, MG – 2010
- 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) – Águas de Lindóia, SP – 2010
- III Encontro Internacional de Patologia Investigativa do Hospital A.C. Camargo – São Paulo, SP – 2010
- II Encontro de Patologia – Belo Horizonte, MG – 2010
- VII Simpósio Internacional Diálogos entre a clínica e as neurociências: Psiquiatria molecular – Belo Horizonte, MG – 2011
- XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG / IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia – Belo Horizonte, MG – 2011
- American Association for Cancer Research (AACR) 102nd Annual Meeting – Orlando, EUA – 2011

*Cursos:*

- Imaginologia aplicada à estomatologia (2010)
- Células tronco embrionárias (2010)
- Cultura celular em duas e três dimensões (2010)
- Citometria de fluxo na comunicação celular (2010)
- Workshop de Imunoistoquímica (2010)
- Diagnóstico por imagem (2009)

*Prêmios:*

- Menção honrosa – XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG / IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia (2011)
- Menção honrosa – XVII Jornada Mineira de Estomatologia
- Menção honrosa – X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG

*Artigos completos publicados em periódicos:*

1 – **Netto FOG**, Diniz IMA, Grossmann SMC, Abreu MHNG, Carmo MAV, Aguiar MCF. (2011) Risk factors in burning mouth syndrome: a case control study based on patient records. *Clinical Oral Investigations* 15:571-575.

2 – Bernardes VF, **Gleber-Netto FO**, Sousa SF, Abreu MHNG, Silva TA, Aguiar MCF. (2011) EGF in saliva and tumor samples of oral squamous cell carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 1: 1-6.

3 – Bernardes VF, **Gleber-Netto FO**, Sousa SF, Abreu MHNG, Silva TA, Aguiar MCF. (2010) Clinical significance of EGFR, HER-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29: 40.

4 – Grossmann SMC, Teixeira R, Oliveira GC, **Gleber-Netto FO**, Araujo FMG, Carmo MAV. (2010) Xerostomia, hyposalivation and sialadenitis in patients with chronic hepatitis C are not associated with the detection of HCV RNA in saliva or salivary glands. *Journal of Clinical Pathology* 63:1002-1007.

5 – **Netto FOG**, Diniz IMA, Grossmann SMC, Carmo MAV, Aguiar MCF. (2010) Síndrome de ardor bucal: aspectos clínicos, etiopatogenia y tratamiento. *Revista Cubana de Estomatología* 47:417-427.

*Artigos aceitos para publicação:*

1 – **Gleber-Netto FO**, Diniz IMA, Mudado FA, Fraga MG, Vargas AMD. Assessment of aesthetic perception of mild and moderate dental fluorosis levels among students from the Federal University of Minas Gerais-UFMG. *Oral Health and Preventive Dentistry* 2011.

2 – Oliveira-Neto HH, **Gleber-Netto FO**, Sousa SF, Silva TA, Aguiar MCF, Batista AC. 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.

*Resumos publicados em anais de eventos:*

1 – **Gleber-Netto**, Florêncio TNG, Sousa SF, Mendonça EF, Gomes CC, Aguiar MCF. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary glands. AACR 102nd Annual Meeting, Orlando. Proceedings Supplement: Late-Breaking Abstracts 2011, p.84.

2 – Sousa SF, **Gleber-Netto FO**, Oliveira-Neto HH, Batista AC, Gomes CC, Gomez RS, Aguiar MCF. Lymphatic vessels and neofomed microvessels density in primary oral squamous cell carcinoma and associated lymph nodes. AACR 102nd Annual Meeting, Orlando. Proceedings Supplement: Late-Breaking Abstracts 2011, p.110.

3 – SOUSA SF, **Gleber-Netto FO**, OLIVEIRA-NETO HH, BATISTA AC, Aguiar MCF. Densidade de vasos linfáticos e neofomados em carcinoma de células escamosas de boca e nos linfonodos associados. XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG e IX Encontro Mineiro das

Faculdades de Odontologia, 2011, Belo Horizonte. Anais do XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2011.

4 – OLIVEIRA-NETO HH, **Gleber-Netto FO**, SOUSA SF, Silva TA, Aguiar MCF, BATISTA AC. Neovascular Density Is Distinct Between Oral Cavity and Lip Cancer. International Association for Dental Research - General Session, San Diego. IADR 2011.

5 – Florêncio TNG ; **Gleber-Netto FO**, Diniz, IMA ; Abreu, MHNG ; Aguiar, MCF . Síndrome da ardência bucal (SAB): estudo caso-controle com avaliação de múltiplas variáveis. In: XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010, Belo Horizonte. Revista do CROMG. Belo Horizonte, 2010. v. 11. p. 83-83.

6 - **Gleber-Netto FO**, Bernardes VF, SOUSA SF, Silva TA, Abreu MHNG, Aguiar MCF. Fator de crescimento epidérmico: níveis salivares e imunoexpressão em carcinoma de células escamosas de boca - estudo caso-controle. In: 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2010. v. 24. p. 279-279.

7 – SOUSA SF, Pereira TSF, **Gleber-Netto FO**, Mesquita RA, Aguiar MCF. Avaliação da relação mastócito / neoformação vascular no carcinoma de células escamosas bucal com e sem metástases nodais. In: 27 Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2010. v. 24. p. 353-353.

8 - Pereira TSF, SOUSA SF, **Gleber-Netto FO**, Souto GR, Aguiar MCF, Mesquita RA. Mastócitos e neoformação vascular no carcinoma de células escamosas de boca com e sem metástases para linfonodos. In: XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2010, Belo Horizonte. XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2010.