



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Faculdade de Odontologia

**FERNANDA BERTINI**

**CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE  
MICROVASCULAR SANGUÍNEA E LINFÁTICA  
E A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE ASSOALHO BUCAL E LÍNGUA**



2010

**FERNANDA BERTINI**

**CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE  
MICROVASCULAR SANGUÍNEA E LINFÁTICA  
E A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE ASSOALHO BUCAL E LÍNGUA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2010

**Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia  
prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC.  
São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2010.**

B462c Bertini, Fernanda.  
Correlação entre a densidade microvascular sanguínea e linfática e a  
proliferação celular no carcinoma epidermóide de assoalho bucal e língua /  
Fernanda Bertini. \_\_ São José dos Campos: [s.n.], 2010.  
121.f. : il.

Tese (Doutorado em Biotapatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de  
São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, 2010.  
Orientadora: Profª. Titular Yasmin Rodarte Carvalho.

1. Carcinoma de células escamosas 2. Angiogênese patológica. 3. Vasos  
linfáticos 4. Imunoistoquímica. I. Carvalho, Yasmin Rodarte. II. Universidade  
Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III.  
Título.

tD791

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## **AUTORIZAÇÃO**

**Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste  
trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde  
que citada a fonte.**

**São José dos Campos, \_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.**

**Assinatura:**

**E-mail: bertinife@uol.com.br**

## BANCA EXAMINADORA

- 1) Prof<sup>ª</sup>. Titular Yasmin Rodarte Carvalho  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP
  
- 2) Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Adriana Aigotti Haberbeck Brandão  
Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP
  
- 3) Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elaine Dias do Carmo  
Universidade Bandeirante de São Paulo - Campus Maria Cândida
  
- 4) Prof<sup>ª</sup>. Adj. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves  
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora
  
- 5) Prof<sup>ª</sup>. Adj. Janete Dias Almeida Faculdade de Odontologia do  
Campus de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 28 de julho de 2010.

## *Dedicatória*

*Dedico esse trabalho ao Meu Deus, Meu grandioso Deus! Infelizmente, nós, muitas vezes esquecemos de Te agradecer. Obrigada, pela minha família especialmente minha filha, meus amigos, por todos aqueles que entraram na minha história de vida e me ensinaram a crescer como pessoa, a descobrir o valor das pequenas coisas, do trabalho honesto, simples e edificante, pela saúde e pelo término desta longa jornada, o mais sincero agradecimento a Ti que me confiaste a vida. Através da minha fé, de minhas orações, do meu amor, agradeço-Te por tudo que fui, que sou e ainda serei e principalmente por nunca me fazer desistir, mesmo nos momentos mais difíceis nessa caminhada.*

*Ao meu marido **Célio**, a quem confiou todo seu amor, agradeço por toda a compreensão, paciência e cumplicidade por todo esse tempo, principalmente por querer passar sua vida ao meu lado sempre no incentivo a seguir em frente a cada dia.*

*À minha doce e querida filha, **Mirela** a quem me estimulou a perseverar nessa grande caminhada. Espero que apesar da ausência física, eu tenha sido um bom exemplo de mãe. Filha, seu sorriso e carinho em pensamento me deram forças a prosseguir!!!!*

*Aos meus pais, **Luiz e Vera**, pelo amor, pela confiança e por me ensinarem a não desistir. É difícil lhes agradecer com palavras, pois não foi somente com elas que vocês me ensinaram a viver.*

*Às minhas queridas irmãs, **Ana Paula, Bianca e Luciana**, que mesmo apesar de todas nossas diferenças sempre compartilhamos momentos maravilhosos juntas. Amo vocês!*

*Aos meus cunhados, **Júlio e Adriano** pelo incentivo a minha carreira.*

*Às minhas lindas e apaixonantes sobrinhas **Martha, Manuela e Luiza**, verdadeiros presentinhos de Deus!!!!*

## ***Agradecimentos Especiais***

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, pela orientação, capacidade, amizade, e principalmente pela confiança depositada em meu trabalho. Nestes três anos de estreita convivência, foram preciosos seus ensinamentos, exemplos e atitudes.*

*À Prof<sup>a</sup> Adj. Janete Dias Almeida, pelas sugestões sempre pertinentes a esse trabalho, pelo carinho e motivação constante. Sou muito grata à sua amizade.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Aigotti Haberbeck Brandão pela inestimável dedicação e ensinamentos dispensados com tanta serenidade.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Falchete do Prado pela intensa colaboração na elaboração deste trabalho, pela competência em me co-orientar, sendo capaz de transformar uma tarefa difícil em um trabalho fácil e prazeroso.*

*À amiga, Tábata de Mello Tera, pessoa sincera, séria, e com qualidades ímpares. A melhor forma que tenho para te agradecer é oferecer todo meu carinho e amizade.*

*Às amigas **Aline Junia** e **Márcia Gimenes**, pessoas de extrema dedicação com que pude contar nas etapas laboratoriais e organização do material desta pesquisa.*

*À minha amiga **Flávia Celina Sgarbi**, grande companheira! Agradeço por me acolher e dividir comigo meus anseios. Vou ser sempre grata a você.*

## *Agradecimentos Institucionais*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da FOSJC José Roberto Rodrigues pelo incentivo ao ensino e pesquisa.*

*Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pela atenção e colaboração em algum momento.*

*Ao Profº Ivan Balducci, responsável pela análise estatística desse trabalho.*

*A todos os colegas de Pós-Graduação, especialmente Lilibeth Ferraz de Brito Penna Forte, pelas experiências compartilhadas.*

*Às amigas e técnicas Ana Lourdes da Silva Machado e Maria Salete Faria, pela amizade e pela confecção de todas as lâminas envolvidas nesse trabalho.*

*Às funcionárias da Pós-Graduação Rose, Cidinha, Lilian e Erena, pela paciência e atenção dispensadas.*

*Há duas formas para se viver a vida:  
Uma é acreditar que não existe milagre;  
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

*(Albert Einstein)*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Gráfico representativo da distribuição do total de casos entre os sexos.....52
- Figura 2 – Gráfico representativo da percentagem do total de casos distribuídos entre raças.....53
- Figura 3 – **A)** Carcinoma epidermóide de língua: front invasivo com padrão de invasão caracterizado pelo escore 2 (cordões sólidos, faixas ou ninhos), aumento original 400X; **B)** padrão de invasão com ninhos de células epiteliais (escore 2), aumento original 400X (H/E); **C)** escore 4 (células isoladas e em pequenos grupos), aumento original 400X (H/E).....55
- Figura 4 – **A)** Carcinoma epidermóide de assoalho: escore 2 (front invasivo com moderada queratinização), aumento original 100X; **B)** padrão de invasão em cordões sólidos, faixas ou ninhos e moderada queratinização (escore 2), aumento original 200X; **C)** ninho de células epiteliais, com queratinização central, aumento original 400X .....56
- Figura 5 – Expressão da marcação do Ki-67 em casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original 400X. ....63
- Figura 6 – Expressão da marcação do Ki-67 em casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original 400X. ....64

Figura 7 - Expressão positiva do VEGF-C em carcinomas epidermóides de assoalho (A, B) e língua (C, D). Aumento Original de 400X. ....	66
Figura 8 – Marcação da expressão do CD-105 nos vasos sanguíneos dos casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original de 400X. ....	68
Figura 9 – Marcação da expressão do CD-105 nos vasos sanguíneos dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original de 400X. ....	69
Figura 10 – Marcação da expressão do D2-40 nos vasos linfáticos dos casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original 400X. ....	70
Figura 11 – Marcação da expressão do D2-40 nos vasos linfáticos nos casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original 400X. ....	71
Figura 12 – Gráfico de dispersão e respectiva reta de regressão dos valores de Microdensidade Vascular Sanguínea (MDV) e Linfática (MDL) de tumores de assoalho muito agressivos (m) e pouco agressivos (p). ....	76
Figura 13 – Gráfico de dispersão e respectiva reta de regressão dos valores de Microdensidade Vascular Sanguínea (MDV) e Linfática (MDL) de tumores de língua muito agressivos (m) e pouco agressivos (p). ....	76

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Sistema de gradação histológica de malignidade .....	44
Quadro 2 – Detalhes dos Anticorpos primários utilizados .....	48
Tabela 1 – Classificação inicial segundo critérios de Bryne et al. (1989) dos casos de carcinomas epidermóides de assoalho bucal.....	57
Tabela 2 – Classificação final (consenso) segundo critérios de Bryne et al. (1989) dos casos de carcinomas epidermóides de assoalho bucal .....	58
Tabela 3 – Classificação segundo critérios de Bryne et al. (1989) dos casos de carcinomas epidermóides de língua .....	59
Tabela 4 – Distribuição absoluta e percentual (%) dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua organizados em escores finais .....	60
Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), microdensidade vascular sanguínea (CD-105) e linfática (D2-40), e fatores de crescimento (VEGF e VEGF-C) em 29 casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal.....	61
Tabela 6 – Resultados imunoistoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), microdensidade vascular sanguínea (CD-105) e linfática (D2-40), e fatores de crescimento (VEGF e VEGF-C) em 30 casos de carcinoma epidermóide de língua .....	62

Tabela 7 – Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células positivas para Ki-67, obtidos em 59 pacientes com carcinoma epidermóide. Resultado do teste <i>t-Student</i> ....	65
Tabela 8 – Resultado do teste de comparação de proporções de marcação do VEGF dos casos de carcinoma epidermóide segundo a localização.....	66
Tabela 9 – Resultado do teste de comparação de proporções de marcação do VEGF-C dos casos de carcinoma epidermóide segundo a localização.....	67
Tabela 10 – Média ( $\pm$ desvio padrão) da MDV (CD-105), obtida dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Resultado do teste <i>t-Student</i> .....	72
Tabela 11 – Média ( $\pm$ desvio padrão) da MDL (D2-40), obtidos dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Resultado do teste <i>t-Student</i> .....	72
Tabela 12 – Valores de correlação de Pearson e teste de significância ( <i>p-valor</i> ) para o índice de proliferação versus MDV e MDL obtidos dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra.....	73
Tabela 13 – Média ( $\pm$ desvio padrão) dos dados obtidos de microdensidade vascular sanguínea e linfática dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Teste de <i>t-Student</i> na comparação dos valores médios de MDV e MDL, segundo o local .....	73

Tabela 14 – Média ( $\pm$ desvio padrão) dos dados obtidos de MDV e MDL dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Teste de <i>t-Student</i> na comparação dos valores médios na língua e no assoalho bucal, segundo o tipo de microdensidade.....	74
Tabela 15 – Média ( $\pm$ desvio padrão) dos dados obtidos da MDV e relação com a intensidade de marcação do fator de crescimento VEGF nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra.....	74
Tabela 16 – Média ( $\pm$ desvio padrão) dos dados obtidos da MDL e relação com a intensidade de marcação do fator de crescimento VEGF-C nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra.....	75
Tabela 17 – Média ( $\pm$ desvio padrão) dos dados obtidos da MDV e MDL e relação com o grau histológico de malignidade nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF = fator básico de crescimento fibroblástico

BSA = soroalbumina bovina

BM= banho maria

CD= grupo de diferenciação

CD-105 = grupo de diferenciação número 105

CD-31 = grupo de diferenciação número 31

CD-34 = grupo de diferenciação número 34

CE = carcinoma epidermóide

CEB = carcinoma epidermóide bucal

CECB = carcinoma epidermóide de cavidade bucal

CEI = carcinoma epidermóide intraoral

D2-40 = marcador específico para endotélio de vasos linfáticos

DAB = tetrahidrocloreto de diaminobenzidina

FGF = fator de crescimento fibroblástico

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio (água oxigenada)

HE = hematoxilina e eosina

HGF = fator de crescimento de hepatócito

IDM = índice de densidade microvascular

IFG = sistema simples de gradação histológica do *front* invasivo

IGF-I/II = fator de crescimento semelhante à insulina

INCA = Instituto Nacional do Câncer

kDA = quilodalton

Ki-67 = antígeno identificado por anticorpo monoclonal Ki-67  
também conhecido como MKI-67

*Lecs* = células endoteliais linfáticas

LYVE-1 = receptor 1 do endotélio vascular linfático

M = mol

mL = mililitro

mM = milimol

$\mu\text{m}$  = micrômetro

M2A = antígeno também chamado de podoplanina

MDL = microdensidade linfática

MDV = microdensidade vascular

MVC = contagem microvascular

PBS = solução salina tamponada

pH = potencial hidrogeniônico

PD-ECGF = fator de crescimento celular endotelial derivado de  
plaqueta

PIGF = fator de crescimento placentário

PROX-1 = próspero homeobox gene 1

RNA = ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub> = ácido ribonucléico mensageiro

TA = temperatura ambiente

TGF- $\beta$ 1 = fator transformador de crescimento  $\beta$ 1

TGF-  $\beta$ 3 = fator transformador de crescimento  $\beta$ 3

TNM = sistema internacional de classificação de tumores malignos  
(tumor/nodal/metástases)

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

VEGF-A = fator de crescimento endotelial vascular do tipo A

VEGF-B = fator de crescimento endotelial vascular do tipo B

VEGF-C = fator de crescimento endotelial vascular do tipo C

VEGF-D = fator de crescimento endotelial vascular do tipo D

VEGFR = receptor para o fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 = receptor para o fator de crescimento endotelial vascular  
do tipo 2

VEGFR-3 = receptor para o fator de crescimento endotelial vascular  
do tipo 3

Bertini F. Correlação entre a densidade microvascular sanguínea e linfática e a proliferação celular no carcinoma epidermóide de assoalho bucal e língua [tese] São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2010.

## RESUMO

O carcinoma epidermóide (CE) representa 95% das neoplasias malignas bucais, sendo língua e assoalho as localizações intra-orais mais comuns. A angiogênese e a linfangiogênese estão relacionadas com desenvolvimento, disseminação e agressividade dos tumores. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre as características histológicas, densidade microvascular sanguínea (MDV) e linfática (MDL) e proliferação celular no carcinoma epidermóide intra-oral (CEI). Sessenta casos de CEI, sendo 30 de assoalho bucal e 30 de língua, foram analisados e comparados quanto à gradação histológica de malignidade, a expressão do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) VEGF-C (fator de crescimento vascular endotelial - C) e sua correlação com a MDV e MDL. Verificou-se predomínio do gênero masculino em ambas as localizações, assim como da raça leucoderma. Quanto à gradação de malignidade, 73,3% dos casos de carcinoma epidermóide de língua e 96,67% dos casos de assoalho foram considerados muito agressivos. Foi notado um índice de proliferação celular médio maior nos casos de assoalho, entretanto, a diferença com relação à língua não foi estatisticamente significativa. A maioria dos carcinomas avaliados teve ausência de marcação para VEGF(63,33% em língua e 70% em assoalho) e marcação positiva para VEGF-C (73,33% em língua e 79,31% em assoalho). A MDL foi maior nos casos de língua, com diferença significativa entre as regiões. Verificou-se que altos valores de MDV ocorrem nos casos com maior proliferação celular, o mesmo não acontecendo com a MDL. Não houve relação dos fatores de crescimento VEGF e VEGF-C com a MDV e MDL respectivamente. Assim pode-se concluir que: a gradação histológica de malignidade é maior nos casos de assoalho do que nos de língua; o índice de proliferação celular é semelhante nas

duas regiões; a maioria dos casos em ambas as regiões não apresenta expressão imunohistoquímica de VEGF, porém, expressa VEGF-C; nos casos de língua há maior MDL do que nos de assoalho e a MDL é maior que a MDV; a proliferação celular é maior nos casos com altos valores de MDV.

**Palavras-Chave:** Carcinoma de células escamosas. Angiogênese patológica. Vasos linfáticos. Imunohistoquímica.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Carcinoma Epidermóide .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Gradação Histológica de Malignidade .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Ki-67 .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Angiogênese .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Densidade Microvascular .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Fator de Crescimento Vascular Endotelial - VEGF e         VEGF-C.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Marcadores Endoteliais.....</b>	<b>33</b>
<b>2.8 Linfangiogênese.....</b>	<b>37</b>
<b>2.9 Marcadores Endoteliais Linfáticos.....</b>	<b>38</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Amostra e Seleção dos Casos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Gradação histológica de malignidade .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Análise imunoistoquímica .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Análise do Ki-67 .....</b>	<b>48</b>

<b>4.5</b>	<b>Análise do fator de crescimento endotelial (VEGF e VEGF-C) .....</b>	<b>49</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da Expressão dos Marcadores de Células Endoteliais e Densidade Microvascular sanguínea e linfática .....</b>	<b>50</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise dos dados clínicos.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2</b>	<b>Gradação histológica de malignidade .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise imunoistoquímica .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>111</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE A – Análise Histológica segundo Bryne, 1989 dos examinadores F e Y dos casos de carcinoma epidermóide....</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE B – Consenso Análise Histológica, segundo Bryne (1989) realizada pelos examinadores F e Y dos casos de assoalho.....</b>	<b>114</b>
	<b>APÊNDICE C – Análise e contagem individual dos marcadores (ki-67, CD-105, D2-40, VEGF e VEGF-C dos casos de carcinoma epidermóide.....</b>	<b>115</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna, que mais acomete a boca, representando 95% de todas as malignidades dessa região (Sapp et al., 1997) e a oitava dentre todas as várias neoplasias que afetam o ser humano (Massano et al., 2006). Anualmente são diagnosticados mais de 300.000 novos casos de carcinoma epidermóide bucal (CEB) em todo mundo (Subdo; Reith, 2005) e em média 21% desses pacientes apresentam metástase cervical, em razão do atraso no diagnóstico (Neville et al., 2009).

A língua e assoalho de boca representam os locais mais comuns do câncer de boca, quando o lábio não é considerado, sendo que a maior incidência se apresenta em homens acima de 40 anos de idade (Lockhart et al., 1998). Seu prognóstico depende de fatores como detecção precoce da lesão, estadiamento clínico e gradação histológica (Imai et al., 2001). Os altos índices de recorrência e metástases são fatores importantes que devem ser considerados, uma vez que influenciam diretamente na sobrevida do paciente (Costa et al., 1998).

Nos carcinomas de cabeça e pescoço, o prognóstico geralmente é baseado no estadiamento clínico, pela classificação tumor/linfonodo/metástase (TNM) (Baaterburg et al., 2001).

Com o propósito de realizar uma estimativa mais precisa acerca do comportamento biológico de uma determinada neoplasia, diversos sistemas de gradação histológica têm sido

idealizados (Broders, 1926; Anneroth et al., 1987; Bryne et al., 1989). Entretanto, a utilidade real do uso dos sistemas de gradação é hoje em dia, uma controvérsia. Desta forma, a busca por marcadores de prognóstico é de suma importância, pois contribui para traçar um plano de tratamento e estimar a sobrevida do paciente.

A angiogênese representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral, em virtude de fornecer aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes e estabelecer condições favoráveis à sua proliferação. O processo de progressão de uma célula normal para a malignidade envolve, dentre muitos mecanismos, a capacidade de estimulação da angiogênese, através do aumento de secreção de fatores vaso-indutores e diminuição dos inibidores (Matter, 2001). Adicionalmente, a linfangiogênese, proliferação de vasos linfáticos, é também considerada um processo importante no desenvolvimento de metástases tumorais (Stacker et al., 2002; Franchi et al., 2004; Dadras et al., 2005; Gombos et al., 2005).

Diante da importância da angiogênese para o desenvolvimento das neoplasias e da linfangiogênese para o desenvolvimento de metástases linfonodais, diversos estudos procuram avaliar esses fenômenos como fatores prognósticos das neoplasias.

Considerando-se que marcadores de proliferação celular como, por exemplo, Ki-67 já são reconhecidamente fatores prognósticos destas neoplasias, este estudo objetiva avaliar a correlação entre fatores de crescimento endoteliais e de proliferação, buscando explorar a neo formação de vasos linfáticos e sanguíneos

como novos fatores prognósticos para o carcinoma de células escamosas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Carcinoma Epidermóide**

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o Brasil terá 489.270 novos casos de câncer em 2010. Dentre os cânceres mais freqüentes está o de próstata, mama feminina, colo de útero, traquéia, brônquio e pulmão, estômago, cólon e reto, esôfago, leucemias e pele. Desses novos casos o número de mulheres acometidas é maior do que a de homens justificado pela população feminina ser maior especialmente nas faixas etárias mais avançadas (Brasil, 2010).

Excluindo-se o câncer de pele, o câncer bucal pode ser considerado, o mais comum da região de cabeça e pescoço (38%) (Costa et al., 2002; Dedivitis et al., 2004), e ainda pelas estimativas do INCA de 2010 teremos 10.330 casos novos de câncer oral (Brasil, 2010).

A transformação do epitélio normal em carcinoma epidermóide envolve múltiplos passos como a ativação seqüencial de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (Forastier et al., 2001), sendo este processo caracterizado pela ocorrência de vários eventos genéticos promotores de desequilíbrios em vias moleculares regulatórias fundamentais. Distúrbios nos mecanismos que controlam os processos de diferenciação, migração e morte celular por apoptose, assim como alterações nas interações epitélio/mesenquimais

encontradas na interface entre o tecido normal do hospedeiro e o parênquima neoplásico maligno, contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento do carcinoma epidermóide de cavidade bucal (CECB) (Warnakulasuriya et al., 1998).

A neoplasia acomete, geralmente, indivíduos a partir da sexta década de vida (Lam et al., 2006), entretanto, tem-se notado um aumento da incidência em adultos jovens e mulheres (Warnakulasuriya et al., 2007). Os homens são mais acometidos que as mulheres em uma proporção de 3 a 2:1, entretanto essa proporção vem diminuindo em função do aumento do consumo de tabaco e álcool entre mulheres (Durazzo et al., 2005).

Dessa forma, o carcinoma epidermóide bucal é uma doença com múltiplas alterações gênicas, que quando somadas, acarretam a desregulação das funções básicas da célula, como divisão, diferenciação, senescência e morte, atribuindo à neoplasia suas características (Wilting et al., 2002).

## **2.2 Gradação Histológica de Malignidade**

Estudos que visam à análise do comportamento biológico do carcinoma epidermóide estão mais associados aos aspectos morfológicos das células epiteliais malignas e menos freqüentemente se referem às modificações que ocorrem no estroma tumoral induzidas pela invasão das células epiteliais. A frente de invasão tumoral é o local onde estes fenômenos acontecem com maior intensidade, uma vez que se trata da região que primeiramente é

acometida por estas alterações e exibe a população de células neoplásicas mais agressivas (Bryne, 1998; Lockhart et al., 1998). Além disso, os tumores pouco diferenciados, independentemente dos sítios de origem, são clinicamente mais agressivos que os bem diferenciados (Henson, 1988).

As regiões mais agressivas do CEB denominadas *front* de invasão, revelam com frequência a presença de células com menor grau de diferenciação, comparado às demais localizações do tumor. Aspectos morfológicos encontrados no *front* de invasão resultam de uma série de anormalidades gênicas responsáveis por alterações moleculares que culminam com a progressão e a disseminação das células neoplásicas malignas (Bryne et al., 1989; Yazdi; Khalili, 1999).

Broders (1941) instituiu um sistema de gradação histológica estudando apenas uma das características morfológicas do tumor, a diferenciação celular.

Anneroth et al. (1987) idealizaram um sistema de gradação histológica com a finalidade de diferenciar tumores mais invasivos daqueles considerados menos agressivos. Já Bryne et al. (1989), consideraram as áreas mais anaplásicas contidas nas áreas mais invasivas dos tumores diferenciando-se de Anneroth et al. (1989) por não considerar o estágio de invasão da neoplasia.

A gradação histológica de malignidade dos carcinomas epidermóides pelo sistema proposto por Bryne et al. em 1989, avalia grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão e infiltrado inflamatório mononuclear. A região do

*front* é analisada neste sistema porque a morfologia das células malignas na porção mais invasiva do tumor quase sempre difere das partes mais superficiais. Na região do *front* há uma diminuição das células tumorais e informações com maior valor prognóstico quando comparada com as demais áreas tumorais (Bryne, et al., 1998).

Sendo assim, os sistemas de gradação histológica de malignidade são importantes, visto que enfatizam as características histopatológicas e a relação imunológica entre o tumor e o hospedeiro, podendo prever o comportamento da lesão frente à resposta do paciente (Costa et al., 2000).

Entretanto, na literatura atual não há um consenso sobre o melhor sistema de gradação histológica a ser utilizado em pesquisas de carcinomas epidermóides da cavidade bucal (Costa et al., 1998).

### **2.3 Ki-67**

A proteína Ki-67 é considerada um marcador de proliferação celular, frequentemente utilizado para estimar a fração de crescimento de tumores e outros tecidos, sendo expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células quiescentes em G0. Entretanto, existem certas dificuldades em definir o que seja uma célula não proliferativa, pois o tempo entre as mitoses pode variar consideravelmente. Desta forma, o marcador poderia ser detectado sem que a célula estivesse de fato em proliferação (van Oijen et al., 1998).

O Ki-67 é considerado atualmente o melhor marcador de proliferação, porque foi encontrada forte correlação entre este e o prognóstico de diversos tumores (Scholzen; Gerdes, 2000; Gonzales-Moles et al., 2010).

Existe uma tendência a se acreditar que a alta expressão da proteína Ki-67 possa determinar uma pior evolução e prognóstico nos casos de câncer de oro, naso e hipofaringe (Pich et al., 2004).

Nos últimos anos vêm-se investigando a proliferação tumoral com utilização do Ki-67, como fator preditivo da resposta ao tratamento radioterápico nos tumores de cabeça e pescoço. A quantificação do antígeno Ki-67 antes e depois da radioterapia pode ser um parâmetro útil para a predição da evolução clínica dos pacientes afetados (Ogawa; Inomata, 1992).

## **2.4 Angiogênese**

A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é um processo complexo que implica na proliferação e migração das células endoteliais (Kraizer et al., 2001).

A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais é essencial ao desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos e nos processos inflamatórios. A angiogênese e a metástase tumoral são processos relacionados, pois ambos envolvem: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (Liotta et al., 1991).

A formação de vasos sanguíneos tem sido identificada sob duas formas: angiogênese e vasculogênese. A angiogênese foi estabelecida como brotamento de novos vasos a partir de células endoteliais diferenciadas de um vaso pré-existente. A vasculogênese é a formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há vasos, através de estímulo da proliferação dos angioblastos (células precursoras do endotélio) (Conway et al., 2001).

Assim, a neoangiogênese é um processo essencial para o desenvolvimento tumoral e tem sido relacionada com a capacidade de metastatização e com o prognóstico em neoplasias malignas de diversos sítios anatômicos (Shpitzer et al., 1996).

O processo de progressão de uma célula normal para malignidade envolve, dentre muitos mecanismos, a capacidade de estimular a angiogênese, através do aumento de secreção de fatores vaso-indutores e diminuição dos inibidores. Sendo assim, a carcinogênese encontra-se diretamente relacionada com a neovascularização, a qual decorre do desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, secretados pelas células neoplásicas, sendo que a inibição da angiogênese limita o crescimento da neoplasia (Schlingemann et al., 1990).

## **2.5 Densidade Microvascular**

Os primeiros relatos descritos sobre a vascularização tumoral foram realizados há muitos séculos, por Fallopio em 1600. Mais tarde, Hunter (1828) elaborou um estudo demonstrando uma

maior vascularização nos tumores. Entretanto, somente em 1907 Goldman e subseqüentemente Lewis (1927), Ide (1939) e Algire (1945) realizaram estudos mais detalhados acerca da vascularização tumoral.

Apesar desses primeiros estudos, a angiogênese somente foi quantificada histologicamente em 1991 quando Noel Weidner et al. realizaram um estudo imunoistoquímico, avaliando a expressão do fator VIII nos vasos sanguíneos e assim contando a presença de microvasos na área mais vascularizada do tumor (*hot spots*), determinada como densidade microvascular (DMV).

Após inúmeros trabalhos confirmando que a DMV era significativo fator prognóstico em câncer de mama, ovário, glândula salivar (Weidner et al., 1991;1992; Lim et al., 2003) e indicador de metástases em câncer de mama e carcinoma gástrico (Weidner et al., 1991; Maeda et al., 1995; Vermeleun et al., 2002), outros estudos contrariam esses resultados inclusive nos carcinomas de mama (Fox & Harris, 2004).

Moriyama et al (1997) avaliando carcinomas orais demonstraram maior DMV nos casos não metastáticos quando comparados aos metastatizantes.

Desta forma, a densidade vascular é considerada uma medida importante para determinação da resposta angiogênica tumoral e estabelecimento das relações com a progressão tumoral e prognóstico em tumores sólidos, localizados em mama, ovário, próstata, colo e outros, demonstrando uma forte associação com metástases nos carcinomas de mama e revelando ser um fator

prognóstico independente para sobrevida de pacientes (Weidner et al., 1998).

## **2.6 Fator de Crescimento Vascular Endotelial - VEGF e VEGF-C**

Uma ampla variedade de fatores de crescimento e citocinas têm sido caracterizadas como estimuladores da angiogênese, tais como os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF). Estes são liberados pelas células tumorais e tidos como estimuladores da proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial em carcinomas de células escamosas, inclusive da cavidade oral. Estudos desenvolvidos demonstram que a neutralização destes fatores inibe o crescimento tumoral, sendo possível sua utilização como indicador prognóstico de metástase (Douglas, 2000).

O VEGF, também conhecido como VEGF-A, é uma potente citocina angiogênica (Ruhrberg, 2003) e pertence à família de genes que incluem o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E e possui várias funções como: proliferação celular, migração, especialização e sobrevida (Ferrara et al., 2003).

O VEGF é um mitógeno endotelial específico que tem um papel fundamental na angiogênese (Leung et al., 1989) e considerado um forte candidato na indução da angiogênese no crescimento tumoral (Shang et al., 2002), e ainda como

potencializador da permeabilidade vascular (Desai; Libutti, 1999).

O controle de produção de VEGF é feito por meio de mudanças na estabilidade de seu RNA mensageiro e de sua taxa de transcrição. Em condições de hipóxia, há um aumento na concentração intracelular da forma ativa da proteína reguladora fator I induzido por hipóxia (HIF-1), que estimula a transcrição do gene VEGF. Desta forma, a proteína VEGF é secretada, difunde-se através do tecido e atua sobre as células endoteliais. (Alberts et al., 2006; Ferrara, 2003).

Estudos têm demonstrado que a combinação do anti-VEGF com a quimioterapia ou radiação no tratamento de tumores sólidos, resultam em um aumento do efeito anti tumor (Ferrara et al., 2003).

A neoformação vascular e as substâncias envolvidas na tumorigênese têm papel importante como método de determinação de prognóstico, representando assim, mais um mecanismo para acompanhamento de evolução e confirmação da eficiência das técnicas terapêuticas aplicadas aos pacientes oncológicos (Khon, 1997).

Estudos recentes realizados com marcadores do tipo VEGF-C e VEGF-D apresentaram evidências clínicas quanto à sua importância na linfangiogênese e metástases linfáticas nos carcinomas epidermóides e sugeriram que o VEGF-C e a densidade vascular linfática são fatores preditivos nas metástases linfáticas nos carcinomas epidermóides bucais (Tsuyoshi et al., 2009).

Recentemente a alta expressão do VEGF em condições pré-malignas de epitélios de revestimento e epitélio glandular foi

claramente demonstrada (Langekamp, 2009).

Siriwardena et al. (2008) observaram que a expressão do VEGF-C foi significativamente correlacionada com o padrão de invasão, metástases nodais e linfangiogênese. No estudo realizado o aumento do padrão de invasão, mostrou alta expressão do VEGF-C quando observadas células da linhagem de carcinomas epidermóides bucais, sugerindo então que o VEGF-C, produzido pelas células tumorais, deve aumentar a linfangiogênese e a invasão tumoral, levando à metástase nodal.

## **2.7 Marcadores Endoteliais**

Uma grande variedade de marcadores moleculares permite avaliar a angiogênese tumoral, tanto qualitativa quanto quantitativamente, sendo utilizada para diagnóstico diferencial avaliando o comportamento do processo patológico (Barrillari et al., 1998).

Assim, pode-se avaliar quantitativamente a angiogênese tumoral a partir do índice de densidade microvascular em áreas com alta densidade de vasos (Willians, 2003).

Marcadores endoteliais utilizados na técnica imunoistoquímica incluem fatores de crescimento angiogênico e seus receptores, moléculas de adesão celular, proteases, marcadores de ativação e proliferação (Fox; Harris, 2004). Entre os marcadores específicos destacam-se o fator de Von Willebrand (fator VIII), CD31, CD34, e mais recentemente o CD-105 (Mineo et al., 2004; Sharma et

al., 2005).

O Fator VIII determina a identificação de apenas uma pequena proporção de capilares e vasos linfáticos. O CD-34 é considerado por Fox e Harris (2004) como um marcador de excelência para determinação da angiogênese em tumores, ultrapassando em qualidade do CD-31 como marcador endotelial de escolha para cânceres invasivos (Vermeulen et al., 2002).

Algumas desvantagens estão associadas à marcação do CD-31, como por exemplo, a marcação das células inflamatórias. Mais recentemente, têm sido introduzidos nesta discussão um marcador considerado específico para endotélio em proliferação, o CD105, apresentando fraca marcação para vasos linfáticos e vasos sanguíneos normais (Kumar et al., 1999).

A Endogлина (CD-105) é uma glicoproteína homodimérica de superfície celular que atua suprimindo o sinal do (TGF-  $\beta$ 1) e (TGF-  $\beta$ 3) (Massagué, 1987; Duff et al., 2003), sendo expressa em vasos sanguíneos durante a angiogênese (Dales et al., 2003; Yamashita et al., 2001).

O TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador-  $\beta$ ) é conhecido como uma citocina com capacidade de regular várias funções celulares como proliferação, diferenciação, migração, síntese da matriz extracelular e hematopoiese (Massagué, 1987), assim como também está envolvido na vasculogênese, cicatrização e angiogênese (Roberts et al., 1986).

Um fator considerado potente na estimulação para a expressão do gene CD-105 nas células do endotélio é a hipóxia (Duff

et al, 2003). Desta forma acredita-se que o desenvolvimento da resposta angiogênica possa depender de um balanço entre os níveis de ativação de TGF- $\beta$  e a expressão de CD105 (Li et al., 2000).

Estudos realizados por Rahmawati et al. (2006) revelaram que o CD-105 é um marcador específico de vasos sanguíneos e, sendo assim, a análise de sua expressão tem servido como base para terapias antiangiogênicas contra o câncer.

A expressão desta glicoproteína tem alta relevância no desenvolvimento das malignidades apresentando-se diretamente proporcional ao mesmo. (Mărgăritescu et al., 2008).

Dales et al. (2004a, 2004b) demonstraram que a alta expressão de CD-105 na marcação de vasos sanguíneos de tumores de mama está relacionada com o prognóstico ruim da doença.

Estudos têm mostrado forte imunomarcação para CD105 nos vasos ao redor do tumor, e nenhuma marcação tem sido detectada nos grandes vasos ou vasos sanguíneos dos tecidos normais (Bodey et al., 1998; Kumar et al., 1999). Sendo assim, alguns estudos têm sugerido que o CD105 possa ser um marcador específico e sensível para vasos neoformados em relação aos outros anticorpos pan-endoteliais (CD31, CD34 e fator VIII) nos carcinomas de cervix, cólon, endométrio e mama (Bodey et al., 1998; Saad et al., 2003).

Pesquisas recentes mostram que o CD105 está envolvido na angiogênese e representa um poderoso marcador de neovascularização (Fonsatti et al., 2001).

Li et al. (2000) relataram um aumento do nível de CD105 em amostra de plasma de pacientes com câncer de mama

quando comparado com um grupo controle, sugerindo que o CD105 também pode ser utilizado para identificar pacientes com alto risco de metástase e recidivas.

A alta densidade microvascular obtida pela expressão de CD105 vem sendo relatada como indicadora de prognóstico independente em algumas neoplasias e ainda relacionada com uma baixa sobrevida (Srivastava et al., 1988; Tanigawa et al., 1997; Kumar et al., 1999). Por outro lado, outros autores não conseguiram encontrar tal relação (Gleich et al, 1997; Tae et al, 2000; Grudzinski et al., 2006). Alguns trabalhos têm encontrado associação da expressão de CD105 e a ocorrência de metástases em carcinoma de hipofaringe, carcinomas de mama, carcinoma de endométrio (Saad et al., 2003; Dales et al., 2004; Chien et al., 2006)

Recentemente, alguns autores têm observado uma associação entre a alta DMV determinada pelo CD105 e menor sobrevida em câncer retal, e valor de CD105 como marcador de prognóstico (Romani et al., 2006).

Schimming & Marmé (2002), estudaram 51 casos de carcinoma epidermóide de boca, e tiveram como resultado a expressão aumentada da endogлина no endotélio vascular dos tecidos tumorais, quando comparados com a mucosa normal, sugerindo que a endogлина tenha um importante papel na progressão do carcinoma epidermóide de boca.

Chien et al. (2006) estudaram a marcação de VEGF e CD105 em 73 casos de carcinoma epidermóide de hipofaringe. Foi encontrada marcação de VEGF no tecido tumoral. A imunomarcação

de CD105 ocorreu apenas nos vasos tumorais sendo correlacionada com metástases. Assim, diante esses resultados, os autores concluíram que um maior número de vasos neoformados no tumor, permite que esse seja mais agressivo, e que o CD-105 pode ser um marcador promissor na predição do prognóstico nesses tumores.

## **2.8 Linfangiogênese**

A linfangiogênese, proliferação de vasos linfáticos, no estroma tumoral tem sido correlacionada com metástases linfonodais (Stacker et al., 2002; Franchi et al., 2004; Dadras et al., 2005; Gombos et al., 2005).

Inúmeros fatores de crescimento incluindo VEGF, PDGF e bFGF (Fator básico de crescimento fibroblástico), IGF-I/II (fator de crescimento semelhante à insulina) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos), têm sido reportados como responsáveis pela atividade linfangiogênica (Stacker et al., 2001; Kubo et al., 2002; Vincent; Rafii, 2004; Kajiya et al., 2005; Björndahl et al., 2005; Sedivy et al., 2003; Björndahl et al. 2004; Kim et al., 2006).

Para elucidar o mecanismo da linfangiogênese é essencial entender como os vasos linfáticos se desenvolvem e encontrar marcadores específicos para eles. Durante o desenvolvimento embrionário as células endoteliais expressam o receptor endotelial vascular linfático (LYVE-1) e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-3) e depois disso a expressão do gene homeobox Prox-1 direciona essas células para a

linhagem linfática (Jain, 2003).

Membros da família VEGF são intimamente relacionados à disseminação dos vasos linfáticos, sendo que a linfangiogênese é largamente dependente da sinalização VEGF-C e da atividade dos receptores VEGF-3 (Takahashi; Shibuya, 2005; Oliver, 2004).

Outra molécula envolvida nesse processo é a podoplanina, uma glicoproteína transmembrana que deve contribuir para a adesão e migração de células endoteliais linfáticas e formação das conexões linfáticas (Harvey; Oliver, 2004).

Muitos estudos clínico-patológicos têm sugerido que a linfangiogênese está envolvida na metástase linfática em muitas malignidades (Skobe et al., 2001; Renvi-Vamos et al., 2005). No entanto, não está esclarecido como as células tumorais induzem a linfangiogênese, e como elas penetram nos vasos linfáticos, nos carcinomas epidermóides (Ohno et al., 2007).

## **2.9 Marcadores Endoteliais Linfáticos**

Nos últimos anos, marcadores endoteliais linfáticos foram descobertos, como anti LYVE 1 (Jackson et al., 2001), anti PROX 1 (Woolgar, 2006), antipodoplanina (Sonne et al., 2006) e D2-40 (Kaiserling, 2004; Sonne et al., 2006), que são capazes de corar as células endoteliais linfáticas (Lecs). Adicionalmente, foi demonstrado que o antígeno M2A, reconhecido pelo anticorpo D2-40 é idêntico à podoplanina, reconhecida pelo anticorpo anti-podoplanina (Sonne et

al., 2006).

O D2-40 é um anticorpo que detecta um epítipo resistente à fixação na podoplanina, sendo um marcador seletivo para endotélio linfático (Gombos et al., 2005), sendo considerado altamente específico para as células endoteliais linfáticas, não marcando as células endoteliais dos vasos sanguíneos (Sonne et al., 2006). Esse marcador e a anti-podoplanina mostraram expressão similar dos antígenos M2A e podoplanina, respectivamente, em testículo humano em desenvolvimento, carcinoma testicular *in situ* e tumores de células germinativas (Evangelou et al., 2005).

Atualmente, o D2-40 é aceito como um marcador para o antígeno M2A, também chamado de podoplanina, sendo também expresso em outros tipos celulares normais e neoplásicos (Kaiserling, 2004; Ordonez, 2006; Sonne et al., 2006).

A ocorrência precoce da expressão da podoplanina no desenvolvimento tumoral, a forte associação entre sua alta expressão e o desenvolvimento do carcinoma e ainda seu papel na invasão celular revelados em experimentos *in vitro*, sugerem que a podoplanina pode ser usada como um biomarcador para avaliação do risco do carcinoma bucal, apresentando como meta também, a quimioprevenção. (Kawaguchi et al., 2008)

Chuang et al. (2009), demonstraram que a podoplanina está correlacionada com metástases nodais em carcinoma epidermóide de esôfago, sendo sua expressão alta nesses casos, indicando baixa sobrevida. Assim, sugeriram que a podoplanina pode desempenhar um papel agressivo tanto no carcinoma epidermóide de esôfago como no

carcinoma epidermóide bucal.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar a relação da expressão de fatores de crescimento vascular, dos índices angiogênico e linfangiogênico, da taxa de proliferação celular e do grau histológico de malignidade em casos de carcinomas epidermóides de assoalho bucal e língua.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho experimental seguiu os princípios éticos de pesquisa em seres humanos, sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob protocolo nº093/2007-PH/CEP.

### **4.1 Amostra e Seleção dos Casos**

Foram utilizados para este estudo 60 casos de carcinoma epidermóide intra-bucal (CEI), pertencentes aos arquivos de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC de São José dos Campos, sendo 30 casos localizados em assoalho bucal e 30 casos localizados em língua. Foram selecionados os blocos que continham material com boa qualidade de preservação, com profundidade adequada para as análises e em quantidade suficiente para o corte das lâminas.

Os dados clínicos como idade, raça, gênero e localização anatômica, diagnóstico clínico e diagnóstico histopatológico, foram coletados a partir das fichas de requisição dos arquivos da Disciplina de Patologia e organizados em uma planilha para posterior análise.

## 4.2 Gradação histológica de malignidade

Cortes microscópicos de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura foram obtidos dos blocos arquivados no Laboratório de Patologia da FOSJC. Os mesmos foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H/E) para confirmação de diagnóstico e avaliação da quantidade de material disponível para análise.

Para a avaliação histológica de malignidade, foi utilizada a gradação proposta por Bryne et al. (1989) que se baseia na análise de características morfológicas apresentadas pelas células na região do *front* de invasão tumoral, ou seja, a porção mais invasiva visualizada no corte microscópico. Os parâmetros de padrão de invasão, grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses e infiltrado leucocitário, foram mensurados em escores de 1 a 4 e posteriormente foram somados, resultando em um escore final de malignidade que variou de 5 a 20 pontos. Os espécimes foram então classificados como pouco agressivos (escore final entre 5 e 9) ou muito agressivos (escore final entre 10 e 20).

A área do *front* de invasão de cada espécime foi avaliada por dois examinadores, sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando um microscópio (Axiophot-2 Carl Zeiss, Oberküchen, Germany), com objetiva de 40X.

Quadro 1 – Sistema de gradação histológica de malignidade

Padrão Morfológico	Escore			
	1	2	3	4
Queratinização	Intensa >50% das células	Moderada 20-50% das células	Leve 5-20% das células	Sem queratinização até 5% das células
Polimorfismo	Leve (>75% células maduras)	Moderada (50-75% células maduras)	Intenso (25-50% células maduras)	Extremo (0-25% células maduras)
Nº mitoses/campo	0-1	2-3	4-5	>5
Padrão de invasão	Compressivo e com bordas bem definidas	Cordões sólidos, faixas ou ninhos	Peq. grupos ou cordões de células	Dissociação marcante, com células tumorais isoladas e/ou em pequenos grupos
Infiltrado leucocitário	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

Fonte: Bryne et al. (1989).

### 4.3 Análise imunoistoquímica

Para analisar a proliferação celular foi realizada a reação imunoistoquímica para marcação do antígeno Ki-67. Também foram avaliados os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e endotelial linfático (VEGF-C). A microdensidade vascular sanguínea e linfática foi analisada por meio da marcação dos antígenos endoteliais CD-105 e D2-40, respectivamente.

Para a análise da expressão das proteínas Ki-67, CD-105, D2-40, VEGF e VEGF-C foi utilizada a técnica de imunoistoquímica. Empregou-se estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB) (Dako Corporation, Glostrup, Denmark) para o Ki-67 e Histofine Simple Stain PO (M) (Nichirei Inc., Tokyo, Japan) para os demais antígenos.

O material embocado em parafina foi cortado de

forma seriada, com cerca de 3µm de espessura, e posteriormente estendido em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas em álcool absoluto, secas e tratadas com solução de 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto.

Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol I seguido por xilol II ambos por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente reidratados em série descendente de etanol absoluto I e II, álcool 70% I e II e finalmente álcool 50% I e II, por 3 minutos cada.

Os anticorpos primários utilizados e suas concentrações, assim como o sistema de visualização empregado, a recuperação antigênica, o bloqueio da peroxidase endógena e os tampões de lavagem foram listados no Quadro 2.

Para o Ki-67, após desparafinização e recuperação antigênica, procedeu-se da seguinte forma:

- a) incubação com peróxido de hidrogênio a 6% acrescido de metanol 1:1, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual;
- b) lavagem em água corrente e água destilada e imersão por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- c) incubação de soroalbumina bovina (BSA) diluído em solução Tris (pH 7,4) por 1 hora;

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos de duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante 5 min cada. São eles:

- a) incubação com o anticorpo primário diluído em solução de uso por 1 hora;
- b) incubação com o anticorpo secundário biotilado (DAKO LSAB Kit, Peroxidase), por 30min, à temperatura ambiente;
- c) lavagem;
- d) exposição ao complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB Kit, Peroxidase), por 30min, à temperatura ambiente;
- e) lavagem;
- f) incubação com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB), por 10min;
- g) lavagem em água corrente e água destilada.

Para o CD-105, D2-40, VEGF e VEGF-C, após desparafinização e reidratação dos tecidos:

- a) lavagem em água corrente e água destilada;
- b) recuperação antigênica;
- c) incubação com peróxido de hidrogênio Volume 10 a 3% por vinte minutos;
- d) bloqueio das ligações inespecíficas (DAKO Protein Blocking Serum Free- Ready to use), por 15 minutos (TA);
- e) Incubação do anticorpo primário diluído em diluente de anticorpo (DAKO Antibody Diluent with Background reducing

Components DBS-K004);

- f) Lavagem com solução tampão Tris EDTA (pH=9) para o D2-40 e Tris pH=7,4 para os outros anticorpos;
- g) Sistema de visualização Histofine Simple Stain Max PO Multi (Nichirei Biosciences Inc. - Universal Immuno-peroxidase polymer anti mouse and rabbit), por 30 min;
- h) incubação com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB), por 5min.

Posteriormente, foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, seguido de banho de hidróxido de amônia 10% em álcool 95°GL por 15 segundos com a finalidade de azular o corte, lavagem em água corrente e destilada. Para finalizar, desidratação com série ascendente de etanol 50% II e I, 70% II e I, absoluto II e I por 1 minuto cada. Diafanização com xilol II e I durante 1 minuto e montagem das lâminas em resina Permount.

Controles positivos indicados pelo fabricante foram utilizados para cada anticorpo empregado. Para o Ki-67 foi utilizado um caso de carcinoma epidermóide, para o D2-40 e VEGF-C foi utilizado linfangioma, para o CD-105 e VEGF foram utilizados linfonodo e hiperplasia linfóide. Como controle negativo para todas as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram incubados com a solução diluente do anticorpo no lugar do anticorpo primário.

Quadro 2 – Detalhes dos Anticorpos primários utilizados

Especificidade do Antígeno	Clone	Diluição	Sistema de visualização	Tampão de Lavagem	Pré tratamento Recuperação Antigênica
CD-105	SN6h*	1:50	Histofine***	Tris	Proteinase K* (TA), 6 min
D2-40	M3619*	1:100	Histofine	Tris EDTA Target Retrieval Solution*	BM (95°C), 45min - Citrato
Ki-67	MIB-1*	1:100	LSAB*	Tris	BM (95°C), 45min - Citrato
VEGF	VG1*	1:50	Histofine	Tris	BM (95°C), 45min - Tris EDTA Target Retrieval Solution*
VEGF-C	H-190 **	1:20	Histofine	Tris	BM (95°C) -45min - Citrato

\* Dako Corporation, Glostrup, Denmark

\*\* Santa Cruz Biothecnology, CA, USA

\*\*\* Nichirei Biosciences Inc.

BM= banho maria

TA= temperatura ambiente

#### 4.4 Análise do Ki-67

A análise quantitativa das células positivas do Ki-67 foi analisada por um único observador. Somente as células que apresentaram núcleos corados em marrom foram consideradas positivas, sendo que a intensidade da coloração não foi levada em consideração, somente a distinção entre positiva e negativa.

Para a análise da expressão do Ki-67 (índice de proliferação) foram identificados em microscópios de luz Zeiss Axiophot-2(Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), os campos microscópicos considerados de maior densidade de marcação com aumento de 100X (objetiva e ocular de 10X). Nestes campos foi realizada a obtenção de imagens digitais a partir do mesmo equipamento, com ocular de 10X e objetiva de 40X. As imagens digitais foram submetidas à contagem de células positivas para o Ki-

67, com utilização do programa computacional desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH), *Image-J* (versão *Windows* - domínio público). O índice de proliferação foi a porcentagem de células positivas de um total de 1500 células tumorais, contadas em cinco campos de cada neoplasia.

#### **4.5 Análise do fator de crescimento endotelial (VEGF e VEGF-C)**

A análise do VEGF e VEGF-C foi avaliada por um observador através de imagens digitais obtidas no equipamento descrito anteriormente, com ocular de 10X e objetiva de 40X. A expressão imunoistoquímica dos respectivos antígenos pelas células epiteliais tumorais foi avaliada por método semi-quantitativo de escores. Este se baseou na soma da proporção e intensidade das células tumorais com marcação positiva, conforme previamente proposto por Soini et al. (2001). Para cada campo selecionado a porcentagem das células positivas foi avaliada e classificada em cinco escores: **0**= ausência de células tumorais positivas; **1**= menos de 25% de células tumorais positivas; **2**= 26 a 50% de células tumorais positivas; **3**= 51 a 75% de células tumorais positivas e **4**= mais de 75% de células tumorais positivas. Em seguida procedeu-se a análise e classificação da intensidade, através dos seguintes escores: **0**= ausência de marcação; **1**= marcação fraca; **2**= marcação moderada; **3**= marcação forte e **4**= marcação intensa. Os valores obtidos foram somados, resultando em índices de marcação classificados em três categorias: **0** (soma zero) = ausência de marcação; **1** (soma de 1 a 4) =

marcação fraca e 2 (soma de 5-8) = marcação forte.

#### **4.6 Avaliação da Expressão dos Marcadores de Células Endoteliais e Densidade Microvascular sanguínea e linfática**

A análise quantitativa dos antígenos CD-105 e D2-40 para quantificação microvascular tumoral sanguínea e linfática seguiu a quantificação preconizada por Maeda et al. (1995).

Inicialmente, para selecionar o melhor campo foi utilizada uma ampliação original de 200X em microscópio de luz Zeiss Axiophot-2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), a fim de identificar áreas de maior densidade vascular, designadas como *hot spots* (“áreas quentes”).

Nessas áreas, foi realizada a contagem de 5 diferentes campos com ampliação original de 400X. As imagens dos campos foram capturadas por meio de câmera digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Zeiss) acoplada ao microscópio. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axivision Rel 4.7, Zeiss, Jena, Alemanha). As contagens médias para cada caso foram então registradas como densidade microvascular (DMV).

A contagem dos vasos foi realizada por um único investigador, em dois momentos diferentes. Qualquer célula ou grupo celular endotelial, corado positivamente pelos marcadores CD-105 e D2-40, separado dos microvasos adjacentes, das células tumorais e de

outros elementos do tecido conjuntivo, foram considerados como vaso unitário, assim como os vasos contendo lúmen. Estruturas ramificadas foram contadas como vaso único.

#### **4.7 Análise Estatística**

Todos os registros das informações dos dados clínicos e microscópicos dos pacientes com carcinomas epidermóides de assoalho e língua e os dados referentes às reações imunoistoquímicas empregando Ki-67, CD-105, D2-40, VEGF e VEGF-C foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Minitab versão 16.0.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial, sendo aplicados os Coeficientes de Correlação de *Pearson* e teste *t- Student*, adotando-se o nível de significância de 5% em todos os testes.

Também foi empregado o teste *Kappa* para avaliar a concordância entre os examinadores quanto à gradação histológica de malignidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise dos dados clínicos

Dos 60 casos avaliados, todos com diagnósticos histopatológicos de carcinoma epidermóide, 30 estavam localizados em assoalho bucal e 30 em língua. A análise dos 60 casos de carcinoma epidermóide revelou um predomínio do gênero masculino, correspondente a 76,67% dos casos (Figura 1). Foi notada também uma predominância da raça leucoderma, correspondente a 71,67% dos casos (Figura 2).

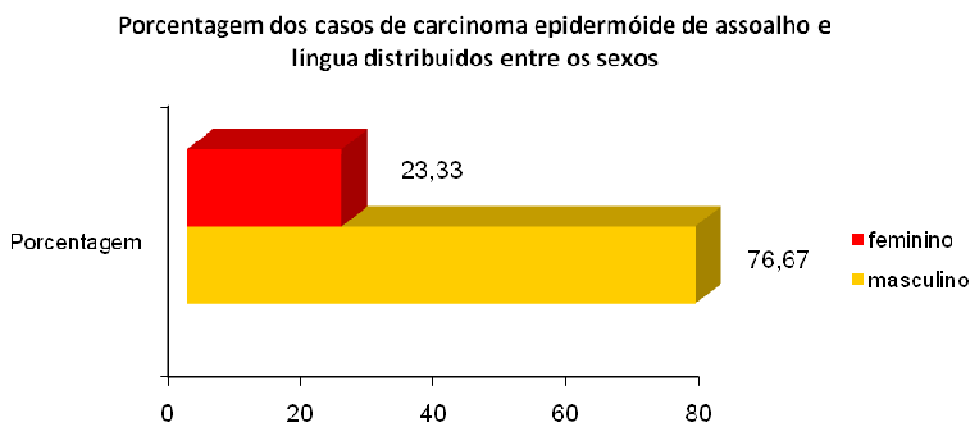


Figura 1 – Gráfico representativo da distribuição do total de casos entre os sexos

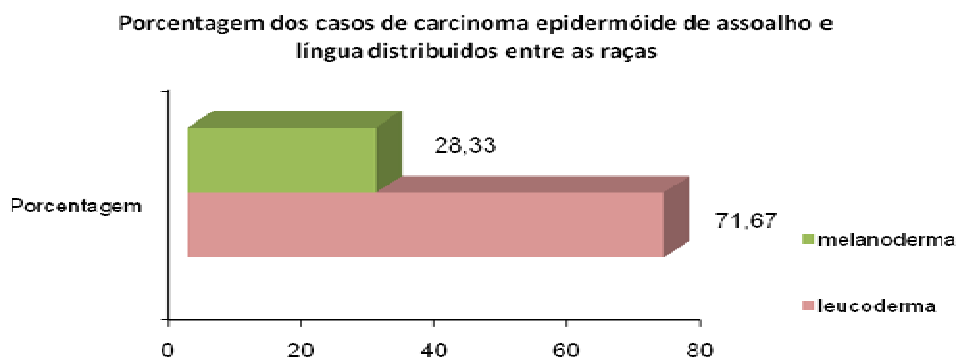


Figura 2 – Gráfico representativo da porcentagem do total de casos distribuídos entre raças.

A média geral de idade foi de 59,20 anos, sendo 57,45 e 60,97 anos, nos casos de assoalho e língua, respectivamente.

## 5.2 Gradação histológica de malignidade

A análise histopatológica do *front* tumoral dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua utilizando os critérios de classificação de Bryne et al. (1989) estão ilustradas nas (Figura 3 e Figura 4).

A avaliação de cada um dos cinco critérios por ambos examinadores pode ser observada no Apêndice A. Como tal análise foi realizada por dois examinadores, foi aplicado o teste *Kappa* de concordância, que teve como resultado 0,47 para os carcinomas epidermóides de assoalho, indicando concordância moderada (Tabela 1). A análise foi então refeita pelos dois examinadores em conjunto, obtendo-se um consenso dos escores (Tabela 2). Entre os carcinomas epidermóides de língua, o teste *Kappa* teve como resultado 0,63, que

significa concordância substancial (Tabela 3). Para o estabelecimento do escore final da gradação de malignidade dos casos de língua foram utilizados os resultados do examinador 2 (Tabela 3).

Nas tabelas 2 e 3 estão sumarizados os casos quanto à sua classificação final em pouco agressivos (p) e muito agressivos (m). A concordância foi indicada na tabela como sim (s) ou não (n).

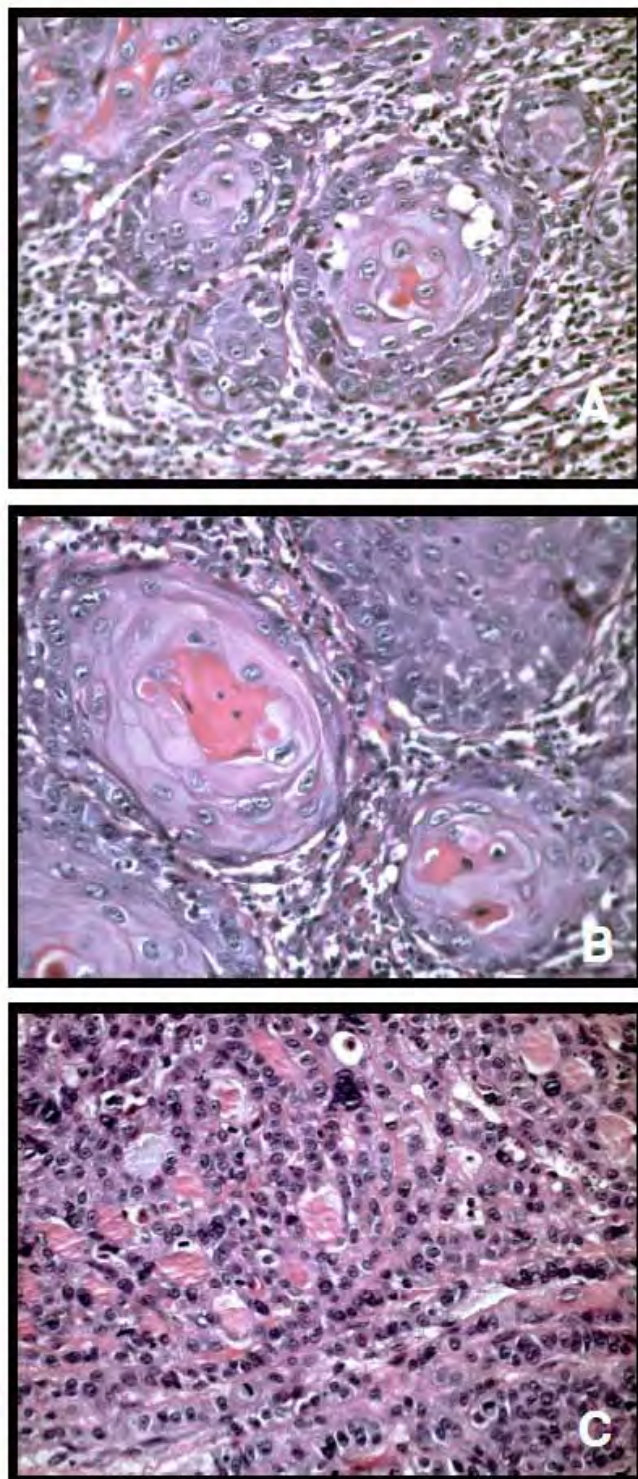


Figura 3 – **A)** Carcinoma epidermóide de língua: front invasivo com padrão de invasão caracterizado pelo escore 2 (cordões sólidos, faixas ou ninhos), aumento original 400X; **B)** padrão de invasão com ninhos de células epiteliais (escore 2), aumento original 400X (H/E); **C)** escore 4 (células isoladas e em pequenos grupos), aumento original 400X (H/E).

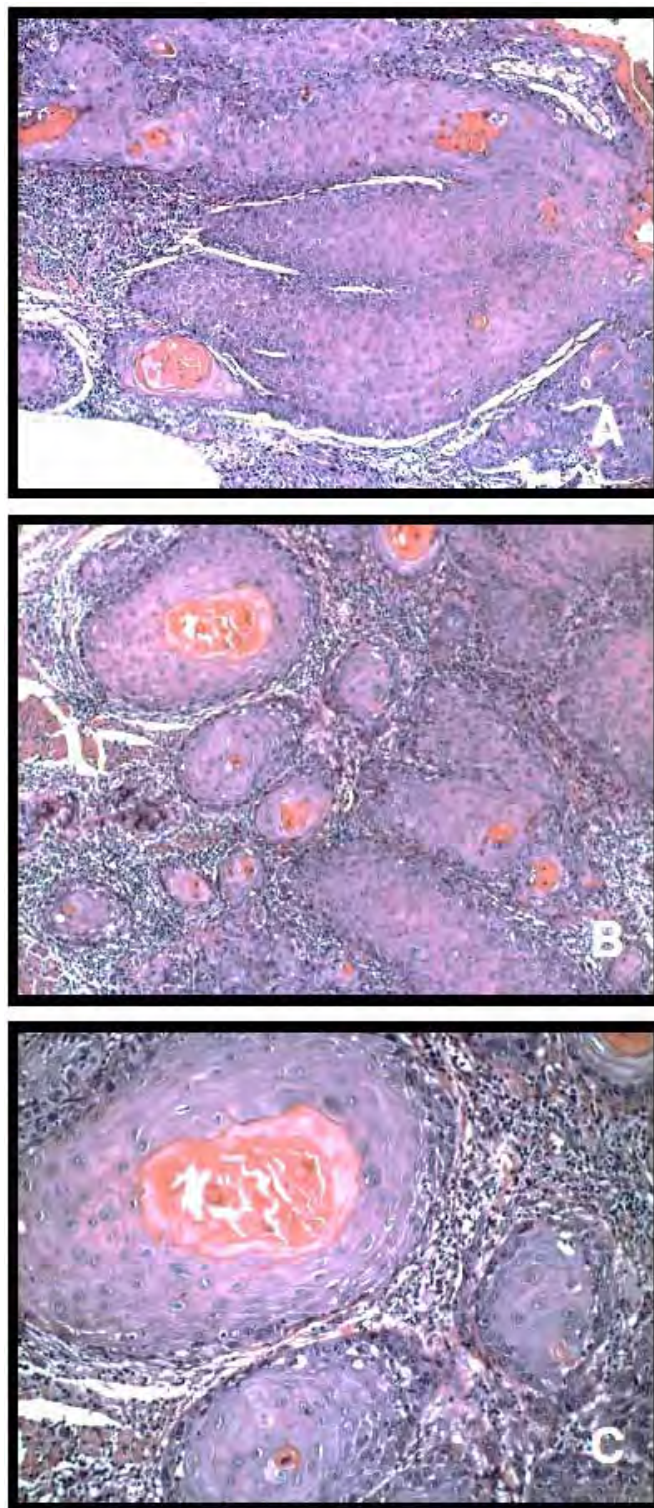


Figura 4 – A) Carcinoma epidermóide de assoalho: escore 2 (front invasivo com moderada queratinização), aumento original 100X; B) padrão de invasão em cordões sólidos, faixas ou ninhos e moderada queratinização (escore 2), aumento original 200X; C) ninho de células epiteliais, com queratinização central, aumento original 400X

Abaixo estão sumarizados em duas tabelas, os casos quanto à sua classificação final em pouco agressivos (p) e muito agressivos (m). A concordância foi indicada na tabela como sim (s) ou não (n).

Tabela 1 – Classificação inicial segundo critérios de Bryne et al. (1989) dos casos de carcinomas epidermóides de assoalho bucal

Examinador 1	Examinador 2	Concordância
m	m	s
p	m	n
m	p	n
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	p	n
p	m	n
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	p	n
m	p	n
p	m	n
m	m	s
p	m	n
m	m	s
p	m	n
m	m	s
m	m	s
p	m	n
m	m	s
m	m	s
m	m	S
m	p	n
m	P	s
m	m	n
p	m	n



Tabela 3 – Classificação segundo critérios de Bryne et al. (1989) dos casos de carcinomas epidermóides de língua

Examinador 1	Examinador 2	Concordância
p	m	n
m	m	s
m	m	s
m	p	n
m	m	s
m	p	n
p	m	n
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	m	s
p	p	s
m	m	s
m	m	s
m	p	n
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	p	n
m	m	s
m	m	s
m	m	s
m	p	n
m	m	s
m	p	n
p	m	n
m	p	n
p	m	n
m	m	s

Comparando os escores finais da gradação de malignidade da língua, verificou-se que os casos muito agressivos (m) corresponderam a 73,33% e no assoalho a 96,67%. Segundo o resultado do teste Exato de Fisher (p-valor = 0,026), foi verificado que as proporções entre as localizações diferem uma da outra (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição absoluta e percentual (%) dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua organizados em escores finais

<b>Malignidade</b>	<b>Língua</b>	<b>Assoalho</b>
pouco	8 (26,67%)	1 (3,33%)
muito	22 (73,33%)	29 (96,67%)
Total	30	30

Nível de significância 5%. Teste Exato de Fisher, p-valor = 0,026

### 5.3 Análise imunoistoquímica

Nas tabelas a seguir constam todos os resultados imunoistoquímicos dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua (Tabela 5 e 6). Os dados individualizados poderão ser consultados no Apêndice C. Um dos casos da amostra de assoalho (caso-10803) foi excluído após as análises morfológicas, em virtude da impossibilidade de obtenção de reação positiva para os anticorpos empregados neste estudo.

Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), microdensidade vascular sanguínea (CD-105) e linfática (D2-40), e fatores de crescimento (VEGF e VEGF-C) em 29 casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal

Caso/Anticorpo	Ki-67 (%)	CD-105*	D2-40*	VEGF	VEGF-C
3956	28,53	4,4	2,4	ausente	forte
4012	32,80	2,8	1,8	ausente	forte
4204	20,00	0	2,3	fraco	forte
5591	14,07	0	3,7	fraco	fraco
5610	14,80	2	2,0	ausente	forte
5670	33,27	2	0,0	fraco	forte
6162	2,27	1,4	2,0	ausente	forte
6224	3,73	1	0,2	ausente	forte
6316	6,60	1,2	1,6	ausente	forte
6721	3,87	0,2	3,8	fraco	ausente
7895	6,17	1,2	3,8	ausente	fraco
8032	1,40	1,8	3,4	ausente	ausente
8033	5,80	4	2,2	ausente	excluído
8123	6,33	1,4	1,8	forte	ausente
8427	6,20	0	5,0	fraco	ausente
8559	2,33	1,8	2,6	ausente	fraco
8699	3,20	0,2	2,0	ausente	ausente
9453	3,40	2,2	2,0	ausente	forte
9481	2,40	0	0,0	ausente	fraco
9551	3,13	1,6	0,4	fraco	ausente
9702	0,20	0,2	2,3	ausente	fraco
9823	54,47	3,2	1,0	ausente	forte
9982	0,00	0,4	0,0	ausente	forte
10102	9,67	1,2	1,0	ausente	forte
10161	5,40	0,6	1,6	ausente	forte
10503	13,67	2,6	2,2	fraco	forte
10637	22,60	1,4	1,7	ausente	forte
10711	3,80	3	0,0	ausente	forte
10844	30,33	6	1,4	ausente	forte

\*Microdensidade vascular sanguínea e linfática = média do número de vasos em 5 campos por caso.

Abaixo, pode-se observar a Tabela 5 com os resultados imunoistoquímicos de 30 casos de carcinoma epidermóide de língua.

Tabela 6 – Resultados imunohistoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), microdensidade vascular sanguínea (CD-105) e linfática (D2-40), e fatores de crescimento (VEGF e VEGF-C) em 30 casos de carcinoma epidermóide de língua

Caso/Anticorpo	Ki-67 (%)	CD-105*	D2-40*	VEGF	VEGF-C
6062	22,9	2,2	5,4	ausente	forte
6078	1,7	4,2	2,67	ausente	forte
6428	3,8	4,2	3,75	forte	forte
6982	3,5	1,6	3	fraco	fraco
7007	40,1	1,6	2,4	ausente	forte
7069	10,7	3,2	5,8	ausente	forte
7287	4,2	2	3,6	ausente	fraco
7398	5,1	2,6	4,2	ausente	fraco
7401	22,9	4	2,2	ausente	ausente
7418	0,4	0,6	3	fraco	fraco
7640	0,6	1,2	0,2	ausente	ausente
7706	4,5	0,8	1	ausente	fraco
7798	13,7	1,8	3	ausente	fraco
7897	6,9	2,4	5	fraco	fraco
8073	6,3	2,2	0,8	ausente	fraco
8109	4,5	2,8	1,6	ausente	ausente
8175	5,6	2,4	4	ausente	forte
8461	11,7	0,8	6,8	fraco	forte
8543	21,5	1,4	3,6	fraco	ausente
8947	1,7	1,2	3,8	fraco	forte
8993	4,7	1,67	4,2	ausente	ausente
9352	0,1	2	2	fraco	ausente
9656	2,9	3	4	ausente	fraco
9700	5,6	2,6	7,25	fraco	fraco
9863	1,1	4,2	3,6	forte	fraco
10077	6,6	0,8	3,6	ausente	ausente
10285	8,9	1,8	2,75	ausente	fraco
10408	10,5	1,2	3,4	fraco	forte
10418	7,9	1,8	3	ausente	forte
10592	53,3	3,6	3,2	ausente	ausente

\*Microdensidade vascular sanguínea e linfática = média do número de vasos em 5 campos por caso.

A positividade da marcação do Ki-67 foi observada nos núcleos das células epiteliais neoplásicas (Figuras 5 e 6).

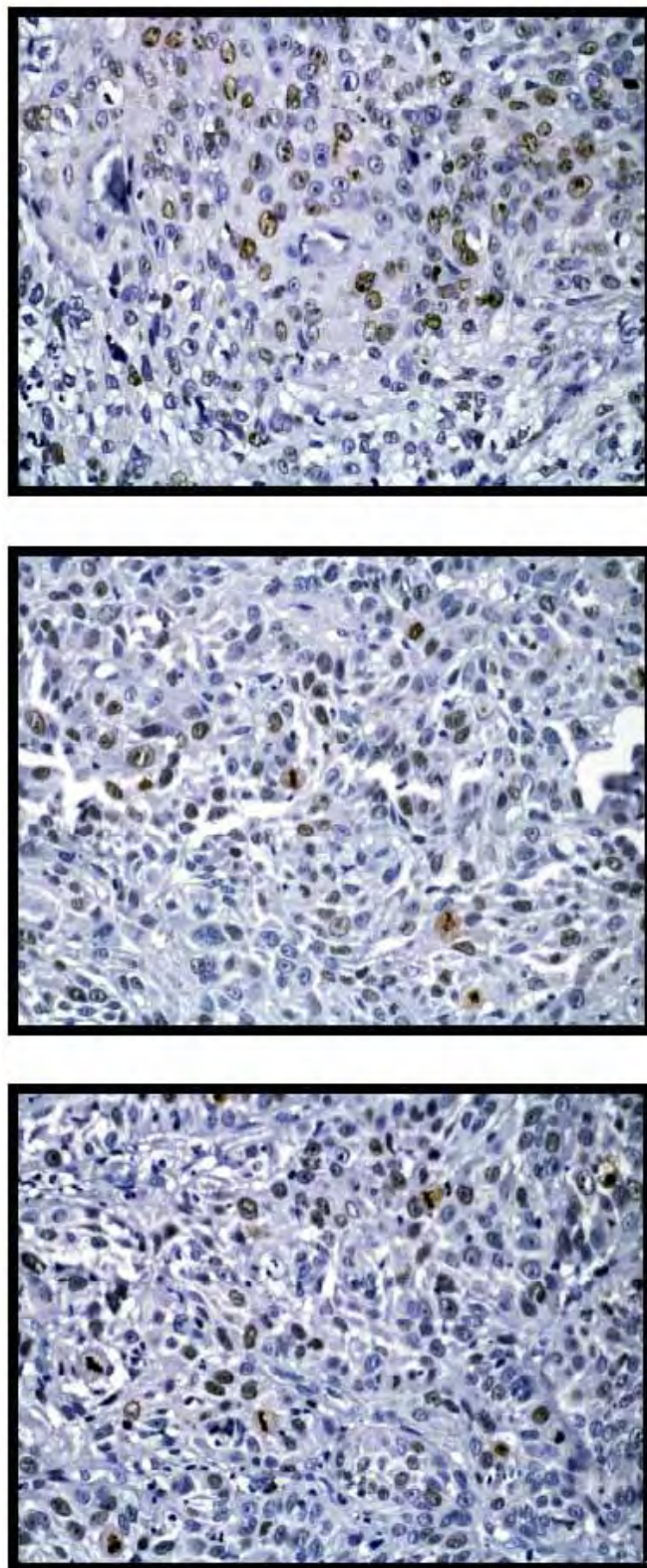


Figura 5 – Expressão da marcação do Ki-67 em casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original 400X.

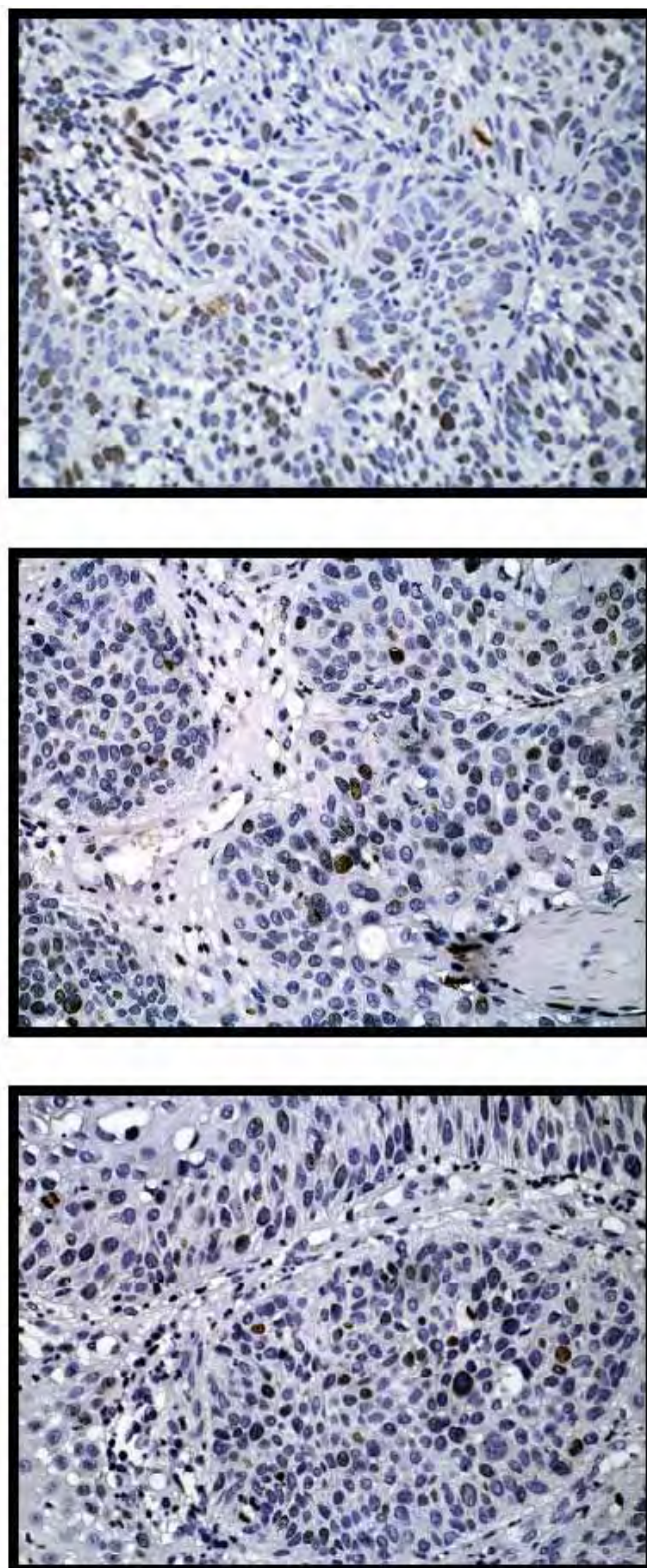


Figura 6 – Expressão da marcação do Ki-67 em casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original 400X.

Após a contagem das células positivas, os resultados foram organizados em planilha e submetidos à análise estatística pelo teste *t - Student*.

O índice de marcação para o Ki-67 mostrou grande variação entre os casos. Embora a média tenha sido maior no assoalho, aplicando-se o teste de proporção e comparando-se os valores obtidos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as localizações (Tabela 7).

Tabela 7 – Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células positivas para Ki-67, obtidos em 59 pacientes com carcinoma epidermóide. Resultado do teste *t- Student*

Proliferação (%)	Assoalho (n=29) x Língua (n=30)		IC (95%); p-valor
	11,7 $\pm$ 13,1	9,8 $\pm$ 11,9	

O VEGF e o VEGF-C foram localizados no citoplasma, membrana e ocasionalmente núcleos das células tumorais e do epitélio de revestimento. Quando era observada coloração intensa, a mesma estava localizada nas células tumorais do *front* de invasão da neoplasia. Raramente o VEGF e o VEGF-C foram localizados no endotélio vascular (Figura 7).

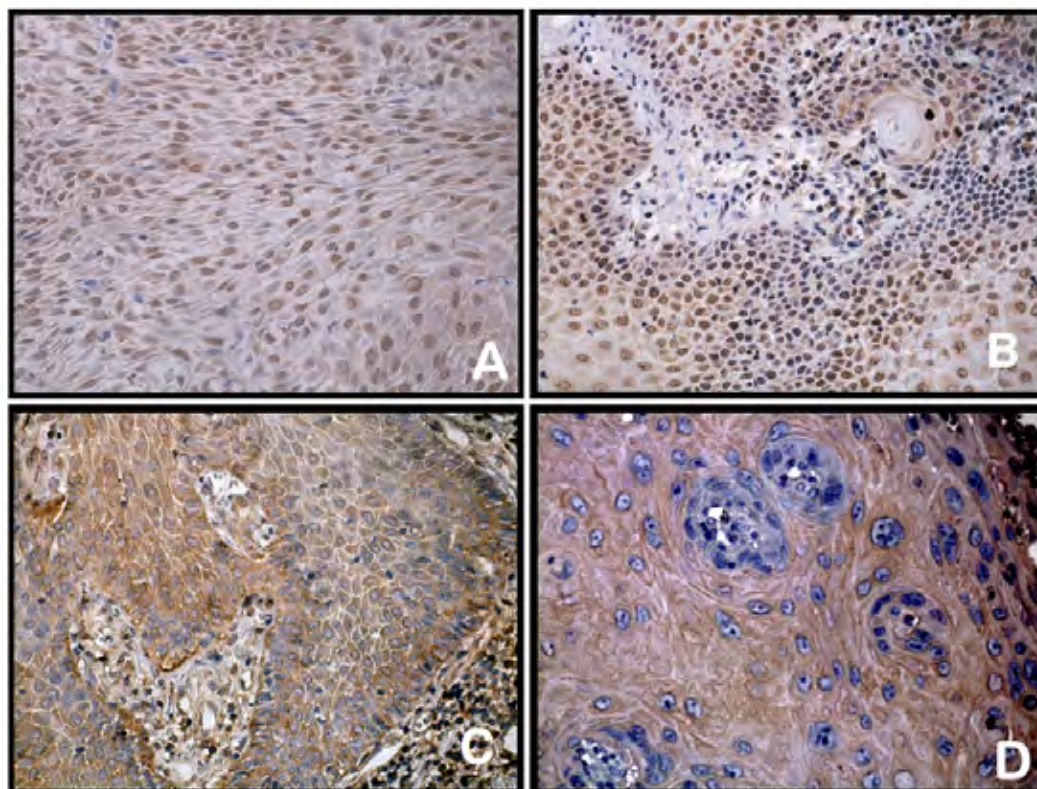


Figura 7 - Expressão positiva do VEGF-C em carcinomas epidermóides de assoalho (A, B) e língua (C, D). Aumento Original de 400X.

Após a análise estatística, notou-se que na maioria dos carcinomas avaliados houve ausência de marcação para o fator de crescimento VEGF (63,33% dos casos de língua e 70% dos casos de assoalho bucal) (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultado do teste de comparação de proporções de marcação do VEGF dos casos de carcinoma epidermóide segundo a localização

VEGF	Língua	Assoalho
Ausente	19 (63,33%)	21(70,00%)
Não ausente	11 (36,67%)	8 (30%)
Total	30	29

Z = 0,55; p-valor = 0,583

Foi observada marcação positiva para VEGF-C na maioria dos casos (73,33% dos casos de língua e 79,31% dos casos de assoalho bucal) (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultado do teste de comparação de proporções de marcação do VEGF-C dos casos de carcinoma epidermóide segundo a localização

VEGF-C	Língua	Assoalho
Ausente	8 (26,67%)	6 (20,69%)
Não ausente	22 (73,33%)	23 (79,31%)
Total	30	30

Z = 0,54 ; p-valor = 0,588

Os vasos sanguíneos e linfáticos foram facilmente identificados pela marcação das células endoteliais pelo CD-105 e D2-40, respectivamente, nos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua (Figuras 8, 9, 10 e 11).

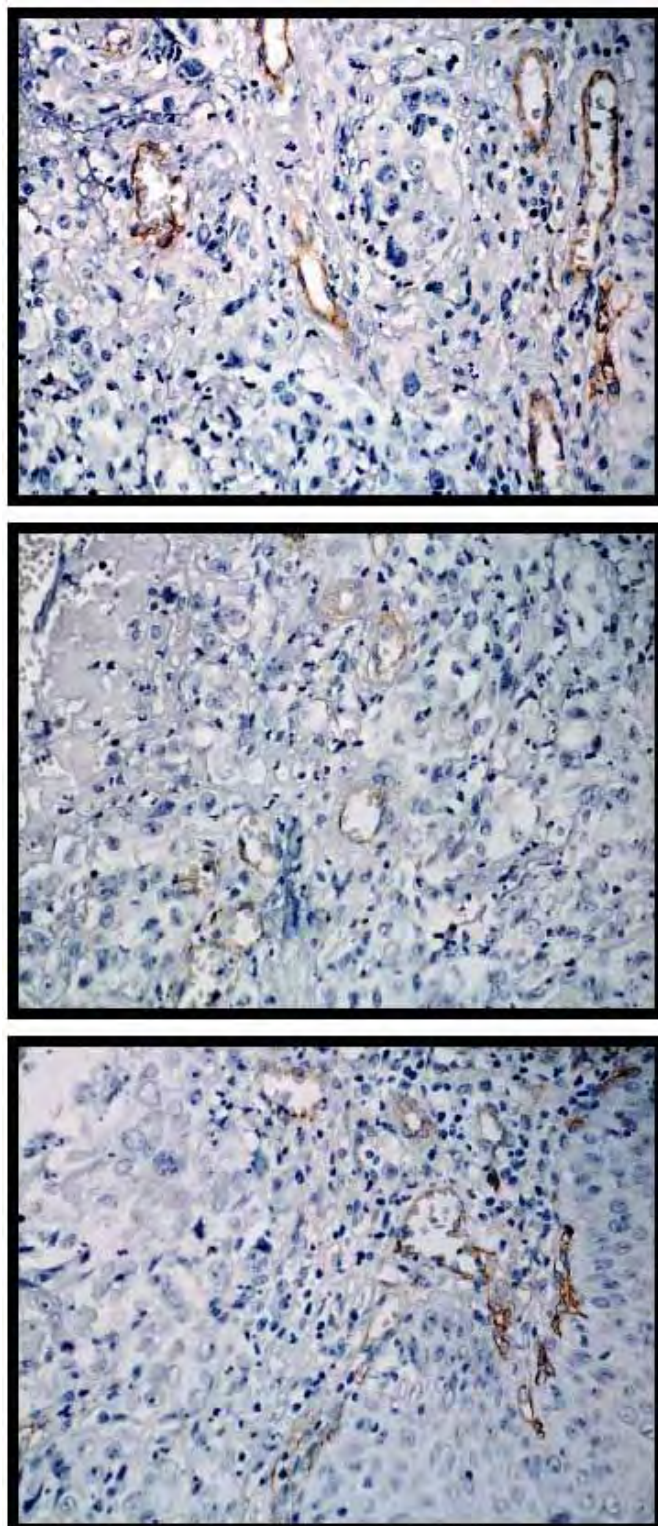


Figura 8 – Marcação da expressão do CD-105 nos vasos sanguíneos dos casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original de 400X.

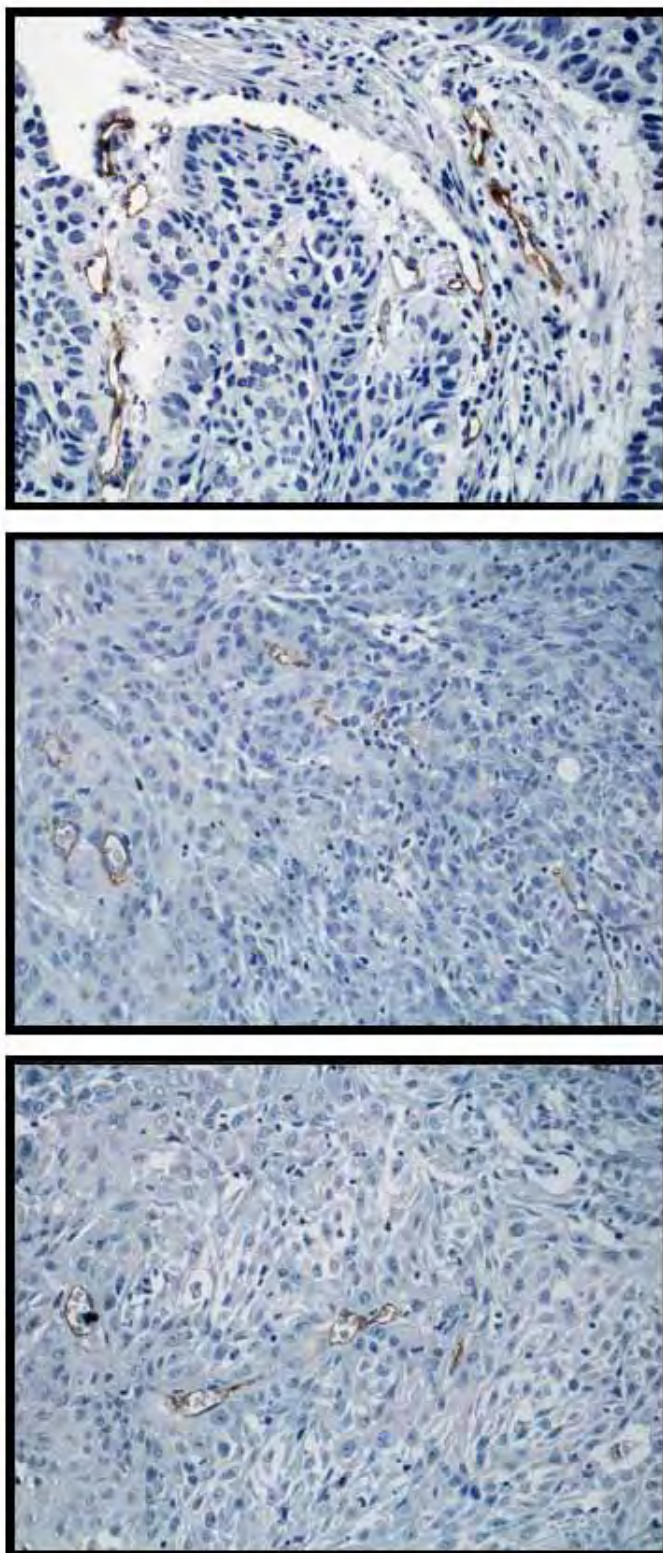


Figura 9 – Marcação da expressão do CD-105 nos vasos sanguíneos dos casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original de 400X.

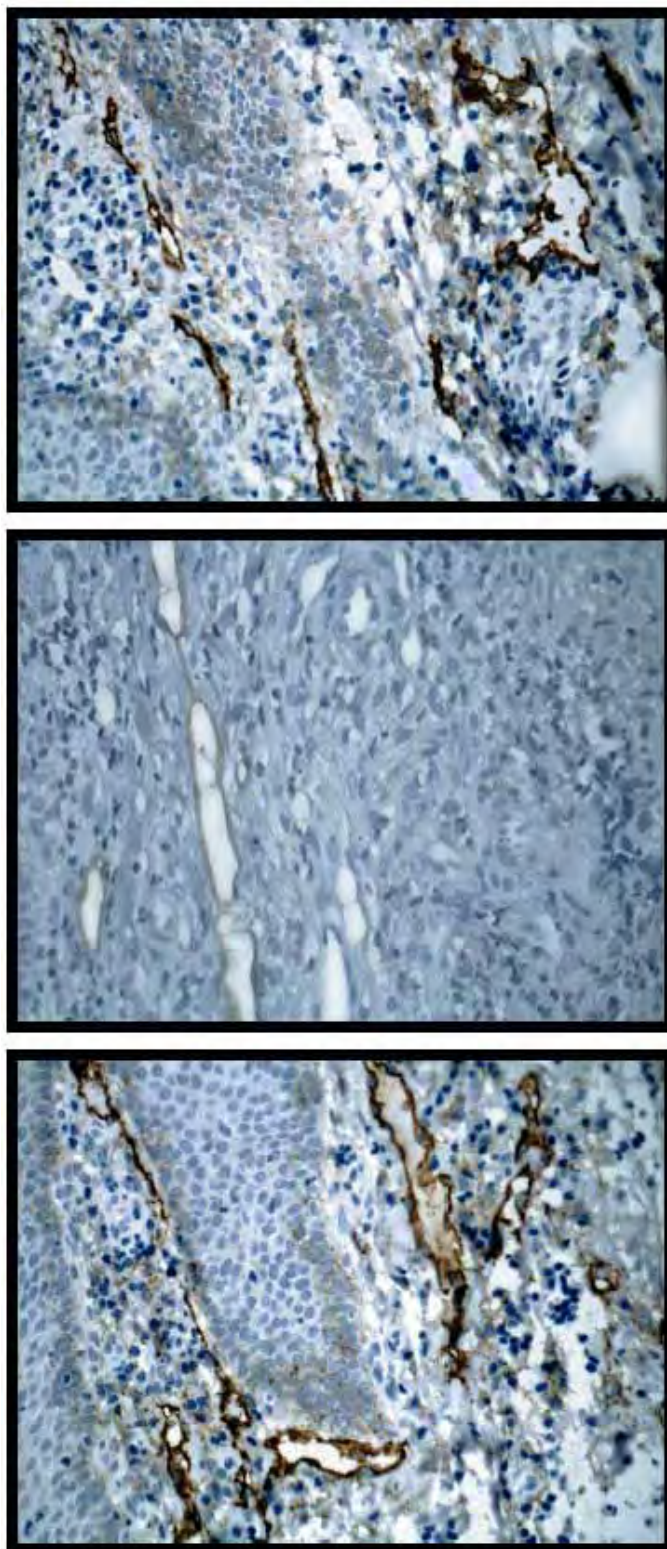


Figura 10 – Marcação da expressão do D2-40 nos vasos linfáticos dos casos de carcinoma epidermóide de língua. Aumento Original 400X.

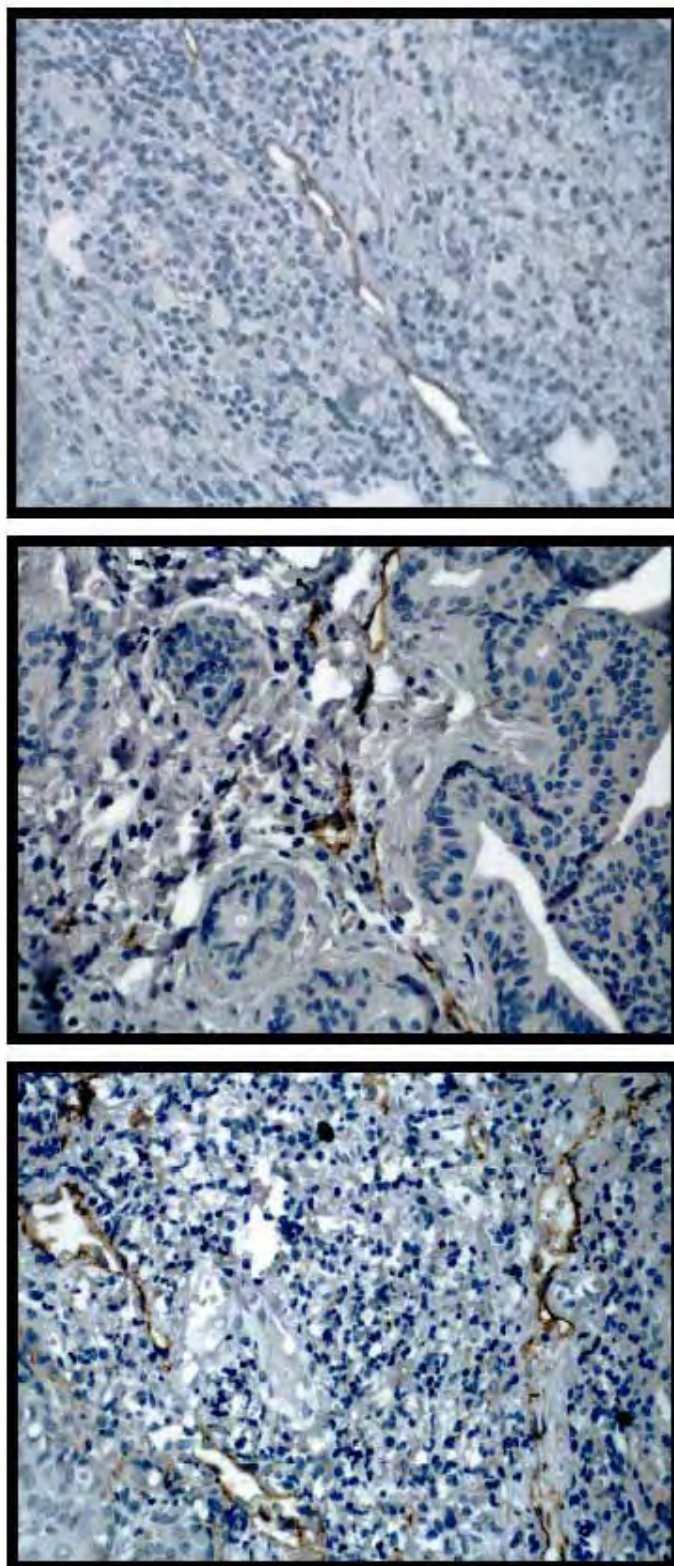


Figura 11 – Marcação da expressão do D2-40 nos vasos linfáticos nos casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Aumento Original 400X.

Posteriormente à marcação do CD-105 e D2-40 foi medida a microdensidade sanguínea e linfática (Tabela 10 e 11).

Tabela 10 – Média ( $\pm$  desvio padrão) da MDV (CD-105), obtida dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Resultado do teste *t- Student*

MDV	Assoalho (n=29) x Língua (n=30)		IC (95%); p-valor
		1,65 $\pm$ 1,47	2,20 $\pm$ 1,07

A MDV não foi diferente entre os casos de língua e assoalho bucal.

Tabela 11 – Média ( $\pm$  desvio padrão) da MDL (D2-40), obtidos dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Resultado do teste *t- Student*

MDL	Assoalho (n=29) x Língua (n=30)		IC (95%); p-valor
		1,87 $\pm$ 1,27	3,43 $\pm$ 1,59

\*p<0,05

A MDL foi significativamente diferente entre os casos de língua e assoalho bucal, sendo que o D2-40 foi mais expresso, mostrando uma maior MDL, nos casos que acometeram a língua.

Os testes estatísticos supracitados não correlacionavam os resultados de cada anticorpo entre si, mas descreveram as diferenças entre as amostras de língua e assoalho. A partir de agora, os índices de proliferação, a marcação pelo VEGF, pelo VEGF-C, o MDV, e o MDL serão correlacionados pelo teste estatístico de correlação de Pearson ou Teste *t-Student*.

Os valores de microdensidade vascular sanguínea (CD-

105) e de proliferação celular (Ki-67) foram testados quanto à correlação, com o teste de Pearson. Obteve-se  $r = 0,331$ , sendo que houve significância estatística ( $p = 0,011$ ) que demonstrou que altos valores da microdensidade vascular sanguínea ocorrem nos casos com maiores porcentagens de proliferação celular (Tabela 12).

Em seguida, testou-se a correlação da proliferação celular (Ki-67) com a microdensidade vascular linfática (D2-40), obtendo-se com o teste de Pearson o valor de  $r = -0,070$  e o valor de  $p = 0,598$ , não significativo (Tabela 13).

Tabela 12 – Valores de correlação de Pearson e teste de significância (*p*-valor) para o índice de proliferação versus MDV e MDL obtidos dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra

Grandezas	MDV	MDL
Proliferação	0,331 (0,011*)	-0,070 (0,598)

\* $p < 0,05$

Ao se correlacionar os valores de MDV e MDL com a localização, segundo o teste *t-Student* obtiveram-se os resultados das Tabelas 12 e 13.

Tabela 13 – Média ( $\pm$  desvio padrão) dos dados obtidos de microdensidade vascular sanguínea e linfática dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Teste de *t-Student* na comparação dos valores médios de MDV e MDL, segundo o local

Local	MDV x MDL		IC (95%); p-valor
Língua	2,20 $\pm$ 1,07	3,43 $\pm$ 1,59	0,53 a 1,93; $p = 0,001^*$
Assoalho	1,65 $\pm$ 1,47	1,87 $\pm$ 1,27	-0,50 a 0,94; $p = 0,543$

\* $p < 0,05$

Pode-se afirmar, pelos resultados da tabela acima que, os valores de MDL na língua foram superiores aos de MDV.

Tabela 14 – Média ( $\pm$  desvio padrão) dos dados obtidos de MDV e MDL dos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra. Teste de *t-Student* na comparação dos valores médios na língua e no assoalho bucal, segundo o tipo de microdensidade

Microdensidade	Língua x Assoalho		IC (95%); p-valor
MDV	2,20 $\pm$ 1,07	1,65 $\pm$ 1,47	-1,22 a 0,12; p = 0,108
MDL	3,43 $\pm$ 1,59	1,87 $\pm$ 1,27	0,81 a 2,30; p = 0,001*

\*p<0,05

Pode-se afirmar, pelos resultados da tabela acima, que os valores de MDL na língua foram superiores aos de MDL no assoalho bucal.

Quando analisada a relação entre VEGF e a MVD, percebeu-se que, com o aumento da marcação desse fator de crescimento, há uma diminuição do valor médio de MDV (Tabela 15).

Tabela 15 – Média ( $\pm$  desvio padrão) dos dados obtidos da MDV e relação com a intensidade de marcação do fator de crescimento VEGF nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra

Variável	VEGF	N	Média	Desvio Padrão	Coef.Var.	Mínimo	Máximo
MDV	ausente	40	2.135	1.384	64.85	0.000	6.000
	fraco	16	1.592	0.965	60.61	0.000	3.200
	forte	3	0.933	1.137	121.85	0.000	2.200

Quando avaliada a relação entre VEGF-C e a MDL, observou-se que com o aumento da marcação não há tendência de diminuição do valor médio de MDL (Tabela 16).

Tabela 16 – Média ( $\pm$  desvio padrão) dos dados obtidos da MDL e relação com a intensidade de marcação do fator de crescimento VEGF-C nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra

Variável	VEGF-C	N	Média	Desvio Padrão	Coef.Var.	Mínimo	Máximo
MDL	ausente	14	2.550	1.713	67.17	0.000	5.400
	fraco	17	2.306	1.432	62.08	0.000	5.000
	forte	28	2.933	1.710	58.29	0.000	7.250

Quando analisada a relação entre MDV e MDL com grau de histológico de malignidade, observou-se que quanto maior o grau de malignidade, menor o valor de MDV e de MDL (Tabela 17).

Tabela 17 – Média ( $\pm$  desvio padrão) dos dados obtidos da MDV e MDL e relação com o grau histológico de malignidade nos 59 casos de carcinoma epidermóide da amostra

Variável	Malignidade	N	Média	Coef.Var.	Mínimo	Máximo	Coef.Var.
MDV	muito	50	1.880	1.369	72.82	0.000	6.000
	pouco	9	2.186	0.809	37.03	1.600	4.200
MDL	muito	50	2.501	1.695	67.77	0.000	7.250
	pouco	9	3.550	0.792	22.31	2.400	5.000

Para avaliar a relação da MDV e MDL com a gradação histológica dos tumores de assoalho bucal foi aplicado o teste estatístico de correlação de Pearson. Observou-se que não houve correlação para os casos muito agressivos ( $r=-0,121$ ,  $p=0,602$ ) e pouco agressivos ( $r=-0,301$ ,  $p=0,469$ ) (Figura 12).

Para avaliar a correlação da MDV e MDL com a gradação histológica dos tumores de língua foi aplicado o teste estatístico de correlação de Pearson. Observou-se que não houve correlação para os tumores de língua muito agressivos ( $r=0,053$ ,

$p=0,815$ ) e pouco agressivos ( $r=0,357$ ,  $p=0,385$ ) (Figura 13).

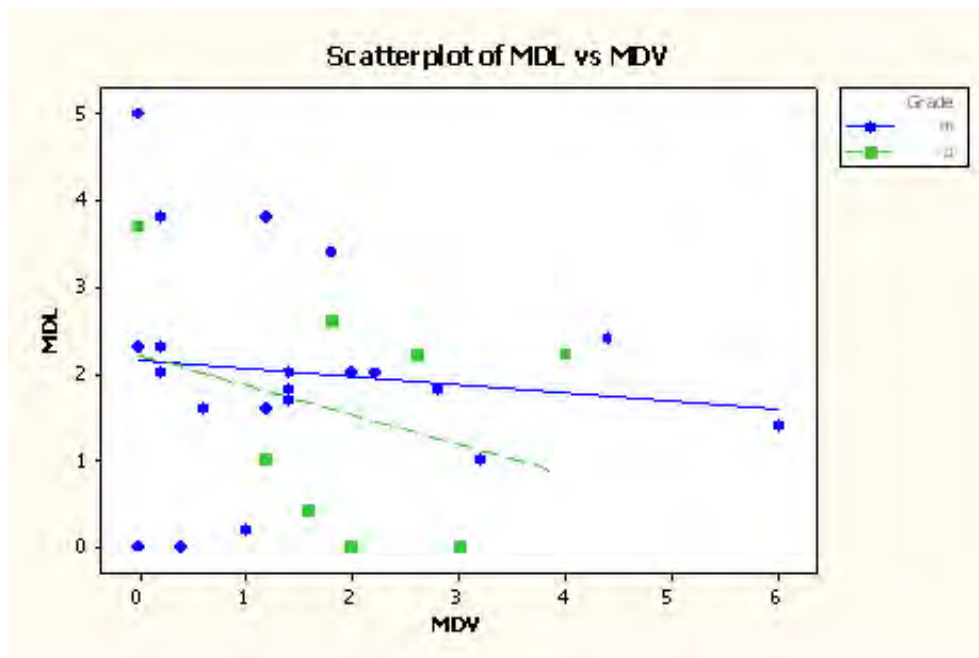


Figura 12 – Gráfico de dispersão e respectiva reta de regressão dos valores de Microdensidade Vascular Sanguínea (MDV) e Linfática (MDL) de tumores de assoalho muito agressivos (m) e pouco agressivos (p)

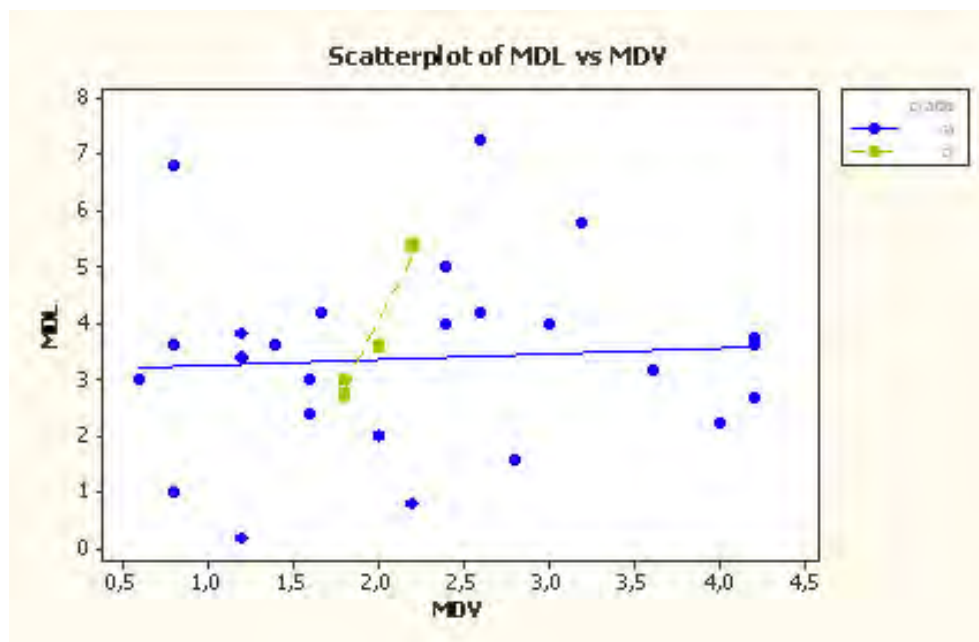


Figura 13 – Gráfico de dispersão e respectiva reta de regressão dos valores de Microdensidade Vascular Sanguínea (MDV) e Linfática (MDL) de tumores de língua muito agressivos (m) e pouco agressivos (p)

## 6 DISCUSSÃO

Por décadas patologistas têm observado a morfologia tumoral das áreas mais invasivas de tumores malignos (*front* invasivo), freqüentemente diferente da porção central e superficial de alguns tumores (Bryne, 1998).

O aumento da proliferação celular, a redução de apoptose e a perda da adesão são aspectos geralmente observados em tumores malignos, além disso, a interação entre a célula tumoral e o hospedeiro na área do *front* de invasão são fundamentais para o crescimento tumoral (Liotta et al., 1991; Folkman, 1995).

A perda da adesão celular também é considerada um fator importante para a progressão tumoral. Muitos estudos sugerem que alterações na expressão da adesão molecular podem ser úteis na determinação prognóstica (Mattijssen et al., 1993; Dabelsteen, 1996; Hakomori, 1996; Jothy et al., 1995, Rudzki; Jothy, 1997).

Diante dessas alterações relacionadas ao *front* invasivo, consideradas características importantes para o prognóstico do carcinoma epidermóide, Bryne, em 1989, desenvolveu um sistema de gradação histológica denominado “sistema simples de gradação histológica do *front* invasivo (IFG)”.

A gradação histológica tem sido usada já algum tempo na tentativa de predizer o comportamento clínico dos carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço (Anneroth et al., 1987).

Diversos sistemas de gradação histológica têm sido

desenvolvidos a fim de avaliar o prognóstico do carcinoma de células escamosas, baseados em características histopatológicas específicas apresentadas por essas neoplasias.

Broders (1941) instituiu uma análise de gradação histológica estudando apenas uma das características morfológicas do tumor, a diferenciação celular. Este sistema se fundamenta no grau de diferenciação e na queratinização das células tumorais, considerando os tumores como bem, moderadamente ou pobremente diferenciados.

Após a idealização deste sistema, outros foram desenvolvidos, como o de Arthur e Fenner (1966), que observaram a relação entre o grau de queratinização, a atividade mitótica, hipercromatismo e prognóstico em câncer de língua. Em 1973, Jakobsson et al., desenvolveram um sistema de gradação multifatorial a fim de proporcionar uma avaliação morfológica dos tumores. Posteriormente, Anneroth et al. (1986) modificaram o sistema de Jakobsson et al. (1973), avaliando critérios morfológicos mais precisos.

Mais tarde, Anneroth et al. (1987) idealizaram um sistema de gradação histológica com a finalidade de diferenciar tumores mais agressivos daqueles considerados menos agressivos, analisando todas as áreas do tumor.

Bryne et al. (1989) consideraram as áreas mais anaplásicas contidas nas regiões mais invasivas dos tumores, diferenciando-se de Anneroth et al. (1987) por não considerar o estágio de invasão da neoplasia. No sistema de Bryne, um alto grau de malignidade corresponde a um tumor pobremente diferenciado.

No presente estudo, verificou-se que após análise histológica, os casos considerados muito agressivos corresponderam a 73,33% nas neoplasias localizadas em língua e 96,67 % nas localizadas em assoalho, pelo IFG proposto por Bryne et al. (1989).

A exclusão de áreas centrais e superficiais nesse sistema é explicada por serem de menor relevância para o comportamento tumoral (Bryne et al., 1989; 1992; 1997; Bryne, 1991).

Alguns estudos confirmam a relevância do sistema de gradação do *front* invasivo (IFG), como sendo de alto valor prognóstico, quando comparados com sistemas tradicionais como, por exemplo, o de Pindborg et al. (1997).

Nesse estudo também foi realizado o teste Kappa para verificar a concordância entre os examinadores quanto à gradação histológica de malignidade. Obteve-se como resultado os valores de 0,47 para os carcinomas epidermóides de assoalho e 0,63 para os de língua.

O teste Kappa é considerado o melhor teste de reprodutibilidade. Valores Kappa menores que 0,6 não são aceitáveis, segundo Fleming (1996). Diante disso, considerou-se recomendável repetir a gradação histológica de malignidade dos casos de assoalho conjuntamente, obtendo-se valores consensuais entre os examinadores.

Uma alternativa para melhorar a reprodutibilidade da gradação histológica de malignidade seria a omissão da contagem de mitoses (Bryne et al.1992), assim como aprimorar o treinamento e a

calibração entre os patologistas (Bryne, et al. 1997) e ainda simplificar critérios de diagnóstico (Woolgar et al, 1995). Neste estudo optou-se por não excluir esse item a fim de reproduzir os critérios originais de Bryne (1989). Procurou-se também obter maior quantidade de dados sobre cada neoplasia avaliada, uma vez que o material de que se dispunha consistia de biópsias incisionais.

Apesar das biópsias incisionais serem consideradas não representativas, acredita-se que o sistema de gradação possa ser utilizado na maior parte dos casos (Bryne et al., 1989, 1992). Neste trabalho, foi possível visualizar o *front* de invasão em todos os casos selecionados, o que permitiu a aplicação do sistema de gradação.

Numerosos trabalhos vêm identificando novos marcadores para avaliação prognóstica, como os antígenos de proliferação celular, os receptores de membrana associados à adesão, a angiogênese e a modificação nos níveis dos proto-oncogenes, entre outros. Tais fatores contribuiriam para formação das neoplasias, permitindo predizer a tendência de agressividade e metástases (Line et al., 2005; Ananthanarayanan et al., 2006; Yu et al., 2007; Vieweg et al., 2008).

Somente as células que estão em proliferação expressam Ki-67, principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular, diferentemente das células que estão quiescentes, que não apresentam essa proteína. (Kurokawa et al., 2005; Myoung et al., 2006). Diversos estudos da literatura relataram um aumento da expressão do Ki-67 acompanhando a progressão da displasia epitelial para o carcinoma epidermóide bucal (Kurokawa et al., 2005; Myoung et al., 2006).

Altos índices de Ki-67 são mostrados em casos de carcinomas epidermóides e estão correlacionados com a progressão e um pior prognóstico (Kurokawa et al., 2005).

No presente trabalho o índice de marcação para o Ki-67 mostrou grande variação entre os casos. Embora a média tenha sido maior no assoalho, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as localizações. O maior índice de proliferação encontrado nos casos de assoalho parece estar relacionado com a maior agressividade destes casos, entretanto, o tamanho da amostra estudada não permitiu detectar diferenças significativas do índice de proliferação entre as duas regiões. Resultados semelhantes foram relatados por Kurokawa et al. (2005) e Myoung et al. (2006).

Neste estudo, analisando-se a totalidade da amostra, verificou-se que há relação entre o índice de proliferação celular e a MDV, ou seja, quanto maior a taxa de proliferação, maior a MDV. Tal relação foi descrita por Moul (1999), que observaram altos valores de microdensidade vascular sanguínea nos casos com maiores índices de proliferação celular, em casos de carcinoma epidermóide de assoalho. Segundo os autores, tal fato poderia ser explicado pela maior necessidade de nutrientes e oxigênio fornecidos pelos vasos sanguíneos para que ocorra maior proliferação.

O crescimento tumoral depende da neovascularização e proliferação celular. A angiogênese é um fator importante para o desenvolvimento e presença de metástases tumorais, podendo ser induzida e regulada por muitos fatores, apresentando como resultado o

aumento da vascularização. O presente estudo evidenciou que o CD-105 foi expresso exclusivamente no endotélio de novos vasos sanguíneos (Kahn; Marks, 2002; Minhajat et al., 2006), quando comparados com os vasos linfáticos marcados pelo D2-40, considerado seletivo para endotélio linfático (Ohno et al. 2007).

Analisando a MDL neste estudo, não se observou relação com a proliferação celular. A MDL tem sido relacionada principalmente com a ocorrência de metástases linfonodais (Sedivy et al., 2003; Sugiura et al., 2009). Este aspecto não pode ser observado neste trabalho, por se tratar de estudo retrospectivo de casos de arquivo, sem a disponibilidade de seguimento clínico dos pacientes.

Alguns fatores prognósticos tumorais vêm sendo identificados para as neoplasias malignas como: subtipo histológico, tamanho e extensão tumoral, presença de linfonodos e metástases. Dentre estes, a metástase tem sido relatada como principal causa morte em pacientes acometidos por neoplasias malignas. A identificação de marcadores específicos pode favorecer precocemente a percepção do comportamento tumoral e, conseqüentemente, ter importância no tratamento e prognóstico. Nessa linha, muita atenção tem sido direcionada ao processo metastático para análise dos diferentes fatores envolvidos no mesmo. (Ellis; Fidler, 1996).

Muitos mediadores químicos envolvidos no processo de angiogênese foram descobertos, destacando-se a família VEGF, com suas várias isoformas, algumas potentes estimuladoras não somente da angiogênese, mas também da linfangiogênese (Ferrara et al., 2003).

No presente estudo foi investigada a expressão dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF e VEG-C) pelas células epiteliais malignas, nos carcinomas epidermóides de assoalho e língua. Na maioria dos casos avaliados houve ausência de marcação para o fator de crescimento VEGF (63,33% dos casos de língua e 70% dos casos de assoalho bucal). Com relação ao VEGF-C, a maioria dos casos mostrou marcação positiva (73,33% na língua e 79,31% no assoalho). Não foi observada correlação dos fatores de crescimento VEGF e VEGF-C entre si. Também não se observou diferença na expressão desses fatores de crescimento entre as localizações das neoplasias.

Na amostra estudada, observou-se que os casos com altos níveis de marcação pelo VEGF, apresentavam menor microdensidade vascular sanguínea. Esses achados sugerem que o VEGF tem pouca influência na angiogênese de carcinomas epidermóides orais. Alguns autores também não observaram correlação entre a vascularização e a expressão de VEGF em carcinomas epidermóides orais (Artese et al., 2001; El-Gazzar et al., 2006). Por outro lado, Inoue et al. (1997) e Shang et al. (2002) observaram que a MDV era maior nos casos positivos para VEGF do que nos negativos, em carcinomas epidermóides de esôfago e boca, respectivamente.

Tse et al. (2007) consideram que a angiogênese tem importante papel no prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, e que a forte marcação imunoistoquímica de VEGF é um forte fator preditivo nesses tumores.

Estudos prévios identificaram um número de fatores de crescimento que tem atividade linfangiogênica (Kubo et al., 2002; Vicent; Rafii, 2004; Björndahl et al., 2005; Kajiya et al., 2005; Kim et al., 2006).

Níveis aumentados de alguns desses fatores têm sido reportados correlacionando a linfangiogênese tumoral e metástase linfonodal em vários tumores (Stacker et al., 2001; Sedivy et al., 2003; Björndahl et al., 2004).

Liu et al. (2009) demonstraram que a alta expressão de VEGF-C nas células tumorais foi um fator significativo e independente, correlacionado a prognóstico ruim para os pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago. Entretanto, há uma limitação neste estudo, pelo fato de não ter analisado o efeito do VEGF-C na linfangiogênese, utilizando um marcador específico para endotélio de vasos linfáticos, como o D2-40.

Nos carcinomas epidermóides orais, a expressão do VEGF e sua correlação com a linfangiogênese tumoral tem sido observada (Ali, 2008; Sedivy et al., 2003), entretanto, alguns autores não conseguiram estabelecer essa correlação (Ninck et al., 2003; Chen et al., 2004; El-Gazzar et al., 2006).

Há relatos de que a alta expressão do VEGF nos carcinomas epidermóides orais tem correlação significativa com linfonodos positivos, mas não com a sobrevida (Uehara et al., 2004).

Particularmente em relação ao carcinoma epidermóide oral, a disseminação ocorre preferencialmente, pela via linfática. A sinalização VEGF-C/VEGF-3 tem sido associada a linfangiogênese

tumoral e a ocorrência de metástase linfonodal, tendo o VEGF-C uma correlação à maior ocorrência de metástase linfonodal (Skobe, 2001; Miyahara et al, 2007; Sugiura et al., 2009) e pior prognóstico (Sedivy et al., 2003; López de Cicco et al., 2004; Siriwardena et al., 2008; Sugiura et al., 2009)

A expressão do VEGF-C também foi correlacionada significativamente com a classificação TNM, mas não influenciou em outros parâmetros clínico-patológicos como idade, sexo, tamanho do tumor, grau histológico, envolvimento linfonodal e estágio patológico (El-Gazzar et al.,2006).

Analisando-se a MDL e a expressão de VEGF-C, nas neoplasias estudadas, notou-se que não houve uma nítida relação entre os mesmos, pois casos com diferentes intensidades de marcação para VEGF-C apresentavam médias de MDL semelhantes. Outros autores também não observaram correlação entre a microdensidade linfática e a marcação do VEGF-C no carcinoma epidermóide oral, sugerindo que o VEGF-C não é o fator primário ou o único fator estimulador envolvido na progressão do carcinoma oral (Miyahara et al., 2007). Alguns pesquisadores, porém, correlacionam a MDL com a expressão de VEGF-C, indicando um importante papel deste na linfangiogênese em carcinomas epidermóides orais (Sedivy et al. 2003; Ali, 2008; Sugiura et al., 2009).

Quando testada a correlação entre a MDV e MDL com o grau de histológico de malignidade, observou-se que quanto maior o grau de malignidade, menor o valor de MDV e de MDL.

Existe uma inconsistência dos resultados de diferentes

investigadores quanto ao papel da MDV no carcinoma epidermóide, possivelmente decorrente das variações na metodologia de sua quantificação. Nesta pesquisa decidiu-se pela contagem padronizada por Maeda et al. (1995).

Existe também grande variação nos diversos estudos quanto aos anticorpos utilizados para marcar as células endoteliais sanguíneas. Dentre estes se destacam o fator VIII anti-Von Willebrand, CD-31, CD-34 e anti-endogлина (CD-105), usados para avaliar vascularização tumoral (Kyzas et al., 2005; Duff et al., 2003).

Sousa et al. (2007) consideram que a determinação do índice angiogênico não representa um bom marcador para avaliação do comportamento biológico do carcinoma epidermóide oral, corroborando com os resultados do presente estudo. Outros autores, porém, salientaram a existência de associação entre a vascularização e a gradação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides orais (Sappayatosok et al., 2009) e o prognóstico em carcinomas em várias localizações (Smith et al., 2000; Poon et al., 2001; Miyahara et al., 2007).

Com relação a metástases em várias neoplasias malignas, pesquisas têm demonstrado que a expressão do CD-105 é relevante, mas poucos estudos têm investigado a expressão do CD-105 na região oral (Hannen; Riediger, 2004; Schimming et al., 2004).

Nos casos analisados, a MDV não foi diferente entre os casos de língua e assoalho bucal. Já a MDL foi significativamente diferente entre os casos de língua e assoalho bucal, sendo que o D2-40 foi mais expresso, mostrando uma maior MDL, nos casos que

acometeram a língua.

Em mucosa normal, Ali (2008) observou que os vasos linfáticos são relativamente pequenos e uniformemente distribuídos abaixo da lâmina própria, enquanto nos casos de carcinoma epidermóide de assoalho e língua em que se empregou o D2-40, os vasos apresentavam-se de forma mais alongada e distribuídos por todo o estroma, resultados semelhantes aos encontrados neste estudo.

Se considerarmos que a taxa de proliferação celular e o grau histológico de malignidade em casos de carcinomas epidermóides de assoalho bucal e língua estão relacionados ao prognóstico desses tumores. O estudo realizado demonstrou que a expressão de fatores de crescimento vascular e do índice angiogênico e linfangiogênico não são representativos para a determinação prognóstica, por não apresentarem relação com a proliferação e a gradação de malignidade. Já a microdensidade vascular sanguínea encontra-se aumentada nos casos com maiores taxas de proliferação, demonstrando relação com o prognóstico tumoral.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesse estudo permitiu concluir que:

- a) há maior proporção de casos de carcinoma epidermóide muito agressivos no assoalho do que na língua, demonstrando diferença quanto à gradação histológica de malignidade nessas localizações;
- b) o índice de proliferação celular é semelhante entre os carcinomas epidermóides de língua e assoalho;
- c) a maioria dos casos de carcinoma epidermóide de língua e assoalho não apresenta expressão imunohistoquímica de VEGF, porém, expressa VEGF-C;
- d) nos casos de carcinoma epidermóide de língua, há maior quantidade de vasos linfáticos do que nos de assoalho;
- e) nos casos de carcinoma epidermóide de língua, a microdensidade linfática é maior do que a sanguínea; enquanto nos casos de assoalho, a

microdensidade linfática é semelhante à sanguínea;

- f) a microdensidade vascular sanguínea em casos de carcinoma epidermóide oral correlaciona-se com a proliferação, observando-se maiores índices de proliferação celular nos casos com altos valores de MDV.

## 8 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Alberts J, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Ali MA. Lymphatic Microvessel Density and the expression of Lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract*. 2008; 17:486-92.

Ananthanarayanan, V, Deaton RJ, Yang, XJ, Pins, MR, Gann, PH. Alterations of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. *BMC Cancer*. 2006; 73(6):1-9.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987; 95:229-49.

Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piatelli A. Microvessel density (MVD and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2001; Jan/Feb.; 21(1B):689-5.

---

<sup>1</sup> Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2009 ago; citado em 13 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Arthur JF, Fenner ML. The influence of histological grading on prognosis in carcinoma of the tongue (a computer analysis of 299 cases). *Clin Radiol*. 1966; 17:384-96.

Baaterburg RJ, Hermans J, Molenaar J, Jeroen JB, Saskale C. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Indian J Pathol Microbiol*. 2001; 23(9):718-24.

Barrillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P, et al. The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form; implications for tumor angiogenesis. *Am Pathol*. 1998; 152(5):116-26.

Björndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, et al. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:15593-8.

Björndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG, Cao Y. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 2004; 6:333-45.

Bodey, B; Bodey, BJR; Siegel, SE; KAISER, HE. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res*. 1998; 18 (4A): 2701-10, 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp.link=conteúdo\\_view.asp&ID=1](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp.link=conteúdo_view.asp&ID=1). Acesso: 21 de março de 2010.

Broders AC. Carcinoma. Grading and practical application. Arch Pathol. 1926; 2:376-81.

Broders AC. The microscopic grading of cancer. Surg Clin North Am. 1941; 21:947-62.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol. 1992; 166:375-81

Bryne M, Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T. The invasive front of carcinomas. The most important part for tumour prognostication? A review. Anticancer, 1997 (in press).

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med. 1989; 18:432-7.

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Dis. 1998; 4:70-7.

Chen YS, Wang JT, Chang YF, Liu BY, Wang YP, Sun A, Chiang CP. Expression of hepatocyte growth factor and c-met protein is significantly associated with the progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. J Oral Pathol Med. 2004 Apr; 33(4):209-17.

Chien, CY; Su, CY; Hwang, CF; Chuang, HC; Hsiao, YC; Wu, SL; Huang, CC. Clinicopathologic significance of CD105 expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. Head Neck. 2006; 28(5): 441-6.

Chuang W, Yeh C, Wu Y, Chao Y, Liu Y, Tseng C, et al. Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol.* 2009; 24:1021-7.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:507-21.

Costa ALL, Pereira JC, Nunes AAF, Arruda MLS. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e classificação anatômica em carcinoma epidermóide oral. *Pesq Odontol Bras.* 2002; Jul/Set.; 16(3):216-20.

Costa ALL, Souza LB, Arruda MLS, Nunes AAF. Oral squamous cell carcinoma: retrospective study of 389 cases. *J Dent Res.* 2000; 79(5):1094.

Costa ALL, Todtai E, Araújo NS. Otimização da técnica de dupla marcação PCNA/ AgNOR em carcinoma epidermóide de boca. *RPG.* 1998; 5:177-83.

Dabelsteen E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol.* 1996 Aug;179(4):358-69. Review.

Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzi Kansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol.* 2005; 18:1232-42.

Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN, et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD-105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol.* 2004a; 35:176-83.

Dales JP, Garcia S, Andrac L, Carpentier S, Ramuz O, Lavaut MN, et al. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD-105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol.* 2004b; 24:1197-204.

Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Andrac-Meyer L, Ramuz O, et al. CD-105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119:374-80.

Dales, JP; Garcia, S; Carpentier, S; Ramuz, O; Lavaut, MN. et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol.* 2004;35:176-83.

Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004; 70(1):35-40.

Desai SB, Libutti SK. Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *J Immunotherapy.* 1999; 22(3):186-211.

Douglas CR. Patofisiologia Oral: fisiologia normal e patológica aplicada à Odontologia e Fonoaudiologia. vol. I. São Paulo: Pancast; 2000.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD-105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003 Jun; 17(9):984-92.

Durazzo MD, Araújo CE, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: Increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastase. *Clinics*. 2005; 60(4):293-8.

El-Gazzar R, Macluskey M, Williams H, Ogden GR .Vascularity and expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma, resection margins, and nodal metastases. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2006; Jun; 44(3):193-7.

Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2451-60.

Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol*. 2005; 18:1490-7.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6):669-76.

Fleming KA. Evidence-based pathology (editorial). *J Pathol*.1996; 175:127-28.

Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *Sem Med Beth Hosp*. 1995; 333(26):1557-63.

Fonsatti, E; Del-Vecchio, L; Altomonte, M, et al. Endoglin: an accessory component of TGF- $\beta$ -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *Journal of cellular physiology*.2001; 188: 1-7.

Fox SB, Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS*. 2004; 112:413-30.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer*. 2004; 101:973-8.

Fumi O, Hayao N, Atsushi A, Yasushi S, Atsutaka K, Yasuhisa H, Masae T, Kenichi K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36:281-9.

Gleich, LL, Biddinger, PW; Frank, DD; Gluckman, JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head & Neck*. 1997; 19: 276-280.

Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:8364-71.

Gonzales-Moles, MA, Ruiz-Avila, I, Gil-Montoya, JA, Esteban, F, Bravo, M. Analysis of Ki-67 expression in oral cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncology*. 2010. Doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.020.

Grudzinski, M; Cambruzzi, E; Lahude, E; Francalacci-Savaris, R; Pedrini, JL; ZETTLER, CG. Expressão da Cox-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Rev Associação Médica Brasileira*. 2006; 52(4):275-280.

Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco) lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5309-18. Review.

Hannen EJ, Riediger D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; Jan;33(1):2-7. Harvey NL, Oliver G. Choose your fate: artery, vein or lymphatic vessel? *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14:499-505.

Henson DE. The histological grading of neoplasmas. *Arch Pathol Lab Med.* 1988; 112:1091-96.

Imai Y, Sasaki T, Fujibayashi T. Volume-corrected mitotic index as a prognostic factor in oralsquamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2001; 37:72-4.

Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer.* 1997 Jan 15;79(2):206-13.

Jackobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1973;12:1-8

Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 2001; 22:317-21.

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9:685-93.

Jothy S, Munro SB, LeDuy L, McClure D, Blaschuk OW. Adhesion or anti-adhesion in cancer: what matters more? (Review) *Cancer Metastasis Rev.* 1995 Dec; 14(4):363-76.

Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40 for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest.* 2002; 82:1255-1257.

Kaiserling E. Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology. *Pathologe.* 2004; 25:362-73.

Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.* 2005; 24:2885-95.

Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan Y, Feng L, Lee JJ, Kim E, Hong WK, Lippman SM, Mao L. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol.* 2008; 26:354-60.

Khon EC. Angiogenesis in ovarian carcinoma. *Cancer.* 1997; 80(12):2219-21.

Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Han JH, Kim K, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126:88-94.

Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, Paizi M, Assy N, Spira G. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 2001; 287:209-15.

Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8868-73.

Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD-105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999; 59(4):856-61.

Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka H, et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34:602-7.

Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005; Sep;131(9):624-30.

Lam L, Logan RM, Luke C. Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australia for the 24-Year. *Aust Dent J*. 2006; 51(1):16-22.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; 246:1306-9.

Li C; Hampson, LN; Hampson, L; Kumar, P; Bernabéu, C; Kumar, S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 on the human vascular endothelial cells. *FASEB*; 2000; 14:55-64.

Li C, Shintani S, Terakado N, Klosek SK, Ishikawa T, Nakashiro K, Hamakawa H. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul; 34(5):559-65.

Li, C; Hampson, LN; Hampson, L; Kumar, P; Bernabéu, C; Kumar, S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 18 on the human vascular endothelial cells. *FASEB.* 2000; 14:55-64.

Lim, JJ; Kang, S; Lee, MR; Pai, KH; Yoon, HJ; Lee, JI; Hong, SP; Lim, CY. Expression of vascular endothelial growth factor is salivary gland carcinomas and its relation to p53, ki67 and prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(9):552-61.

Line, BR, Mitra A, Nan A, Hamidreza G. Targetin tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymerpeptide conjugates. *J. Nucl. Med.* 2005; 46(9):1552-60.

Liotta LA, Steeg PS, Steller-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991; 64:327-36.

Liu P, Chen W, Zhu H, Liu B, Song S, Shen W, Wang F, Tucker S, Zhong B, Wang D. Expression of VEGF-C correlates with a poor prognosis based on analysis of prognostic factors in 73 patients with esophageal squamous cell carcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2009 Oct;39(10):644-50.

Lockhart PB, Norris Jr CM, Pullian C. Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 1998; 34:133-9.

Lópes de Cicco R, Watson JC, Bassi DE, Litwin S, Klein-Szanto AJ. Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(13):4480-8.

Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1995; 13:477-81.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, et al. Tumor angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J cancer.* 1995; aug.; 72(2):319-23.

Mărgăritescu C, Simionescu C, Mogoantă L, Badea P, Pirici D, Stepan A, Ciurea R. Endoglin (CD-105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008; 49(3):321-6.

Massagué, J. Identification of receptors for type  $\beta$  transforming growth factor. *Methods Enzymol.* 1987;146:174-95.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:67-76.

Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *DDT.* 2001; 6(19):1005-24.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, Ruiter DJ. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer.* 1993 Oct; 55(4):580-5.

Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD-105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004; 57(6):591-7.

Minhajati R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expressions in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch.* 2006;448:127-34

Miyahara M, Tanuma Jun-ichi, Gugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2007; 10(6):1287-94.

Moriyama, M; Kumagai, S; Kawashiri, Kojima, K; Kakihara, K; Yamamoto, E. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in Oral Squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 1997; 33(5), 369-74.

Moul JW. Angiogenesis, p53, bcl2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol., Basel.* 1999; 35(5-6):399-407.

Myoung H, Kim M-J, Lee J-H, Paeng J-Y, Yun P-Y. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35:1005-10.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patol Oral Maxilofacial.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*. 2003; Aug 10; 106(1):34-44.

Ogawa Y, Inomata T. Changes in Ki-67 labeling rates of head and neck squamous cell carcinomas during preoperative radiation therapy. *Oncology*. 1992; 49:450-3.

Ohno F, Nakanishi H, Abe A, Seki Y, Kinoshita A, Hasegawa Y, Tatematsu M, Kurita K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2007 May;36(5):281-9.

Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:35-45.

Ordonez NG. Podoplanin: A novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13:83-8.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004; 15(9):1319-29.

Poon RT, Fan S, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001; Feb.; 19(4):1207-25.

Renvi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J . Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:7344-53.

Roberts, AB; Sporn, MB; Assoian, RK; Smith, JM; Roche, NS; Warkefield, LM, et al. Transforming growth factor type  $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*.1986; 83: 4167-71.

Romani, AA; Borghetti, A; Del; Rio, P; Sianesi, M; Soliani, P. The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105- positive vessel count. *J Surg Oncol*.2006;93(6):446-55.

Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells (Review) *Mol Pathol*. 1997 Apr;50(2):57-71.

Ruhrberg C. Growing and shaping the vascular tree: multiples roles for VEGF. *Bioessays*. 2003; 25(11):1052-60.

Saad, RS; Jasnosz, KM; Tung; MT; Silverman, JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*.2003; 22:248-53.

Sapp JP, Eversole IR, Wysocki GP. Contemporary oral and facial maxillofacial pathology. St. Louis: Mosby; 1997.

Sappayatosok K, Yaowapa M, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation.2009; jul, 1;14(7):E319-24.

Schimming, R; Marmé, D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*.2002; 24: 151-156.

Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg.* 2004; Jun; 32(3):176-81.

Schlingemann RO, Rietveld FJR, de Waal RM, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJ. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest.* 1990; 62:690-6.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.

Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Honigschnabl S. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32:455-60.

Shang ZJ, Li JR, Li ZB. Circulating levels of vascular endothelial growth factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31:495-8.

Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology.* 2005; 46(5):481-9.

Shpitzer T, Chaimoff M, Stern Y. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 122:865-8.

Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama MNGPK, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61:103-8.

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001;7:192-8.

Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2000 May; 18(10):2046-52.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, Säily M, Pääkkö P, Koistinen P, Kinnula V. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. *Histopathology.* 2001; Aug; 39(2):179-86.

Srivastava, A; Laidler, P; Davies, R; Horgan, K; Hughes, LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76 –31 4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histological study. *Am. J. Pathol.* 1988; 133: 419-23.

Sonne SB, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Arch.* 2006;449:200-6.

Sousa GFM, Roseana AF, Miranda JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras.* 2007; Jan/Mar.; 10(1):12-8.

Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:573-83.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001; 7:186-91.

Subdo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular - based therapy of oral cancer prevention. *Int J Cancer*. 2005; 115:339-45.

Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, Shirasuna K. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol*. 2009 Mar;34(3):673-80.

Tae, K; El-Naggar, A; Yoo, E; et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*.2000; 6: 2821-28.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions.*Clin Sci (Lond)*. 2005;109:227-41.

Tanigawa, N; Amaya, H; Matsumura, M, et al. Association of tumour vasculature with tumor progression and overall survival of patients with non early gastric carcinomas. *Br J Cancer*.1997; 75: 566-71.

Tse GM, Chan AWH, Yu KH, King AD, Wong KT, Chen GG, Tsang RKY, Chan ABW. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck saquamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(12):3558-65.

Tsuyoshi S, Yoshiko I, Riosuke M, Kotaro I, Miho T, Masakazu A, Kanemitsu S. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *International Journal of Oncology*. 2009; 34:673-80.

Uehara T, Honda T, Sano K, Hachiya T, Ota H. A three-dimensional analysis of blood vessels in bronchioloalveolar carcinoma. *Lung*. 2004; 182(6):343-53.

van Oijen MG, Medema RH, Slooteg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:24-31.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox, SB, Colpaert LP, Marson LP, Gion M, Belien JAM, Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *European Journal of Cancer*. 2002; 38: 1564-1579.

Vieweg, J. Prostate cancer: target complexity. *Curr Opin Urol*. 2008;18:261-62.

Vincent L, Rafii S. Vascular frontiers without borders: multifaceted roles of platelet-derived growth factor (PDGF) in supporting postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;6:307-9.

Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998;27:376-81.

Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol.*2007;43:982-6.

Weidner, N; Semple, JP; Welch, Wr; Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324:1-8.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*1992; 84:1875-87.

Weidner N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol.* 1998;184:119-22.

Willians HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 2003;53:165-72.

Wilting J, Papoutsis M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Borges J, et al. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J.* 2002;16:1271-3.

Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S. Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl.* 1995; 77:325-31.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(3):229-39.

Yamashita J. Vessel formation from ES cells. *Jikken Igaku.* 2001;19:830-5.

Yazdi I, Khalili M. Grading of oral cancer: Comparison of different systems with respect to lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma. Arch Iranian Med. 1999;2:1-5.

Yu, DS. Apoptosis-related markers for predicting progression of prostate cancer. J Chin Med Assoc. 2007;70:3.

## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - São Dimas - CEP 12201-970 - F. (12) 3047-9000 - FAX (12) 3047-9028 -



Comitê de Ética em Pesquisa  
Envolvendo Seres Humanos

São José dos Campos, 10 de agosto de 2009

Ofício nº 046/09 -CEP

<b>Prezado(a) Sr.(a)</b>	<b>FERNANDA BERTINI</b>
<b>Projeto</b>	Correlação clínica e Histológica dos fatores angiogênicos e microdensidade vascular com a proliferação celular no carcinoma epidermóide intra-oral
<b>PARECER</b>	
<p>Por solicitação da Orientadora da Pesquisadora, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, passando a denominar-se "<b>CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE MICROVASCULAR SANGUÍNEA E LINFÁTICA E A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ASSOALHO E LÍNGUA</b>". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 093/2007-PH/CEP de 27/11/2007.</p>	

Atenciosamente,

Profa. Adjunto **JANETE DIAS ALMEIDA**  
Coordenadora

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Análise Histológica segundo Bryne, 1989 dos examinadores F e Y dos casos de carcinoma epidermóide

Dados da análise histológica de assoalho

*(continua)*

	Querati- nização		Poli- morfismo		Nº mitoses		P. Invasão		Inf Leuc		Somatório	
	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y
3956	G4	G4	G1	G1	G2	G1	G2	G2	G1	G1	10	11
4012	G2	G3	G2	G2	G2	G4	G1	G2	G1	G1	8	12
4204	G3	G3	G2	G1	G2	G1	G2	G2	G3	G2	12	9
5591	G4	G4	G2	G2	G3	G1	G3	G3	G2	G2	14	12
5610	G3	G4	G4	G1	G2	G1	G2	G3	G1	G1	12	10
5670	G3	G4	G3	G2	G2	G1	G2	G2	G3	G3	10	12
6162	G3	G2	G2	G3	G3	G2	G4	G3	G1	G1	13	9
6224	G3	G4	G2	G2	G1	G1	G2	G4	G1	G1	9	12
6316	G2	G2	G2	G2	G3	G2	G4	G3	G4	G3	15	12
6721	G1	G2	G2	G3	G2	G2	G1	G3	G4	G2	10	12
7895	G4	G4	G3	G1	G2	G1	G2	G2	G2	G2	13	10
8032	G3	G3	G2	G1	G3	G1	G4	G3	G3	G1	15	0
8033	G1	G1	G2	G1	G3	G1	G2	G2	G3	G2	11	7
8123	G2	G2	G2	G1	G2	G1	G2	G4	G1	G3	9	11
8427	G2	G4	G2	G1	G3	G1	G2	G2	G3	G3	12	11
8559	G2	G4	G2	G1	G2	G1	G2	G2	G1	G2	9	10
8699	G2	G4	G2	G2	G3	G2	G1	G3	G2	G1	10	12
9453	G1	G2	G2	G4	G3	G2	G2	G3	G1	G1	9	12
9481	G4	G4	G3	G1	G1	G1	G1	G2	G4	G2	14	10
9551	G2	G2	G2	G2	G2	G3	G2	G3	G1	G2	9	13
9702	G3	G4	G2	G4	G2	G1	G3	G4	G1	G2	11	15
9823	G2	G3	G2	G3	G3	G4	G1	G2	G1	G2	9	14
9982	G2	G4	G2	G3	G2	G1	G3	G3	G2	G3	11	14
10102	G2	G3	G2	G2	G2	G2	G1	G2	G3	G2	10	11
10161	G2	G3	G2	G2	G3	G1	G2	G1	G3	G3	12	10
10503	G1	G3	G2	G3	G2	G3	G2	G3	G3	G2	10	14
10637	G1	G2	G2	G1	G3	G1	G1	G2	G3	G3	10	9
10711	G4	G2	G2	G2	G2	G1	G1	G3	G1	G1	10	9
10803	G1	G2	G2	G2	G2	G1	G2	G2	G3	G3	10	10
10844	G1	G4	G2	G4	G3	G3	G1	G4	G1	G2	8	17

## Dados da análise histológica de língua

*(conclusão)*

	Querati- nização		Poli- morfismo		N° mitoses		P. Invasão		Inf Leuc		Somatório	
	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y
6062	G2	G3	G1	G2	G3	G2	G1	G1	G2	G2	9	11
6078	G3	G2	G2	G2	G2	G2	G1	G3	G2	G4	10	13
6428	G4	G4	G1	G4	G2	G1	G2	G4	G4	G2	13	15
6982	G3	G3	G3	G2	G2	G1	G1	G2	G4	G1	13	9
7007	G3	G4	G2	G3	G2	G2	G2	G4	G1	G2	10	15
7069	G1	G1	G1	G1	G4	G1	G1	G2	G3	G2	10	7
7287	G2	G2	G2	G3	G2	G1	G1	G3	G1	G2	8	11
7398	G4	G2	G3	G3	G2	G2	G3	G3	G2	G2	14	12
7401	G4	G4	G2	G3	G3	G3	G3	G2	G3	G1	15	13
7418	G4	G4	G2	G2	G3	G1	G1	G2	G2	G1	12	10
7640	G4	G2	G2	G2	G2	G2	G4	G2	G2	G2	14	10
7706	G3	G4	G3	G2	G2	G1	G1	G1	G3	G2	12	10
7798	G1	G1	G1	G2	G3	G2	G2	G3	G1	G1	8	9
7897	G4	G4	G3	G1	G2	G2	G4	G2	G4	G3	17	12
8073	G3	G4	G2	G2	G2	G1	G2	G4	G1	G1	10	12
8109	G1	G1	G1	G2	G3	G1	G2	G2	G4	G2	11	8
8175	G3	G4	G3	G1	G2	G1	G3	G1	G4	G3	15	10
8461	G4	G4	G2	G3	G2	G2	G2	G4	G2	G4	12	17
8543	G4	G2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G3	13	11
8947	G1	G2	G2	G2	G3	G1	G2	G3	G2	G1	11	9
8993	G4	G3	G2	G3	G2	G1	G4	G3	G1	G1	13	11
9352	G3	G4	G2	G3	G2	G2	G3	G4	G2	G4	12	17
9656	G1	G2	G3	G2	G3	G2	G2	G2	G2	G2	11	10
9700	G1	G2	G3	G1	G1	G1	G4	G2	G2	G1	11	7
9863	G4	G4	G1	G3	G2	G1	G3	G3	G2	G2	12	13
10077	G3	G3	G3	G1	G2	G1	G1	G2	G1	G1	10	8
10285	G1	G3	G2	G1	G2	G1	G1	G2	G3	G3	9	10
10408	G4	G4	G1	G1	G3	G1	G2	G1	G4	G2	14	9
10418	G2	G3	G2	G2	G2	G4	G1	G2	G2	G2	9	13
10592	G3	G3	G2	G1	G3	G2	G2	G3	G2	G3	12	12

**APÊNDICE B – Consenso Análise Histológica, segundo Bryne (1989) realizada pelos examinadores F e Y dos casos de assoalho.**

Dados do consenso da análise histológica dos casos de assoalho.

	Queratinização		Poli-morfismo		Nº mitoses		P. Invasão		Inf Leuc		Somatório	
	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y	F	Y
3956	G4	G4	G1	G1	G2	G2	G2	G2	G1	G1	10	10
4012	G3	G3	G2	G2	G4	G4	G2	G2	G1	G1	12	12
4204	G3	G3	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G2	G2	10	10
5591	G4	G4	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G2	G2	13	13
5610	G4	G4	G3	G3	G2	G2	G2	G2	G1	G1	12	12
5670	G4	G4	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G3	G3	12	12
6162	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G1	G1	13	13
6224	G4	G4	G2	G2	G1	G1	G4	G4	G1	G1	12	12
6316	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G3	G3	G3	G3	13	13
6721	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G3	G3	12	12
7895	G4	G4	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G2	G2	11	11
8032	G3	G3	G2	G2	G1	G1	G3	G3	G2	G2	11	11
8033	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G2	G2	7	7
8123	G2	G2	G1	G1	G1	G1	G3	G3	G3	G3	10	10
8427	G4	G4	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G3	G3	13	13
8559	G4	G4	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G2	G2	10	10
8699	G4	G4	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G1	G1	12	12
9453	G2	G2	G4	G4	G2	G2	G3	G3	G1	G1	12	12
9481	G4	G4	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G2	G2	11	11
9551	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G3	G3	G2	G2	12	12
9702	G4	G4	G4	G4	G2	G2	G3	G3	G3	G3	16	16
9823	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G2	G2	G2	G2	13	13
9982	G4	G4	G3	G3	G2	G2	G3	G3	G3	G3	15	15
10102	G3	G3	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	11	11
10161	G3	G3	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G3	G3	11	11
10503	G4	G4	G3	G3	G3	G3	G2	G2	G3	G3	15	15
10637	G2	G2	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G3	G3	10	10
10711	G3	G3	G2	G2	G1	G1	G3	G3	G1	G1	10	10
10803	G2	G2	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G3	G3	10	10
10844	G4	G4	G3	G3	G3	G3	G4	G4	G2	G2	16	16

**APÊNDICE C – Análise e contagem individual dos marcadores (ki-67, CD-105, D2-40, VEGF e VEGF-C dos casos de carcinoma epidermóide.**

Dados de Análise e contagem individual de assoalho

(continua)

Caso	KI-67					CD-105					D2-40					VEGF	VEGF-C
	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5		
3956	42	84	128	102	72	5	3	5	5	4	2	3	2	4	1	AU	FO
4012	98	167	58	85	84	5	3	3	1	2	1	?	3	2	1	AU	FO
4204	78	10	12	-	-	0	0	0	0	0	3	2	2	-	-	FR	FO
5591	49	40	29	27	66	0	0	0	0	0	2	-	-	4	5	FR	FR
5610	98	39	29	28	28	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	AU	FO
5670	73	163	82	82	99	2	3	1	3	1	0	0	0	0	0	FR	FO
5926	44	31	31	31	12	0	0	0	2	0	5	6	3	5	1	AU	FO
6162	8	5	5	9	7	2	0	2	0	3	2	2	3	2	1	AU	FO
6224	28	10	9	6	3	2	0	0	2	1	1	0	0	0	0	AU	FO
6316	28	24	15	24	8	3	1	0	0	2	1	2	2	2	1	FR	AU
6721	11	10	17	7	13	0	0	0	1	0	5	4	4	4	2	AU	FR
7895	43	25	4	2	-	0	0	0	3	3	2	3	6	6	2	AU	AU
8032	8	4	6	3	0	2	1	2	3	1	3	7	3	2	2	AU	EX
8033	10	22	15	17	23	4	4	7	3	2	3	3	2	2	1	FO	AU
8123	25	20	20	9	21	0	2	1	2	2	2	0	2	3	2	FR	AU
8427	38	16	14	15	10	0	0	0	0	0	7	7	4	4	3	AU	FR
8559	19	3	7	6	0	2	2	1	2	2	2	3	2	4	2	AU	AU
8699	2	7	11	14	14	0	1	0	0	0	2	5	0	1	2	AU	FO
9453	10	11	8	13	9	2	2	3	2	2	2	1	2	2	3	AU	FR
9481	5	3	9	7	12	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	FR	AU
9551	13	16	13	5	0	2	2	1	2	1	1	1	0	0	0	AU	FR
9702	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	2	-	-	AU	FO
9823	166	169	282	84	116	9	2	2	2	1	0	3	1	1	0	AU	FO
9982	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	0	0	0	0	-	AU	FO
10102	49	22	55	14	5	0	1	2	1	2	1	-	-	-	-	AU	FO
10161	15	25	8	25	8	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	FR	FO
10503	22	24	20	71	68	1	2	5	1	4	2	2	2	2	3	AU	FO
10637	48	59	79	82	71	2	3	1	0	1	3	1	1	-	-	AU	FO
10711	14	3	5	30	5	2	3	3	5	2	0	0	0	0	0	AU	FO
10803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	AU	FO
10844	115	101	52	63	124	8	5	6	7	4	0	2	1	3	1	AU	FO

AU = Ausente; EX = Excluído; FO = Forte; FR = Fraco

## Dados de Análise e contagem individual de língua

*(conclusão)*

Caso	KI-67					CD-105					D2-40					VEGF	VEGF -C
	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5		
6062	151	59	133	0	0	2	4	2	1	2	3	5	10	2	7	AU	FO
6078	7	3	16	0	0	2	2	2	5	10	4	1	3	0	0	AU	FO
6428	37	20	0	0	0	3	4	8	2	4	3	3	2	7	0	FO	FO
6982	5	6	17	-	-	0	3	0	1	4	4	2	5	1	0	FR	FR
7007	83	124	200	195	-	1	1	2	1	3	2	4	1	4	1	AU	FO
7069	46	42	29	44	-	3	2	6	3	2	3	4	8	9	5	AU	FO
7287	17	15	27	4	-	2	2	3	1	2	4	4	3	2	5	AU	FR
7398	20	19	24	13	-	3	3	3	2	2	2	4	2	7	6	AU	FR
7401	62	89	96	74	22	5	2	3	5	5	2	2	3	3	1	AU	AU
7418	0	0	0	4	-	0	1	1	0	1	4	4	1	0	0	FR	FR
7640	1	3	1	-	-	1	2	0	2	1	1	0	0	0	0	AU	AU
7706	17	13	13	11	-	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	AU	FR
7798	49	44	18	45	50	2	1	3	3	0	3	2	3	3	4	AU	FR
7897	8	19	25	27	25	3	2	3	2	2	5	8	5	3	4	FR	FR
8073	11	8	46	12	18	8	1	0	1	1	1	0	0	0	3	AU	FR
8109	11	21	16	15	5	3	2	1	6	2	2	2	2	1	1	AU	AU
8175	14	13	14	9	-	1	5	1	2	3	2	6	4	6	2	AU	FO
8461	11	12	20	86	46	0	1	1	1	1	7	6	7	9	5	FR	FO
8543	111	46	30	46	89	2	1	3	0	1	4	5	3	3	3	FR	AU
8947	2	5	7	6	6	2	1	1	1	1	3	7	2	3	4	FR	FO
8993	13	28	10	2	18	3	2	0	0	0	2	1	8	5	5	AU	AU
9352	0	0	1	0	-	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	FR	AU
9656	6	4	8	16	10	3	3	4	2	3	6	4	5	2	3	AU	FR
9700	25	11	24	13	11	2	0	4	4	3	8	7	6	8	0	FR	FR
9863	5	7	1	2	2	6	1	2	5	7	6	4	3	3	2	FO	FR
10077	26	22	11	9	31	2	2	0	0	0	6	2	2	5	3	AU	AU
10285	2	12	11	66	43	1	2	2	1	3	4	2	3	0	2	AU	FR
10408	36	44	29	33	15	0	1	2	1	2	3	3	3	4	4	FR	FO
10418	13	17	19	24	46	1	4	0	3	1	4	2	1	4	4	AU	FO
10592	145	143	174	218	119	6	5	3	2	2	5	3	4	2	2	AU	AU

AU = Ausente; FO = Forte; FR = Fraco

*Bertini F. Correlation between lymphatic and blood microvascular density and cell proliferation in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2010.*

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma (SCC) represents 95% of the oral malignant neoplasias, being the tongue and the floor of the mouth the most common intraoral regions. The angiogenesis is essential to various pathological processes such as the development and dissemination of tumors as well as its aggressivity. On the other hand, the lymphangiogenesis would be important in the development of tumor metastasis. The objective of this study is to evaluate the relation among histological characteristics, lymphatic and blood microvascular density and cell proliferation in intraoral squamous cell carcinoma (OSCC). Sixty cases of intraoral squamous cell carcinoma (OSCC) from the archives of the FOSJC – UNESP Pathology Laboratory, being 30 of floor of the mouth and 30 of tongue, will be analysed in relation to its histological gradation of malignancy. There was a predominance of males in both regions as well as the caucasian race. As for the grading of malignancy, 73.3% of cases of squamous cell carcinoma of tongue and 96.67% of cases of floor were very aggressive. It was noted a mean cell proliferation index increased in cases of floor, however, the difference an compared to the tongue was not statistically significant. Most carcinomas evaluated had no

markings for VEGF (63.33% in tongue and 70% in floor) and positive staining for VEGF-C (73.33% and 79.31% and tongue on the floor). The LDV was greater in cases of tongue, with significant differences between regions. It was found that high values occur in cases of MVD with increased cell proliferation. There was no relation of the growth factors VEGF and VEGF-C with MDV and LDV, respectively. Thus we can conclude that: a histological grade of malignancy is higher in cases than in the floor and the index of cell proliferation is similar in both regions; the majority of cases in both regions has no immunohistochemical expression of VEGF; however, expressed VEGF-C, in the tongue is greater LDV than floor; cell proliferation is greater in cases with high values of MDV.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma. Pathological angiogenesis. Lymphatic. Immunohistochemistry.