**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

AROLDO DOS SANTOS ALMEIDA

**Significado clínico da expressão de VEGF-C e de podoplanina
em carcinomas espinocelulares de boca**

**Bauru
2008**

AROLDO DOS SANTOS ALMEIDA

**Significado clínico da expressão de VEGF-C e de podoplanina
em carcinomas espinocelulares de boca**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal
Orientadora: Profa Dra Denise Tostes Oliveira

Bauru
2008

Almeida, Aroldo dos Santos

AL64s Significado clínico da expressão de VEGF-C e de podoplanina em carcinomas espinocelulares de boca / Aroldo dos Santos Almeida. – Bauru, 2008.

167p.: Il.; 30cm.

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

Protocolo nº: 1022/07

Data: 17 de dezembro de 2007.

DADOS CURRICULARES

Aroldo dos Santos Almeida

20/07/1982 Caçapava – SP	Nascimento
Filiação	Aroldo de Almeida Maria Aparecida dos Santos Almeida
2002 – 2006	Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG
2005 – 2005	Aperfeiçoamento em Cirurgia Bucal – Instituto de Odontologia de Alfenas – IOA, Alfenas – MG
2007 – 2008	Mestrado em Odontologia, Área de Concentração: Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
Associação	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

Aroldo e Cidinha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus,

por todas as coisas maravilhosas que faz, pela saúde que me dá para enfrentar cada dia em minha vida, pelas oportunidades que me apresenta e pelas pessoas que põe em minha vida.

Aos meus pais, Aroldo e Cidinha,

por amor que sempre me deram, por toda minha formação como homem e pelo apoio incondicional que me dão em todas as minhas escolhas. Se um dia eu tiver a metade da garra para trabalhar de meu pai e metade da dedicação e amor pelo que faz de minha mãe, eu tenho certeza que serei muito bem sucedido. Pai, mãe: AMO VOCÊS!

Aos meus tios Ademilson e Ana Paula, e meu primo Érick,

porque estão presentes em todos momentos de minha vida e por todo carinho que demonstram em suas atitudes.

Ao meu anjo da guarda, Leda,

que sempre acompanhou minhas batalhas e que sempre me incentivou mandando boas vibrações e bons pensamentos.

À minha orientadora, Profa Dra Denise Tostes Oliveira,

pela orientação deste trabalho, pelas oportunidades que me proporcionou durante o curso, por tudo que me ensinou, pelo incentivo à minha carreira acadêmica e pela amizade. Obrigado por confiar em mim!

Muito obrigado a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru **Prof. Dr. Alberto Consolaro, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** e, em especial, ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira** pelo carinho, pela amizade e por todos os bons momentos proporcionados durante o curso.

Aos funcionários da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru **Maria Cristina**, por me receber sempre com um sorriso enorme e um abraço carinhoso; **Fatiminha**, por tudo que me ensinou tanto profissionalmente dentro do laboratório, como também sobre a vida; e **Marilza**, pela paciência e pelos momentos de boa conversa. Vocês têm um lugar especial em meu coração!

Aos meus colegas de turma de mestrado **Bruno**, grande parceiro nos momentos de trabalho dentro do laboratório e por ser uma pessoa extremamente paciente; **Carine**, extremamente inteligente, carinhosa e atenciosa com todos; **Maria Carolina**, com quem já compartilhei momentos muito especiais desde a graduação, que agora pude conhecer mais e que considero uma pessoa muito franca e verdadeira; e **Gastão**, o “paizão” da turma e que trouxe muita experiência para nossa formação.

Às colegas do doutorado, **Simone, Melaine e Érika**, pela amizade incondicional, pelo respeito e pela compreensão frente às minhas crises de mau humor, mas também pelos ótimos momentos de alegria que compartilhamos juntos.

Aos demais colegas da pós-graduação **Patrícia, Sylvie, Janaína, Eliane, Renata, Milton, Tiago, Carlos Eduardo, Samuel, Erivan, Luís Henrique e Geraldo**, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos ex-alunos da pós-graduação **Rosário, Karen, Érick, Marta e Michele**, pelas experiências compartilhadas.

Aos colegas da graduação da **Turma XLV** do Curso de Odontologia, e em especial aos colegas das **Turmas XVIII e XIX** do Curso de Fonoaudiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas, **Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira**, **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** e **Prof. Dr. Wagner Costa Rossi Junior**, grandes amigos que me ajudaram muito desde a graduação e que acreditaram que eu seria capaz de chegar até aqui.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, que mesmo sem saber, transmitiu minha primeira lição assim que cheguei em Bauru: “ajude o próximo!”

Aos amigos de Bauru, em especial ao **Júnior**, **Meire** e **Leniza** por me receberem, me ajudarem muito durante minha adaptação nos primeiros meses e também por tudo que me ensinaram sobre a vida.

À **Danielle e sua família**, por entrarem em minha vida em um período delicado, pela ótima companhia e por me mostrarem que existem muitas coisas boas no mundo.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome de **Cybelle de Assumpção Fontes**, pelo auxílio e orientação no transcorrer do curso.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial à **Letícia** pela prontidão, atenção, gentileza e competência.

Aos funcionários e amigos do Setor de Informática **Marcelo Momesso**, **Carlos**, **Fabiano** e, em especial ao **Marcelo Oliveira**, porque jamais se recusaram em me ajudar quando meu computador apresentou problemas.

A **todos os funcionários** da Faculdade de Odontologia de Bauru, principalmente das portarias por me receberem todos os dias independentemente do horário e sempre com muita simpatia, e do Restaurante Universitário por servirem todos os dias com muito carinho grande parte de meu sustento alimentar.

A todos os funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer A. C. Camargo, em especial ao **Luís Lima**, por toda consideração, paciência, disponibilidade e presteza com que sempre me atendeu.

Aos funcionários do Arquivo da Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, **Glauber** e **Marcelo**, pelo constante bom humor, pela assistência e pela prontidão na solicitação e localização dos blocos de parafina.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, **Carlos** e **Severino**, pela confecção dos cortes microscópicos.

À química e farmacêutica **Suely Nonogaki**, do Setor de Imuno-histoquímica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela atenção, carinho e paciência com que sempre me recebeu, pela segura orientação nas reações imuno-histoquímicas e pelas sugestões apresentadas.

A **todos os funcionários** do Departamento de Anatomia Patológica e do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela gentileza.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Gilles Landman**, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, por autorizar a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, por assumir a responsabilidade deste trabalho dentro do Hospital

À **Stella** e ao **Dr. José Humberto**, do Núcleo de Auxílio ao Pesquisador do Hospital do Câncer de Barretos, pelo auxílio durante a análise estatística.

Meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa de sua presidente **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**.

Ao Hospital do Câncer A. C. Camargo e ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**.

Ao **CNPq**, pelo auxílio pecuniário.

“Se alguma virtude há e se algum louvor existe, seja isso que ocupe o vosso pensamento.”

Filipenses, 4:8

RESUMO

A expressão do fator de crescimento endotelial vascular tipo C (VEGF-C) e de podoplanina pelas células malignas tem sido associada com a maior ocorrência de metástases regionais e/ou pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca. O objetivo deste estudo foi avaliar o significado clínico da expressão de VEGF-C e podoplanina em 42 carcinomas espinocelulares (CEC) bem diferenciado de boca, com e sem comprometimento linfonodal, incluindo oito carcinomas verrucosos, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, no período de 1980 a 2000. Os pacientes foram analisados quanto ao gênero, idade, cor, tabagismo, etilismo, localização do tumor primário, classificação pelo sistema TNM, tratamento, ocorrência de recidivas local e regional, metástase à distância, de segundo tumor primário, além da presença de infiltrações perineural, muscular, glandular e óssea e de embolizações vasculares. Analisou-se também o índice histopatológico de malignidade tumoral e as expressões imuno-histoquímica de VEGF-C e de podoplanina pelas células malignas no *front* de invasão tumoral. A associação das expressões de VEGF-C e podoplanina com as variáveis estudadas foi calculada pelo teste qui-quadrado. As probabilidades de sobrevida, acumuladas nos períodos de 5 e 10 anos calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de *long-rank*. A maioria dos CEC de boca, incluindo os carcinomas verrucosos, exibiu uma forte expressão de VEGF-C pelas células malignas. Houve uma tendência, sem associação estatisticamente significativa, dos pacientes com CEC de boca e forte expressão de VEGF-C apresentarem maior frequência de recidivas locais e/ou regionais. A forte expressão de podoplanina foi significativamente associada com o gênero masculino ($p=0,037$), com o estadiamento T1 e T2 ($p=0,037$), com o estadio clínico I e II ($p=0,027$) e com a presença de infiltração glandular ($p=0,003$). As recidivas locais e regionais foram detectadas mais frequentemente nos CEC de boca com forte expressão de podoplanina, porém sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados com aqueles com expressão fraca da proteína. As taxas de sobrevida global e específica por câncer para os pacientes com tumores com forte expressão de VEGF-C e a taxa de sobrevida global para a forte expressão de podoplanina foram percentualmente menores do que aquelas dos pacientes com tumores com fraca expressão destas proteínas. O comprometimento linfonodal cervical se mostrou fator de prognóstico significativo ($p=0,001$) para os pacientes com câncer de boca. Estes resultados sugerem que a forte expressão de VEGF-C e podoplanina pelas células malignas juntamente com o comprometimento linfonodal regional são fatores indicativos de uma evolução clínica desfavorável e de um pior prognóstico para os pacientes com CEC bem diferenciados de boca.

Palavra-chave: Câncer de boca. VEGF-C. Podoplanina. Linfangiogênese.

ABSTRACT

Clinical significance of VEGF-C and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma

The expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and podoplanin by malignant cells has been associated with a greater incidence of regional metastasis and/or poor prognosis for patients with oral cancer. The purpose of this study was to evaluate the clinical significance of VEGF-C and podoplanin expression in 42 well-differentiated oral squamous cell carcinomas (OSCC), with and without lymph node involvement, including eight verrucous carcinoma, treated at the Department of the Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, from 1980 to 2000. Patients were evaluated according the following parameters: gender, age, ethnic group, tobacco and/or alcohol consumption, tumor location, TNM stage, treatment and clinical follow-up (recurrence, occurrence of a second primary tumor and death) and the presence of perineural, muscular, glandular and bone infiltrations or vascular embolizations. In addition, we investigated the histopathological malignancy index and the immunohistochemistry expression of VEGF-C and podoplanin by malignant cells in the invasive front tumor. Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the association of VEGF-C and podoplanin with demographic, clinical and microscopic variables in OSCC patients. The 5 and 10-year survival rates were calculated by Kaplan-Meier method and the comparison of the survival curves were performed using log rank test. Most of OSCC, including verrucous carcinoma, showed a high expression of VEGF-C by malignant cells. The OSCC patients with high expression of VEGF-C showed a tendency, without statistical significance, of local and/or regional recurrence. The overexpression of podoplanin was significantly associated with the male gender ($p=0,037$), with T1 and T2 stage ($p=0,037$), with I and II clinical stage ($p=0,027$) and with the presence of glandular infiltration ($p=0,003$). The local and regional recurrences were detected more frequently in OSCC with high expression of podoplanin, without statistical significant difference, when compared with those with low expression of the protein. The overall survival rates and cancer specific survival rates for OSCC patients with high VEGF-C expression and the overall survival rate for OSCC patients with podoplanin overexpression were lower than those of OSCC patients with low expression of these proteins. The cervical lymph node involvement was significant prognostic factor ($p=0,001$) for patients with oral cancer. These results suggest that the overexpression of VEGF-C and podoplanin by malignant cells and regional lymph node involvement are indicative factors of an unfavorable clinical outcome and a poor prognosis for patients with well-differentiated OSCC.

Keywords: Oral cancer. VEGF-C. Podoplanin. Lymphangiogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática das rotas potenciais de metástase via vasos linfáticos (amarelo), vasos sangüíneos (vermelho) e linfonodos. A linfangiogênese na região peritumoral do tumor primário (representada pelos vasos linfáticos ao redor do tumor) e a disseminação metastática das células tumorais podem ser promovidas por fatores de crescimento linfangiogênicos, como o VEGF-C e o VEGF-D, e algumas citocinas contribuem com a atração das células tumorais para os vasos linfáticos. Estes fatores podem ser secretados diretamente pelas células tumorais ou pelas células do estroma, como macrófagos. Os vasos linfáticos maiores parecem aumentar seu diâmetro, contribuindo para a disseminação das células tumorais. A presença de células tumorais nos linfonodos (representados pelos linfonodos extras) pode também induzir a linfangiogênese e outras alterações da morfologia e função dos vários tipos de vasos nos linfonodos permite uma reorganização local da estrutura vascular e conexões atípicas entre a rede vascular sangüínea e linfática. Essas alterações dos vasos podem ocorrer antes (devido a liberação de fatores solúveis) e após a chegada das células tumorais nos linfonodos, e isto, parece facilitar a disseminação neoplásica para órgãos à distância, como os pulmões, fígado, cérebro ou ossos. As células tumorais podem disseminar a partir dos linfonodos para órgãos distantes via vasos sangüíneos associados a estes ou pela entrada no sistema venoso via ductos linfáticos maiores (ducto torácico, por exemplo) e então dissemina via vasos sangüíneos. Alternativamente, células tumorais podem se disseminar diretamente a partir do tumor primário para órgãos distantes via vasos sangüíneos, um processo que pode ser facilitado pela angiogênese tumoral estimulada por fatores de crescimento como VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. (Adaptado de ACHEN; STACKER, 2008)..... 57

Figura 2 -	Carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca onde observa-se intensa queratinização e padrão de invasão compressivo do carcinoma verrucoso (A). e padrão de invasão em cordões grossos na área do <i>front</i> invasivo do carcinoma espinocelular convencional de boca.(B). (Hematoxilina e Eosina).....	99
Figura 3 -	Observar a infiltração perineural (A) e muscular (B) das células neoplásicas do carcinoma espinocelular de boca. Em A, destaca-se a presença de cordões finos de células neoplásicas envolvendo o feixe neural. (Hematoxilina e Eosina).....	103
Figura 4 -	Forte expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-VEGF-C no <i>front</i> de invasão tumoral do carcinoma verrucoso (A) e carcinoma espinocelular convencional de boca (B). (Imuno-histoquímica anti-VEGF-C).....	111
Figura 5 -	Fraca expressão do anticorpo anti-VEGF-C no carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca com padrão de invasão em cordões grossos. (Imuno-histoquímica anti-VEGF-C).....	113
Figura 6 -	Expressão imuno-histoquímica de podoplanina nas células da camada basal do epitélio da mucosa bucal (A). Em B, observar a imunomarcção de podoplanina na região de transição entre o epitélio com expressão na camada basal e a forte expressão das células neoplásicas do carcinoma espinocelular. Destaca-se ainda a imunomarcção dos vasos linfáticos (setas). (Imuno-histoquímica anti-podoplanina).....	117
Figura 7 -	Forte expressão do anticorpo anti-podoplanina pelas células neoplásicas do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca (A). Em B, observar detalhe da marcação membranosa da podoplanina nas células neoplásicas do <i>front</i> de invasão tumoral. (Imuno-histoquímica anti-podoplanina).....	123
Figura 8 -	Ausência de expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-podoplanina na região do <i>front</i> de invasão tumoral do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. (Imuno-histoquímica anti-podoplanina).....	125

Figura 9 -	Curva de sobrevida global segundo a expressão de VEGF-C. Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.....	128
Figura 10 -	Curva de sobrevida global segundo a expressão de podoplanina. Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.....	129
Figura 11 -	Curva de sobrevida global segundo o comprometimento linfonodal cervical (pN). Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Graduação de malignidade do <i>front</i> de invasão tumoral, segundo Bryne et al. (1989).....	83
Tabela 2 -	Protocolo de reações imuno-histoquímicas realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP.....	85
Tabela 3 -	Distribuição dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca quanto aos critérios de inclusão estabelecidos. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	91
Tabela 4 -	Distribuição das características demográficas e da história clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	93
Tabela 5 -	Distribuição das características clínicas de estadiamento, tratamento e evolução dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	95
Tabela 6 -	Graduação de malignidade do <i>front</i> de invasão tumoral de Bryne et al. (1989).....	97
Tabela 7 -	Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo a graduação histopatológica de malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	97

Tabela 8 -	Distribuição de freqüência dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as características microscópicas dos tumores. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	105
Tabela 9 -	Distribuição da expressão de VEGF-C nos 42 carcinomas espinocelulares bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	106
Tabela 10 -	Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as variáveis demográficas e clínicas dos pacientes. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	107
Tabela 11 -	Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo estadiamento, tratamento e evolução clínica. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	108
Tabela 12 -	Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas e a graduação da malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.....	109
Tabela 13 -	Distribuição da expressão de podoplanina nos 33 carcinomas espinocelulares bem diferenciado de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1980 a 2000.....	115

Tabela 14 -	Distribuição da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as variáveis demográficas e história clínica dos pacientes. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000	119
Tabela 15 -	Distribuição da expressão de podoplanina carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo estadiamento clínico, tratamento e evolução clínica. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000	120
Tabela 16 -	Distribuição da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as características microscópicas e a graduação de malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000	121
Tabela 17 -	Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo a expressão de VEGF-C. Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier	128
Tabela 18 -	Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo a expressão de podoplanina. Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier	129
Tabela 19 -	Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo o comprometimento linfonodal cervical (pN). Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
µm	Micrometro
Ag/Ac	Antígeno-Anticorpo
ASA	Aroldo dos Santos Almeida
CEC	Carcinoma espinocelular
CEC I	Carcinoma espinocelular bem diferenciado
CEC II	Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado
CEC III	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado ou indiferenciado
CEC SOE	Carcinoma espinocelular sem outras especificações
CECpN+	Carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, comprovado microscopicamente
CECpN0	Carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, comprovado microscopicamente
CV	Carcinoma verrucoso de Ackerman
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DTO	Denise Tostes Oliveira
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> (fator de crescimento fibroblástico-2)
<i>flt-1</i>	<i>fms-like tyrosine kinase-1</i>
<i>flt-4</i>	<i>fms-like tyrosine kinase-4</i>
<i>fms</i>	<i>feline McDonough sarcoma vírus</i>
GTPase	<i>guanine nucleotide</i>
h	Hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio (água oxigenada)
HE	Hematoxilina e Eosina
HRP	horseradish peroxidase (peroxidase de raiz forte)
IRS	Immuno Reactive Score
kDa	Quilodalton
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial receptor-1 (receptor 1 do endotélio dos vasos linfáticos)
M	Mol
mM	Milimol
MOASS	morte sem evidência de recidiva do tumor primário
MOCA	morte decorrente do tumor primário

MOCI	morte por intercorrência cirúrgica
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
mRNA	RNA mensageiro
N+	presença de linfonodos regionais palpáveis, segundo a classificação TNM para os tumores malignos
N0	ausência de linfonodos regionais palpáveis, segundo a classificação TNM para os tumores malignos
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
NA	não se aplica
NE	não estudado
Nº	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	valor do teste estatístico
PAS	Periodic Acid Schif
PBS	phosphate buffered saline
pH	Potencial hidrogeniônico
pN	classificação patológica dos linfonodos
pN0	ausência de metástase em linfonodos regionais, confirmada microscopicamente
pN+	presença de metástase em linfonodos regionais, confirmada microscopicamente
pN1	presença de metástase em um único linfonodo homolateral, com 3cm ou menos em sua maior dimensão, confirmado pelo exame microscópico
pN2	presença de metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão, confirmado pelo exame microscópico
pN3	presença de metástase em linfonodo com mais de 6cm em sua maior dimensão, confirmado pelo exame microscópico
pT1	tumor com até 2cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca, confirmado pelo exame microscópico

pT2	tumor com mais de 2cm até 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca, confirmado pelo exame microscópico
pT3	tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca, confirmado pelo exame microscópico
pT4	tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, invadindo estruturas adjacentes, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca, confirmado pelo exame microscópico
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa)
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SP	São Paulo
T1	tumor com até 2cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T2	tumor com mais de 2cm até 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T3	tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T4	tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, invadindo estruturas adjacentes, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
TNM	Tumor Node Metastasis (classificação dos tumores malignos)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (União Internacional Contra o Câncer)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)
VEGF-A	<i>fator de crescimento endotelial vascular do tipo A</i>
VEGF-B	<i>fator de crescimento endotelial vascular do tipo B</i>
VEGF-C	<i>fator de crescimento endotelial vascular do tipo C</i>
VEGF-D	<i>fator de crescimento endotelial vascular do tipo D</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> (receptor para o fator de crescimento endotelial vascular)
VEGFR-2	receptor para o fator de crescimento endotelial vascular tipo 2
VEGFR-3	receptor para o fator de crescimento endotelial vascular tipo 3
Vivo 000	vivo e sem evidência da doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	47
2	REVISÃO DE LITERATURA	53
2.1	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR DO TIPO C (VEGF-C)	58
2.2	EXPRESSÃO DE VEGF-C EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA	59
2.3	PODOPLANINA – BIOMARCADOR ESPECÍFICO PARA VASOS LINFÁTICOS	66
2.4	EXPRESSÃO DE PODOPLANINA EM TUMORES MALIGNOS	67
3	PROPOSIÇÃO	73
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	77
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	79
4.2	REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	80
4.3	VARIÁVEIS DE ESTUDO	80
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	82
4.4.1	Graduação da Malignidade Tumoral	82
4.4.2	Técnica Imuno-Histoquímica	84
4.4.3	Avaliação Imuno-Histoquímica	86
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
4.6	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	88
4.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	88
5	RESULTADOS	89
5.1	CASUÍSTICA	91
5.2	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	92
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	94
5.3.1	Graduação Histopatológica de Malignidade Tumoral	96
5.3.2	Avaliação da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares de boca	106

5.3.3	Avaliação da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca	115
5.4	ANÁLISE DE SOBREVIDA	127
6	DISCUSSÃO	131
7	CONCLUSÕES	141
	REFERÊNCIAS	145
	APÊNDICES	157
	ANEXO	165

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas científicas sobre a biologia e o comportamento tumoral têm fornecido informações importantes que vem se tornando a base das novas terapias de combate ao câncer.

Atualmente, o câncer é tratado principalmente por meio de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia cura o câncer quando você retira o tumor precocemente. A radioterapia e a quimioterapia têm sua importância inquestionável, mas não são tratamentos focalizados no tumor, apresentam muitos efeitos colaterais e mesmo prolongando a vida não são a resposta final para eliminar completamente a doença (BOCK et al., 2008; SIMPSON, 2008; ARQUETTE, 2004; KOWASLKI; NISHIMOTO, 2000).

Os cientistas procuram insistentemente por genes mutados ou que estão excessivamente expressos nos tumores, mas que se mantêm silenciosos ou pouco ativos em tecidos normais do corpo humano. Esse conhecimento genômico dos tumores irá fornecer, no futuro, alvos mais específicos que poderão ser atacados por novas terapias (SIMPSON, 2008).

Um dos pontos críticos do comportamento e disseminação do tumor primário, que influencia diretamente o prognóstico do paciente, é a ocorrência da metástase, tanto pela invasão das células malignas nos vasos sanguíneos como nos vasos linfáticos (AMARAL et al., 2004; BOCK et al., 2008). Alguns tipos de tumores sólidos primários como o carcinoma espinocelular de boca disseminam-se preferencialmente pelo sistema linfático (KOWALSKI; NISHIMOTO, 2000; PEPER et al., 2003; HE; KARPANEN; ALITALO, 2004; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; ACHEN; STACKER, 2008; BOCK et al., 2008). O conhecimento molecular da estrutura dos vasos linfáticos e principalmente da linfangiogênese vem contribuindo para se entender a rota de disseminação das células neoplásicas nestes tumores (PEPER, 2001; BEASLEY et al., 2002; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; ACHEN; STACKER, 2008).

No passado acreditava-se que a metástase linfática era um processo passivo pelo qual as células malignas do tumor atingiam os linfonodos via vasos linfáticos pré-existentes localizados nas proximidades do tumor primário (ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008). Entretanto, estudos recentes sugerem que a linfangiogênese no interior ou na periferia dos tumores pode ser induzida pela secreção de fatores de crescimento secretados pelas células malignas aumentando e/ou facilitando a disseminação metastática regional (SAHARINEN et al., 2004; HOSHIDA et al., 2006).

O sistema molecular mais extensivamente estudado de sinalização da linfangiogênese tumoral associada à ocorrência de metástase linfática é a via de sinalização *VEGF-C/VEGFR-3* (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; ACHEN; STACKER, 2006; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; ACHEN; STACKER, 2008).

Muitas evidências científicas têm mostrado que o fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) liga-se ao receptor específico tirosino-quinase VEGFR-2 para promover a angiogênese, e ao receptor VEGFR-3, expresso exclusivamente no endotélio linfático, causando dilatação dos vasos linfáticos tumorais pré-existentes e/ou induzindo a linfangiogênese (KUKK et al., 1996; NICOSIA, 1998; HOSHIDA et al., 2006; ROSKOSKI JR, 2007; ACHEN; STACKER, 2008).

Baseados nestas constatações, vários estudos têm correlacionado às fortes expressões de VEGF-C e de seu receptor VEGFR-3 com a maior frequência de metástases linfonodais via vasos linfáticos e de metástases em órgãos distantes nos tumores malignos de mama, de pele (melanoma), de esôfago, de estômago (SHIDA et al., 2006), de tireóide e colorretal (SIEGFRIED et al., 2003, SU et al., 2006; ROSKOSKI JR, 2007).

Particularmente nos carcinomas espinocelulares de boca, a forte expressão do VEGF-C pelas células epiteliais malignas tem sido correlacionada com a maior densidade microvascular linfática peri e intratumoral (SEDIVY et al., 2003; GOMBOS et al., 2005; NAKAMURA et al., 2005), com a ocorrência de metástases linfonodais (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRIWARDENA et al., 2008) e com um pior prognóstico para os pacientes portadores deste tipo de tumor maligno (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRIWARDENA et al., 2008) .

Entre os marcadores específicos para identificação dos vasos linfáticos nos tumores sólidos destaca-se a podoplanina, uma glicoproteína transmembrana semelhante à mucina que não se expressa no endotélio vascular sanguíneo e nas células epiteliais da mucosa bucal (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2005; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; YUAN et al., 2006; WICKI et al., 2006; OHNO et al., 2007; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; KAWAGUCHI et al., 2008).

Intrigantemente, alguns estudos demonstraram que a podoplanina pode ser expressa pelas células epiteliais malignas de alguns carcinomas na ausência desta expressão no tecido

epitelial normal adjacente (MARTIN-VILLAR et al., 2005; SCHACHT et al., 2005; YUAN et al., 2006; LONGATTO-FILHO et al., 2007). Estudos recentes demonstraram que, em células neoplásicas escamosas de tumores em humanos e em modelos animais, a podoplanina está envolvida em uma vida de migração e invasão coletiva ou isolada destas células malignas (WICKI et al 2006, MARTIN-VILLAR et al 2005).

Clinicamente, a forte expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca, particularmente na área do *front* de invasão tumoral, foi correlacionada a um pior prognóstico para os pacientes portadores desta neoplasia maligna (YUAN et al., 2006).

Muitos questionamentos relacionados ao real papel da podoplanina nos carcinomas espinocelulares permanecem sem resposta (WICKI; CHRISTOFORI, 2007), inclusive se ocorre sua expressão em tumores com baixo potencial metastático como os carcinomas verrucosos.

O conhecimento e a importância clínica da expressão de fatores de crescimento como o VEGF-C que induzem e/ou controlam a linfangiogênese e de proteínas como a podoplanina que não se expressa em tecidos epiteliais normais, como proposto no presente estudo, poderá contribuir para se restringir a disseminação metastática linfonodal do carcinoma espinocelular de boca e se tornarem, no futuro, alvos terapêuticos importantes no tratamento deste tipo de câncer.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A disseminação das células tumorais para os linfonodos regionais é um evento freqüentemente observado em diferentes tumores malignos sólidos (PEPPER et al., 2003; HE; KARPANEN; ALITALO, 2004; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; ACHEN; STACKER, 2008; BOCK et al., 2008; DAS; SKOBE, 2008). Nas últimas décadas, os conhecimentos relativos à estrutura molecular dos vasos linfáticos e principalmente a linfangiogênese têm contribuído para se entender a rota de disseminação das células neoplásicas nestes tumores (PEPPER, 2001; BEASLEY et al., 2002; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; ACHEN; STACKER, 2008; DAS; SKOBE, 2008).

As metástases linfonodais podem ocorrer precocemente e constituem um dos fatores mais relevantes para o estadiamento clínico do câncer em diferentes localizações anatômicas (HIRATSUKA et al., 1997; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008). O comprometimento linfonodal tumoral consiste em um dos fatores de prognóstico desfavorável de quase todos os tipos de carcinomas (HIRATSUKA et al., 1997; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008; DAS; SKOBE, 2008).

Durante muitos anos acreditou-se que a metástase linfática era um processo passivo pelo qual as células malignas do tumor eram drenadas e atingiam os linfonodos via vasos linfáticos pré-existentes localizados nas proximidades do tumor primário (ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008; DAS; SKOBE, 2008; SIRIWARDENA et al., 2008). A parede delgada dos vasos linfáticos e sua membrana basal incompleta eram fatores que pareciam favorecer a entrada passiva das células tumorais no sistema linfático (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008; DAS; SKOBE, 2008).

Entretanto, estudos sobre o câncer em modelos animais, empregando fatores de crescimento linfangiogênicos e biomarcadores especificamente expressos no endotélio linfático, e não expressos no endotélio sangüíneo, modificaram este conceito, sugerindo que a linfangiogênese no interior ou na periferia dos tumores poderia ser induzida pelas células tumorais aumentando ou facilitando a disseminação metastática regional (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; BALUK; MCDONALD, 2008).

O fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C), uma glicoproteína da família VEGF, é considerado um dos principais indutores, nos tumores malignos sólidos, da angiogênese (atuando no receptor VEGFR-2) e da linfangiogênese, por meio da ligação com o receptor VEGFR-3 (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; NEUCHRIST et al., 2003; PEPER et al., 2003; HE; KARPANEN; ALITALO, 2004; BREEN, 2007; WARBURTON et al., 2007). O sistema molecular mais extensivamente estudado de sinalização da linfangiogênese tumoral associado com a disseminação linfática do tumor primário é a via de sinalização VEGF-C/VEGFR-3 (ACHEN; STACKER, 2006; ACHEN; STACKER, 2008). A Figura 1 ilustra esquematicamente as principais vias de metástases linfáticas e sangüíneas com participação do VEGF-C nos tumores malignos.

A expressão de VEGF-C pelas células malignas em modelos animais levaram a um aumento no número de vasos linfáticos na periferia e no interior do tumor primário, promovendo a disseminação destas células para os linfonodos e, em alguns modelos, facilitaram a ocorrência de metástase para órgãos distantes (ACHEN; STACKER, 2008; KOPFSTEIN et al., 2007; KARPANEN et al., 2001).

Em humanos, esta expressão nos tumores primários tem sido correlacionada com a densidade microvascular linfática peri e intratumoral e também com a ocorrência de metástases linfonodais em carcinomas espinocelulares, incluindo os de boca (SEDIVY et al., 2003; GOMBOS et al., 2005; LI et al., 2005).

Entre os marcadores específicos para identificação dos vasos linfáticos nos tumores sólidos destaca-se a podoplanina, uma glicoproteína transmembrana semelhante à mucina que não se expressa nas células epiteliais da mucosa bucal (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2005; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; YUAN et al., 2006; WICKI et al., 2006; OHNO et al., 2007; KAWAGUCHI et al., 2008).

O conhecimento da linfangiogênese, das vias de sinalização moleculares e dos fatores de crescimento que induzem e controlam este processo, como por exemplo, o VEGF-C, são essenciais para se restringir a disseminação metastática tumoral e tem se tornado alvos terapêuticos importantes no tratamento do câncer (JAIN; PADERA, 2002; STACKER; HUGHES; STACKER, 2004; ACHEN; STACKER, 2008). Alguns agentes terapêuticos potentes têm sido produzidos com base nestes sistemas moleculares de sinalização, alguns dos quais já foram aprovados para a utilização clínica, enquanto outros esperam experimentos clínicos visando estabelecer sua utilidade na terapêutica do câncer (ACHEN; STACKER, 2008).

Figura 1 - Representação esquemática das rotas potenciais de metástase via vasos linfáticos (amarelo), vasos sanguíneos (vermelho) e linfonodos. A linfangiogênese na região peritumoral do tumor primário (representada pelos vasos linfáticos ao redor do tumor) e a disseminação metastática das células tumorais podem ser promovidas por fatores de crescimento linfangiogênicos, como o VEGF-C e o VEGF-D, e algumas citocinas contribuem com a atração das células tumorais para os vasos linfáticos. Estes fatores podem ser secretados diretamente pelas células tumorais ou pelas células do estroma, como macrófagos. Os vasos linfáticos maiores parecem aumentar seu diâmetro, contribuindo para a disseminação das células tumorais. A presença de células tumorais nos linfonodos (representados pelos linfonodos extras) pode também induzir a linfangiogênese e outras alterações da morfologia e função dos vários tipos de vasos nos linfonodos permite uma reorganização local da estrutura vascular e conexões atípicas entre a rede vascular sanguínea e linfática. Essas alterações dos vasos podem ocorrer antes (devido a liberação de fatores solúveis) e após a chegada das células tumorais nos linfonodos, e isto, parece facilitar a disseminação neoplásica para órgãos à distância, como os pulmões, fígado, cérebro ou ossos. As células tumorais podem disseminar a partir dos linfonodos para órgãos distantes via vasos sanguíneos associados a estes ou pela entrada no sistema venoso via ductos linfáticos maiores (ducto torácico, por exemplo) e então dissemina via vasos sanguíneos. Alternativamente, células tumorais podem se disseminar diretamente a partir do tumor primário para órgãos distantes via vasos sanguíneos, um processo que pode ser facilitado pela angiogênese tumoral estimulada por fatores de crescimento como VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. (Adaptado de ACHEN; STACKER, 2008)

2.1 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR DO TIPO C (VEGF-C)

O VEGF-C é sintetizado como uma proteína que através de um processo proteolítico intrínseco origina a forma madura deste fator de crescimento. O gene do VEGF-C contém sete exons (CHILOV et al., 1997). No homem adulto, o coração, o ovário, a placenta, a musculatura esquelética e o intestino delgado contém altos níveis de mRNA de VEGF-C (JOUKOV et al., 1997). Em compensação, outros tecidos humanos como os rins, pulmões, pâncreas, próstata, fígado e testículos, produzem uma quantidade muito pequena deste fator de crescimento. Além disso, células mesenquimais de embrião de rato expressam VEGF-C, particularmente na região de disseminação dos vasos linfáticos a partir de veias embrionárias, que incluem as veias das regiões axilares, jugular, e urogenitais e do mesentério em desenvolvimento (KUKK et al., 1996).

Uma forma não processada de VEGF-C adere ao receptor VEGFR-3, o qual tem um importante papel durante a linfangiogênese (JOUKOV et al., 1997). A forma de VEGF-C processada por completo adere tanto ao receptor VEGFR-2 como ao VEGFR-3. Este fator de crescimento endotelial vascular participa na linfangiogênese durante a embriogênese e na manutenção do endotélio linfático em adultos (LYMBOUSSAKI et al., 1999).

Além disso, o VEGF-C é expresso por uma significativa fração de tumores humanos incluindo aqueles de pulmão, colo do útero, cólon, fígado, próstata (SU et al., 2006) e estômago (ROSKOSKI JR, 2007). Nas células epiteliais normais, este fator de crescimento (VEGF-C) não se expressa, entretanto, à medida que ocorre a transição entre as células epiteliais normais e os diferentes graus de displasia com evolução para células malignas, como as de um carcinoma invasivo, um significativo aumento da expressão de VEGF-C pode ser observado (JOHNSTONE; LOGAN, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado uma íntima associação entre a angiogênese e a progressão tumoral das neoplasias em estágio inicial até aquelas em estágio mais avançado, principalmente entre os carcinomas espinocelulares (JOHNSTONE; LOGAN, 2006) e a via VEGF-C/VEGFR-3 contribui com a evolução deste processo (SU et al., 2008). Estudo recente evidenciou que a via VEGF-C/VEGFR-3 aumenta a mobilidade da célula cancerosa e sua capacidade de invasão promovendo as metástases tumorais (BOCK et al., 2008; SU et al., 2006).

Particularmente nos carcinomas espinocelulares (CEC), a via VEGF-C/VEGFR-3 tem sido associada principalmente à formação de novos vasos linfáticos e à dilatação dos pré-existentes na região peri e intratumoral (PEPPER et al., 2003; HE; KARPANEN; ALITALO, 2004; SAHARINEN et al., 2004; AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; ACHEN; STACKER, 2006; SU et al., 2007).

A forte expressão de VEGF-C pelas células malignas dos carcinomas espinocelulares de boca vem sendo correlacionada com a ocorrência de metástases linfonodais e com um pior prognóstico para estes pacientes (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRIWARDENA et al., 2008).

2.2 EXPRESSÃO DE VEGF-C EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA

O significado clínico da expressão de VEGF-C em carcinomas espinocelulares de boca ainda não está completamente estabelecido. Embora diversos estudos *in vivo* e *in vitro* tenham correlacionado a forte expressão desta proteína nas células epiteliais malignas com a ocorrência de metástases linfonodais (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRIWARDENA et al., 2008), outros não conseguiram estabelecer esta mesma associação clínico-patológica (FAUSTINO 2007; MIYAHARA et al., 2007; WARBURTON et al., 2007).

No estudo de Kishimoto et al. (2003) a expressão de VEGF-C foi avaliada em 62 carcinomas espinocelulares de boca dos quais 38 tumores apresentavam estadiamento T1 e T2 e 24 tinham estádios T3 e T4. Nenhum dos 62 pacientes foi submetido à radioterapia ou quimioterapia pré-operatória. Os CEC de boca foram submetidos à técnica imuno-histoquímica para a detecção dos anticorpos anti-VEGF-C policlonal de coelho (103, Immuno-Biological Lab., Gumma, Japão) diluído a 1:100 e o anticorpo anti-CD31 monoclonal (JC/70A, Dako, Dinamarca) diluído a 1:200.. A expressão citoplasmática de VEGF-C foi definida como negativa quando nenhuma ou até 25% das células mostraram imunomarcção positiva e como positiva quando mais de 25% das células apresentaram imunomarcção positiva. Nos estádios T1 e T2 a forte expressão de VEGF-C mostrou correlação com as metástases linfonodais ($p < 0,001$), quinze (88,2%) dos 17 pacientes com

comprometimento histopatológico dos linfonodos regionais (pN+) apresentaram uma expressão positiva para o VEGF-C e uma porcentagem menor de 28,6% pacientes sem comprometimento cervical (pN-) também mostraram uma expressão positiva para o anticorpo avaliado. Entretanto, para os carcinomas espinocelulares em estádios avançados, T3 e T4, não houve correlação significativa entre a expressão de VEGF-C e a ocorrência de metástases em linfonodos regionais. A taxa de sobrevida específica por câncer foi menor para o grupo com expressão positiva de VEGF-C, entretanto o fator de prognóstico independente para a amostra estudada foi o comprometimento linfonodal regional. Estes resultados indicam que a expressão de VEGF-C em biópsias de carcinomas espinocelulares de boca pode ser utilizada como um fator preditivo de metástases linfonodais, particularmente em tumores de boca com estadiamentos precoces.

Também Sedivy et al (2003) associaram a expressão de VEGF-C em 28 pacientes com CEC de boca com as metástases linfonodais. Dezesete pacientes do total avaliado receberam radioterapia pós-operatória e um deles recebeu quimioterapia adjuvante. A amostra apresentava três carcinomas espinocelulares pT1, treze pT2, três pT3 e nove pT4, além disso, sete pacientes apresentaram comprometimento linfonodal metastático no momento da cirurgia (um paciente pN1, quatro pacientes pN2 e dois pacientes pN3). Quanto à localização, vinte tumores localizavam-se no assoalho de boca, cinco carcinomas espinocelulares manifestaram-se no processo alveolar e os outros três localizavam-se na mucosa jugal, na língua e nos pilares amigdalianos. Os CEC de boca foram submetidos a coloração imuno-histoquímica utilizando-se o anticorpo policlonal de coelho anti-VEGF-C (Zymed Laboratory Inc., São Francisco, EUA). A expressão de VEGF-C nos tumores foi calculada quantificando-se a porcentagem de células malignas com imunomarcção positiva em três campos microscópicos (aumento de 400X). Menos de 30% das células neoplásicas imunomarcadas foram consideradas como fraca, de 30 a 60% moderadas e mais de 60% forte. Após análise dos dados os autores verificaram que a forte expressão de VEGF-C pode ser associada com a ocorrência de metástases linfonodais e com a graduação histopatológica. Baseados nesses resultados os pesquisadores concluíram que a expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares de boca desencadeia a linfangiogênese, e pode resultar num maior risco de metástases em linfonodos cervicais. Sendo assim, eles sugeriram que biópsias imunomarcadas com VEGF-C poderiam auxiliar na adequada indicação de pacientes ao esvaziamento cervical.

No trabalho de López de Cicco et al. (2004), a expressão imuno-histoquímica de furina e VEGF-C foi avaliada, bem como a densidade microvascular em fragmentos de língua humana contendo epitélio normal, epitélio displásico e carcinoma espinocelular (CEC). Quarenta e seis pacientes portadores de carcinoma espinocelular de língua foram submetidos à excisão cirúrgica. Os espécimes tumorais apresentavam displasia epitelial e/ou carcinoma espinocelular invasivo, bem como epitélio adjacente à lesão com padrão de normalidade. De um grupo de 15 espécimes parafinados contendo epitélio normal, lesões precursoras e CEC invasivo, foram obtidos cortes microscópicos e após os procedimentos iniciais de rotina os anticorpos primários utilizados foram o policlonal anti-VEGF-C de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) na diluição de 1:100 e o monoclonal de camundongo anti-fator-VIII-*related antigen* (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Também foram analisados o padrão da expressão de furina e VEGF-C por meio de Western Blot em três linhagens celulares de CEC com diferentes graus de agressividade. As expressões de furina e de VEGF-C foram notadamente maiores na maioria de lesões precursoras e nos CEC do que nos epitélios normais. Aproximadamente 60% e 100% dos epitélios normais mostraram baixa intensidade de furina e de VEGF-C, respectivamente. Intensa imunomarcagem de furina e de VEGF-C foram detectadas em 80% e 100% de CEC, respectivamente. Os achados mostraram que há uma forte associação entre a progressão de carcinomas espinocelulares de língua em humanos, a expressão de furina, a expressão de VEGF-C e a neovascularização. Os autores sugerem que a furina pode promover angiogênese associada ao tumor através do aumento no processamento de VEGF-C.

Em 2004, Shintani et al. (2004) propuseram-se a explorar a função dos membros da família VEGF (A, B, C e D) em carcinomas espinocelulares de boca. Eles avaliaram a expressão destes fatores através da imuno-histoquímica, do RT-PCR e do Western Blot. Noventa e oito CEC de boca foram obtidos entre os anos de 1991 e 2001. Quinze pacientes apresentavam estágio clínico I, 29 estágio II, 28 estágio III e 26 estágio IV, de acordo com a classificação TNM. O grau de diferenciação tumoral foi determinado de acordo com o critério proposto pela OMS. O modo de invasão foi classificado de acordo com Anneroth; Batsakis e Lunba (1987). Os tecidos foram cortados com 4µm de espessura e após desparafinização, hidratação e bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: anti-CD31 humano monoclonal de rato diluído à 1:50; anti-VEGF -A, -B, -D policlonal de bode (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz – CA, EUA) diluídos à 1:100; e anti-VEGF-C monoclonal de camundongo (IBL, Gunma, Japão)

diluído à 1:50. Os tumores foram considerados positivos aos VEGF quando mais de 80% das células neoplásicas manifestaram positividade citoplasmática para os anticorpos utilizados. Todos os membros da família VEGF foram expressos em diferentes níveis nos CEC de boca. A análise imuno-histoquímica dos fatores de crescimento e da densidade microvascular revelaram uma correlação entre a expressão de VEGF-A e a de VEGF-B com a angiogênese tumoral. Embora a expressão de VEGF-A e de VEGF-B tenham sido detectadas tanto em linfonodos comprometidos quanto nos não comprometidos pelo CEC, as expressões de VEGF-C e VEGF-D foram detectadas mais freqüentemente nos linfonodos comprometidos pelo tumor. Estes achados sugerem uma possível correlação entre o nível da expressão de VEGF-C e/ou VEGF-D e o desenvolvimento de disseminação tumoral linfática. Os autores concluíram que o VEGF-A e o VEGF-B podem induzir a angiogênese tumoral nos carcinomas espinocelulares de boca e que o VEGF-C e o VEGF-D podem induzir a linfangiogênese e parecem ser novos fatores preditivos para metástase linfonodal.

Também em 2004, Tanigaki et al., (2004) investigaram por marcação imuno-histoquímica se as expressões de VEGF-A, de seu receptor *Flt-1*, de VEGF-C e de seu receptor *Flt-4* estavam associadas com metástase regional e à distância e com o prognóstico de pacientes portadores de carcinoma espinocelular de língua. Para o estudo os autores utilizaram 73 espécimes de língua que foram tratados entre os anos de 1992 e 2002, sendo 21 pacientes com estágio clínico I, 15 com estágio clínico II, 18 com estágio clínico III e 19 com estágio clínico IV. Quarenta e três pacientes eram N0, 11 N1 e 19 N2, de acordo com o sistema TNM definido pela UICC. Os casos de metástase à distância foram excluídos antes da terapia. Todos os espécimes eram de carcinomas espinocelulares que foram identificados histopatologicamente como: 47 bem diferenciados, 23 moderadamente diferenciados e 3 pouco diferenciados. Para a técnica imuno-histoquímica, foram utilizados cortes microscópicos de 4µm. Após a desparafinização, a hidratação e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizada a recuperação antigênica em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em microondas por 10 min. O bloqueio antigênico foi feito incubando os cortes com soro normal de bode e coelho a 10% por 15 min. Os cortes foram incubados com cada anticorpo primário (VEGF-A, VEGF-C, *Flt-1* e *Flt-4*) *overnight*, a 4°C. O VEGF-A foi usado à diluição de 1:200; o VEGF-C à diluição de 1:100; o *Flt-1* à diluição de 1:200; e o *Flt-4* à diluição de 1:200, utilizando sistema de amplificação de sinal catalizado. Os antígenos marcados foram visualizados com a reação de *diaminobenzine*. Os resultados foram classificados da seguinte maneira: a) 0-25% das células imunopositivas, imunomarcção negativa, e b) >25% das

células imunopositivas, imunomarcacão positiva. Após a análise estatística, a expressão de VEGF-A associou-se com metástase à distância e a de VEGF-C correlacionou-se com recorrência locorregional e à distância. Além disso, a expressão de VEGF-C foi associada com recidiva linfonodal nos pacientes N0. A análise multivariada revelou que a expressão de VEGF-C foi um fator independente que influenciou as metástases linfonodais. Com relação à taxa de sobrevida global de 5 anos, não houve significância entre esta e as expressões de VEGF-A, *Flt-1* e *Flt-4*, enquanto houve uma diferença significativa entre os casos de VEGF-C positivos e VEGF-C negativos. Além disso, houve uma diferença significativa entre as expressões positiva e negativa de ambos os fatores, VEGF-A e VEGF-C. Os autores concluíram que a expressão de VEGF-C correlacionou-se com metástase linfonodal regional e sugeriram que esta expressão pode ser um fator preditivo de recidiva linfonodal locorregional e de prognóstico em pacientes com carcinoma de língua.

Estudo recente de Siriwardena et al. (2008) avaliou a expressão de VEGF-C e sua correlação com o número de vasos linfáticos e invasão destes pelas células neoplásicas, invasão tumoral e ocorrência de metástases em 54 carcinomas espinocelulares de boca. Os vasos linfáticos peri e intra-tumorais foram examinados com a utilização do anticorpo D2-40, específico para podoplanina, e correlacionou com a expressão de VEGF-C e as características clínico-patológicas. Foram obtidos cortes de 4µm a partir de blocos de parafina que foram posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina para o exame do grau de malignidade, segundo Bryne et al. (1989), a partir do *front* de invasão tumoral. Para a análise imuno-histoquímica foi utilizado o sistema EnVision e os anticorpos D2-40 (Signet, Dedham, Massachusetts, EUA) diluído à 1:40 e anti-VEGF-C (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EUA) diluído à 1:25. A expressão de VEGF-C foi considerada como alta quando mais de 10% das células tumorais revelavam intensa ou difusa imunopositividade e como baixa quando 10% das células neoplásicas demonstravam imunopositividade fraca ou focal ou se ela estava ausente. Os resultados demonstraram que a alta expressão de VEGF-C foi freqüentemente observada nas células malignas do carcinoma espinocelular e foi associada com o aumento do número de vasos linfáticos e invasões linfáticas. A expressão de VEGF-C também pôde ser correlacionada com o padrão de invasão das células neoplásicas e com a ocorrência de metástases. Sendo assim, os autores reforçaram que o VEGF-C tem um importante papel na invasão tumoral, bem como na linfangiogênese podendo ser no futuro uma opção de intervenção terapêutica para prevenir as metástases nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca.

Curiosamente, quando os carcinomas de boca são avaliados em estágios precoces (estágio clínico T1 e T2), como nas investigações de Faustino (2007), Miyahara et al. (2007) e Warburton et al. (2007), a correlação entre a expressão de VEGF-C e as metástases linfonodais, principalmente as ocultas, não pôde ser estabelecida.

Miyahara et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de esclarecer o significado clínico e a influência no prognóstico da densidade dos vasos linfáticos e dos microvasos sanguíneos bem como a expressão imuno-histoquímica de VEGF-C em 110 CEC de boca visando elucidar a atividade linfangiogênica e angiogênica do VEGF-C nas células tumorais. Os resultados mostraram uma variação na expressão de VEGF-C entre as amostras de CEC de boca; porém, a maioria dos tumores mostrou pelo menos uma imunomarcacão focal, com exceção de um tumor sem qualquer marcação positiva. A expressão de VEGF-C pelas células tumorais não foi correlacionada com idade do paciente, gênero, local do tumor, classificação histológica, padrão de invasão, ou envolvimento linfonodal. A única exceção foi a correlação da expressão intensa de VEGF-C com tumores com estadiamento clínico mais avançado (T3 e T4) ($p=0,006$). Também não houve correlação entre expressão de VEGF-C e a densidade dos vasos linfáticos, densidade dos microvasos sanguíneos, receptores específicos *flt-4*, ou o índice mitótico de células malignas, como determinado de acordo com as porcentagens de Ki-67 - células positivas. Os autores concluíram que a linfangiogênese influenciou predominantemente a sobrevida livre de doença dos pacientes analisados. Estes resultados ainda sugeriram que a densidade dos vasos linfáticos poderia ser uma ferramenta de maior aplicabilidade do que a densidade dos microvasos sanguíneos e a expressão do VEGF-C nas estratégias terapêuticas em pacientes com CEC de boca.

Em outro estudo, Warburton et al. (2007) investigaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF-C, VEGF-D e VEGFR-3 em CEC de língua e assoalho bucal de pacientes, com estádios clínicos iniciais I e II, submetidos à remoção cirúrgica do tumor primário como único tratamento inicial. Os vinte e nove pacientes selecionados para a amostra não foram submetidos ao esvaziamento cervical eletivo ou à radioterapia. Cortes microscópicos de 5µm de espessura foram obtidos dos espécimes parafinados e após a desparafinização e hidratação foram submetidos à técnica imuno-histoquímica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-VEGF-C (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc-1881) diluído à 1:100, o anti-VEGFR-3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc-321) diluído à 1:1000 e o anti-VEGF-D (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc-7603) diluído à 1:100. A imunomarcacão foi classificada

pela porcentagem de células com expressão positiva para os anticorpos analisados de acordo com os escores: 0 (0-5% das células positivas), 1 (6-25% das células positivas), 2 (26-50% das células positivas) ou 3 (51-100% das células positivas). A intensidade da imunomarcção foi graduada como fraca, moderada ou forte. Nenhum dos parâmetros clínicos analisados mostrou correlação estatisticamente significativa com a ocorrência de metástase linfonodal regional. A maioria dos pacientes que apresentaram metástase regional cervical clinicamente detectada (87,5%) mostraram alguma expressão de VEGF-C e esta porcentagem foi maior do que a encontrada nos pacientes que não desenvolveram metástase linfonodal no pescoço (57,9%). Embora nenhum dos parâmetros estudados pelos autores tenham sido exclusivamente associados com metástase linfonodal, eles sugeriram que a espessura, o pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão, a queratinização, a expressão de VEGFR-3 e a expressão de VEGF-C em conjunto podem predizer o envolvimento linfonodal nos estádios iniciais do CEC de boca.

Também Faustino (2007) avaliaram a expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-VEGF-C, nas células malignas de pacientes com CEC de boca em estágios iniciais, correlacionando-a com a ocorrência de metástases ocultas nos linfonodos cervicais e com o prognóstico dos pacientes. Um total de 87 pacientes com CEC de língua e assoalho de boca, estadiamento clínico I e II, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, no período de 1968 a 2001, foram analisados quanto às características demográficas, clínicas, classificação pelo sistema TNM, tratamento e evolução clínica. Avaliou-se também os índices de malignidade tumoral histopatológico e a expressão imuno-histoquímica de VEGF-C foi comparada entre os CEC de boca sem (pN0) e com (pN+) comprometimento linfonodal (metástases ocultas). As probabilidades de sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer dos pacientes com CEC, acumuladas nos períodos de cinco e dez anos, em relação à expressão tumoral de VEGF-C, foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. De sessenta e quatro pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo, quatorze deles (21,9%) apresentaram comprometimento linfonodal cervical histopatológico (metástase oculta). De acordo com os resultados, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF-C e as principais variáveis demográficas, clínicas, microscópicas e o índice histopatológico de malignidade tumoral ($p=0,406$), bem como com relação a ocorrência de metástases ocultas nos linfonodos cervicais ($p=0,876$). O único fator prognóstico significativo para a sobrevida global ($p=0,030$) foi a ocorrência de metástase oculta comprovada por exame histopatológico. Dessa forma,

concluiu-se que a expressão imuno-histoquímica isolada de VEGF-C nas células malignas não influenciou a evolução clínica e o prognóstico dos pacientes com CEC de boca nos estádios iniciais (I e II).

A expressão de VEGF-C nos tumores malignos sólidos vem sendo associada à maior densidade de vasos linfáticos identificados com a utilização de marcadores específicos para o endotélio destes vasos destacando-se a podoplanina (GOMBOS et al., 2005). Entretanto, alguns pesquisadores observaram e descreveram a expressão desta proteína pelas células epiteliais dos tumores malignos sólidos sem discutir profundamente as razões desta imunomarcação (SCHACHT et al., 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2005; LONGATTO-FILHO et al., 2007).

2.3 PODOPLANINA – BIOMARCADOR ESPECÍFICO PARA VASOS LINFÁTICOS

A podoplanina é uma glicoproteína transmembrana de 38kDa constituída por 162 aminoácidos sendo nove destes de domínio intracelular (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; WICKI; CHRISTOFORI, 2007), que se expressa especificamente nas células endoteliais dos vasos linfáticos, e não nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Por isso, a podoplanina tem sido amplamente utilizada como um biomarcador para a linfangiogênese e para a identificação microscópica dos vasos linfáticos (AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2005; SCHACHT et al., 2005; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; WICKI et al., 2006; CIMPEAN et al., 2007; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; BALUK; MCDONALD, 2008; TERVALA; SUOMINEN; SAARISTO, 2008).

Além das células endoteliais linfáticas, a expressão de podoplanina normalmente ocorre nas células epiteliais do plexo coróide, nas células alveolares do tipo I, nos osteoblastos, nas células mesoteliais peritoneal (CIMPEAN et al., 2007), nos podócitos renais, no músculo esquelético, na placenta, no pulmão, no coração, nos miofibroblastos da mama e nas glândulas salivares (WICKI; CHRISTOFORI, 2007; BALUK; MCDONALD, 2008). Ocasionalmente, uma expressão focal de podoplanina pode ser vista nas áreas que circunscrevem a camada basal da epiderme humana (SCHACHT et al., 2005).

A função fisiológica da podoplanina ainda é desconhecida, bem como a sua contribuição na progressão tumoral. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que ratos com deficiência de podoplanina nascem mortos devido à insuficiência respiratória, exibindo

um fenótipo de vasos linfáticos dilatados e malformados, além de apresentarem linfoedema (WICKI et al., 2006). Alguns estudos ainda sugerem que a podoplanina pode desempenhar um importante papel na migração celular, na adesão celular e na formação do tubo neural (BALUK; MCDONALD, 2008; TERVALA; SUOMINEN; SAARISTO, 2008).

Existem diversas proteínas homólogas a podoplanina. Dentre estas destaca-se a proteína D2-40, um anticorpo que detecta o epitopo de fixação na podoplanina (DUMOFF et al., 2006; SCHACHT et al., 2005; MARKS et al., 1999), e tem sido muito utilizado para marcação específica do endotélio linfático no estudo da densidade microvascular dos tumores sólidos malignos (DUMOFF et al., 2006; DUMOFF et al., 2005; GOMBOS et al., 2005; SCHACHT et al., 2005; FRANCHI et al., 2004; KAHN; MARKS, 2002).

Além da expressão de podoplanina em tecidos normais, sua expressão foi demonstrada nos vasos linfáticos peritumorais e nas células neoplásicas de tumores malignos em humanos (MARTIN-VILLAR et al., 2005; SHAYAN; ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; YUAN et al., 2006; WICKI et al., 2006; OHNO et al., 2007; WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

2.4 EXPRESSÃO DE PODOPLANINA EM TUMORES MALIGNOS

Alguns autores observaram uma alta expressão de podoplanina em diferentes tumores malignos como nos tumores do ovário e nos tumores de células granulares, no mesotelioma, e em diversos tumores do sistema nervoso central (KATO et al., 2005; KIMURA; KIMURA, 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2005; SCHACHT et al., 2005; SHIBAHARA et al., 2006; WICKI et al., 2006; BALUK; MCDONALD, 2008), e esta imunomarcação auxilia no diagnóstico destas neoplasias (CIMPEAN et al., 2007). Por outro lado, a expressão de podoplanina não tem sido encontrada na maioria dos adenocarcinomas, incluindo os de pulmão, do cólon e da próstata (WICKI; CHRISTOFORI, 2007). O papel exato e importância clínica da expressão de podoplanina nestes tumores não estão totalmente esclarecida.

Recentemente, algumas pesquisas *in vivo* e *in vitro* sugeriram que a podoplanina é uma molécula importante no processo de invasão e migração coletiva das células neoplásicas (WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007). Estes processos são promovidos pela perda da interação das moléculas de adesão com o citoesqueleto, após as alterações nas atividades das pequenas GTPases da família *Rho*, um grupo de proteínas que também

controlam o crescimento celular, morfogênese, motilidade celular e citocinese (WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

O processo de invasão das células neoplásicas nos tecidos adjacentes ao tumor ocorre basicamente por dois padrões distintos: o de invasão de células coletivas e o de células isoladas. Quando se tem a invasão com padrão de células neoplásicas isoladas geralmente as alterações da expressão e da função das moléculas de adesão, como as caderinas, são mais dramáticas. Estas alterações são remanescentes do processo de desenvolvimento embrionário, particularmente relacionados à neurulação, em que as células epiteliais (ou ectodérmicas) adquirem um fenótipo migratório e mesenquimal. Durante este processo, também chamado de transição epitelial-mesenquimal, as células epiteliais perdem seus marcadores, como a E-caderina, e passam a expressar marcadores mesenquimais, como a N-caderina, a vimentina e, recentemente sugerida, a podoplanina (WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

O papel exato da transição epitelial-mesenquimal na progressão tumoral ainda está em debate, mas esta transição parece ser particularmente importante em neoplasias com padrão de invasão de células isoladas e na disseminação precoce das células tumorais (THIERY, 2002; GRUNERT; JECHLINGER; BEUG, 2003). Entretanto, o padrão coletivo de invasão pelas células neoplásicas nos tecidos vizinhos ainda é pouco compreendido. Estas ilhotas de células neoplásicas mantêm a expressão de suas moléculas de adesão, mas podem, no entanto, invadir o tecido adjacente e assim destruir todo o órgão atingido (WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

A expressão de podoplanina tem sido descrita geralmente na camada periférica das ilhotas epiteliais na região do *front* de invasão tumoral (WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007) dos carcinomas espinocelulares de boca (MARTIN-VILLAR et al., 2005), de laringe, de pulmão (KATO et al., 2005), de colo de útero (DUMOFF et al., 2006), de esôfago e de pele (SCHACHT et al., 2005; BALUK; MCDONALD, 2008). A presença restrita da podoplanina nas células do *front* de invasão tumoral carcinoma espinocelular levanta a questão se os tecidos adjacentes ao tumor estariam influenciando a expressão desta proteína. Alguns fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) e os fatores de necrose tumoral podem induzir a expressão de podoplanina nos tumores (SCHOLL et al, 1999; WICKI et al, 2006). No entanto, o mecanismo exato de regulação da podoplanina ainda precisa ser elucidado (WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

Com relação ao câncer de pele, o estudo realizado por SCHACHT et al. (2005) revelou que dos 28 tumores de sua amostra, aproximadamente 79% deles apresentaram

expressão de podoplanina. Os pesquisadores observaram que carcinomas bem diferenciados não apresentavam expressão de podoplanina enquanto que naqueles tumores moderadamente diferenciados, a expressão desta proteína estava presente exclusivamente no *front* de invasão tumoral. Os carcinomas indiferenciados de pele apresentaram expressão citoplasmática de podoplanina pelas células da camada suprabasal.

A investigação da expressão de podoplanina em 136 carcinomas espinocelulares de pulmão realizada por Ito et al (2008) mostrou que a fraca expressão desta proteína estava associada com um pior prognóstico para os pacientes. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores de prognóstico clinico-patológicos e biológicos para pacientes submetidos ao tratamento de carcinomas espinocelulares de pulmão. Nos cortes microscópicos dos tumores obtidos foram realizadas as colorações histoquímicas de HE, PAS e van Gieson. Os dados clínicos foram extraídos dos prontuários dos pacientes. Vinte e quatro marcadores moleculares foram empregados nas áreas mais representativas dos tumores obtidas por *tissue microarrays*, sendo a podoplanina um deles. A expressão de podoplanina foi considerada positiva em 51% dos tumores analisados e observada predominantemente nas camadas periféricas dos cordões de células neoplásicas. A avaliação da relação entre a forte expressão de podoplanina com as características clinico-patológicas revelou uma significância estatística nos espécimes que apresentaram tumores pouco diferenciados no grupo considerado podoplanina negativa ($p=0,045$). De acordo com a análise univariada, os pacientes com tumores podoplanina negativo tiveram uma menor sobrevida global ($p=0,010$) e uma menor sobrevida livre de doença ($p=0,030$) quando comparado com aqueles pacientes com tumores podoplanina positivo. Os autores concluíram que a podoplanina foi o único marcador biológico, dos que foram utilizados neste estudo, capaz de predizer um pior prognóstico para os pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pulmão.

O significado da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células neoplásicas tem sido pouco investigado na literatura, entretanto é possível observarmos, mesmo subjetivamente, em algumas publicações (MIYAHARA et al., 2007; MUNOZ-GUERRA et al., 2004; OHNO et al., 2007; SIRIWARDENA et al., 2008), a imunomarcagem positiva de podoplanina nas fotomicrografias dos carcinomas espinocelulares de boca

Dois padrões distintos de expressão de podoplanina foram descritos por Yuan et al. (2006) em carcinomas espinocelulares primários de cabeça e pescoço: a) uma expressão difusa pela maioria das células tumorais e b) uma expressão focal restrita à periferia proliferativa dos cordões de células neoplásicas, com ausência desta expressão nas áreas

centrais destes cordões. No epitélio escamoso adjacente aos carcinomas espinocelulares, da região de cabeça e pescoço, incluindo a boca, a expressão de podoplanina está ausente ou se apresenta extremamente fraca e restrita à camada basal do epitélio. Porém, em algumas áreas de hiperplasias e displasias epiteliais adjacentes a estes tumores, uma maior expressão de podoplanina pelas células da camada basal pode ser observada.

Neste estudo de Yuan et al. (2006), dois grupos distintos de pacientes com carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço foram investigados, sendo o primeiro grupo composto por 35 carcinomas espinocelulares, 16 de boca e 19 de hipofaringe, com estadió clínico avançado III ou IV e o segundo grupo composto por 60 pacientes com carcinomas espinocelulares de língua com estadió clínico de I a IV. Os pesquisadores utilizaram a técnica imuno-histoquímica do complexo avidina-biotina-peroxidase para determinar a expressão do anticorpo monoclonal D2-40 diluído à 1:100, específico para podoplanina, nas células neoplásicas associando-a com as características clínicas, patológicas e com a sobrevida dos pacientes. A avaliação da expressão de podoplanina foi realizada por meio de método semi-quantitativo de escores nas áreas representativas de cada tumor que foram selecionadas e avaliadas, independentemente, por dois investigadores sem o conhecimento prévio das informações clínicas pertencentes a cada paciente. A marcação citoplasmática e/ou membranosa foi considerada como indicador positivo de podoplanina. Um valor entre 0 e 5 foi atribuído como um escore individual que representava, respectivamente, 0%, 1-10%, 11-30%, 31-50%, 51-80%, e 81-100% das células positivas. A intensidade da marcação também foi considerada, sendo atribuído valores de 0 a 3 para indicar, respectivamente nenhuma, fraca, moderada, e forte expressão de podoplanina. O número bruto obtido a partir da multiplicação da quantidade pela intensidade de expressão da proteína pelas células neoplásicas foi convertido pelo Sistema Alemão de Imunoreatividade (IRS). Desta forma, os escores variaram entre 0 e 15, sendo considerado uma alta reatividade ao anticorpo os escores com valor igual ou superior a 8. No primeiro grupo de pacientes, mais da metade dos tumores (57%) apresentaram uma forte expressão de podoplanina sendo mais freqüente nos pacientes com metástases linfonodais. O segundo grupo apresentou resultados semelhantes ao primeiro grupo, com forte expressão de podoplanina em 60% dos tumores e uma associação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre esta expressão e a ocorrência de metástases linfonodais. Além disso, os pacientes que apresentaram uma forte expressão de podoplanina pelas células neoplásicas tiveram uma menor sobrevida específica por câncer ($p < 0,001$). A observação da forte expressão de podoplanina pelas células hiperplásicas e displásicas

adjacentes às áreas dos tumores primários sugerem que ela ocorre precocemente na tumorigênese da região de cabeça e pescoço. Segundo os autores, mais estudos devem ser realizados para determinar o verdadeiro papel da podoplanina na iniciação e progressão dos tumores da região de cabeça e pescoço.

Outro estudo interessante foi realizado por Kawaguchi et al. (2008) visando determinar o papel da expressão de podoplanina como fator preditivo no desenvolvimento de tumores malignos em pacientes com lesões cancerizáveis bucais. Foram avaliados 150 pacientes com leucoplasia, clinicamente tratados ou em tratamento com ácido retinóico ou beta-caroteno mais retinil palmitato com acompanhamento clínico médio de 7 anos e meio. A expressão de podoplanina foi associada com as características clinico-patológicas, incluindo o desenvolvimento de tumores malignos durante o período de acompanhamento dos pacientes neste estudo. A avaliação da imunomarcagem da membrana celular pela podoplanina foi considerada: 0 - ausência de expressão em qualquer parte do epitélio, 1 - expressão restrita à camada basal do epitélio, 2 - expressão nas camadas basal e suprabasal em uma única área, 3 - expressão na camada suprabasal em duas ou três áreas do corte microscópico, e 4 - expressão na camada suprabasal em mais de três áreas. Entre os 150 pacientes com leucoplasias, 42 (28%) não demonstraram expressão de podoplanina pelas células epiteliais, 52 (35%) demonstraram expressão de podoplanina restrita à camada basal do epitélio, 22 (15%) mostraram expressão pelas células das camadas basal e suprabasal em pelo menos uma área da lesão, 26 (17%) mostraram expressão de podoplanina se estendendo pela camada suprabasal entre duas e três áreas, e 8 (5%) demonstraram expressão de podoplanina por mais de três áreas de células epiteliais da camada suprabasal. Na análise multivariada utilizando a podoplanina e o padrão histológico como co-fatores, a podoplanina foi o único fator independente para o desenvolvimento de câncer de boca. Foi demonstrado que quanto maior a expressão de podoplanina pelas células epiteliais, maior era o risco de desenvolvimento de câncer, particularmente nos 3 primeiros anos de preservação ($p=0,007$). Os 35 pacientes que vieram a desenvolver lesões malignas, apresentaram forte expressão de podoplanina pelas células epiteliais nas lesões cancerizáveis. Os autores observaram que a frequência da expressão de podoplanina aumentava com a intensidade da displasia, principalmente na evolução da displasia leve para moderada ou severa/carcinoma *in situ*. Verificaram também, que os pacientes com leucoplasia e forte expressão de podoplanina tiveram uma maior incidência de carcinoma espinocelular de boca quando comparados com aqueles com leucoplasia e ausência de podoplanina nas células epiteliais. Estes resultados permitiram

concluir que a podoplanina associada aos padrões histológicos, constitui um importante marcador biológico a ser utilizado para determinar a evolução da leucoplasia para o câncer de boca.

Apenas estes dois últimos estudos foram realizados com o objetivo de se conhecer o significado clínico da expressão de podoplanina pelas células neoplásicas do carcinoma espinocelular. Quanto à expressão desta glicoproteína transmembrana em carcinomas espinocelulares com baixo potencial metastático, como o carcinoma verrucoso, nenhum trabalho foi encontrado na literatura científica. A investigação do significado clínico da podoplanina pelas células epiteliais neoplásicas do câncer de boca, como proposto no presente estudo, contribuirá para o entendimento das vias de propagação e metástases das neoplasias malignas humanas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- 1) Com base na análise de 42 carcinomas espinocelulares de boca bem diferenciados com e sem comprometimento linfonodal, propôs-se:
 - verificar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C) e da podoplanina nas células malignas na região do *front* de invasão tumoral;
 - associar a expressão de VEGF-C e da podoplanina com a evolução e o prognóstico dos pacientes.
- 2) Contribuir com o conhecimento no que se refere ao significado clínico do VEGF-C e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca com baixo potencial metastático.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca, submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, Brasil, no período de 1980 a 2000. Todos os prontuários de pacientes com diagnóstico inicial de carcinoma verrucoso e de carcinoma espinocelular bem diferenciado foram analisados. Esta amostra foi previamente estudada por Moraes (2005).

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados:

- 1) pacientes com tumor primário com o diagnóstico de carcinoma verrucoso e/ou carcinoma espinocelular bem diferenciado confirmado por biópsia e localizado em qualquer região da boca (lábio, língua, mucosa jugal, assoalho, palato, gengivas e área retromolar);
- 2) pacientes que não foram submetidos a tratamento prévio;
- 3) seguimento clínico completo;
- 4) disponibilidade dos blocos de parafina dos referidos tumores, bem como a adequada conservação dos espécimes;
- 5) disponibilidade de fragmentos representativos das neoplasias.

Os critérios de exclusão foram:

- 1) contra-indicação para a cirurgia;
- 2) presença de metástases à distância no momento da admissão no hospital;
- 3) presença de outros tumores primários simultâneos.

Para a análise demográfica, clínica, de tratamento e evolução, os pacientes com carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não de comprometimento linfonodal:

- **CECpN0:** Carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca sem comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente;
- **CECpN+:** Carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca com comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente.

4.2 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações referentes aos pacientes foram obtidas a partir do banco de dados pertencente ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo e registradas em formulário próprio (Apêndice A). Estes registros incluíram a identificação e os dados demográficos dos pacientes, informações relativas à história clínica, ao exame locorregional, cirurgia, radioterapia pós-operatória, microscopia da peça cirúrgica inicial e evolução do paciente (ocorrência ou não de recidiva local, cervical, de metástase à distância e de segundo tumor primário). No caso dos pacientes vivos, a evolução clínica foi atualizada até o ano de 2007 por meio de consulta aos respectivos prontuários arquivados no SAME.

Realizou-se a análise morfológica qualitativa dos espécimes selecionados em cortes microscópicos de 3µm de espessura obtidos a partir das peças cirúrgicas incluídas em parafina dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Estes cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do referido hospital.

A confirmação do padrão tumoral com base na morfologia foi realizada individualmente por dois examinadores (ASA, DTO) utilizando-se de um microscópio óptico binocular, modelo Axiokop 2 Plus (ZEISS, Jena, Alemanha), sendo os pontos de discordância entre estes reavaliados e estabelecidos por um consenso. Utilizou-se um corte representativo do tumor primário de cada espécime, analisando-se todo o fragmento neoplásico presente na lâmina, para a determinação das características microscópicas relativas ao padrão de configuração e morfologia tumoral.

4.3 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis analisadas neste estudo referem-se aos dados demográficos relativos aos pacientes como a idade, o gênero (masculino ou feminino) e a cor (branca ou não branca).

Quanto à história clínica dos pacientes, pesquisou-se o tempo de história (em meses); o tabagismo (não fumante ou fumante) e o etilismo (não etilista ou etilista). Analisaram-se

também as queixas do paciente, se referentes ao tumor primário, às metástases regionais ou a ambos.

No exame locorregional, a localização do tumor primário foi registrada como: 1- lábio superior; 2- lábio inferior; 3- língua; 4- assoalho bucal; 5- gengiva superior; 6- palato duro; 7- palato mole; 8- gengiva inferior e 9- mucosa jugal.

As lesões foram descritas quanto a: extensão do tumor para outros sítios anatômicos; tipo da lesão (1- ulcero-vegetante; 2- ulcero-infiltrativa ou 3- outra) e diâmetro aproximado da lesão (em centímetros).

A classificação clínica adotada pelo Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo segue o sistema TNM/UICC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) e, portanto, os pacientes do estudo foram classificados pelo estágio clínico em I (T1N0M0), II (T2N0M0), III (T3N0M0 / T1N+M0 / T2N+M0 / T3N+M0) ou IV (T4N0M0 / T4N+M0).

Quanto ao tratamento, registrou-se a data da cirurgia, a realização ou não de esvaziamento cervical (ipsilateral ou ipsilateral e contralateral simultâneos), a data da alta hospitalar, bem como os dados referentes à radioterapia pós-operatória e as datas de início e término do tratamento radioterápico nos pacientes em que se fez necessário.

O diagnóstico do tumor primário, referente ao laudo anatomopatológico (CEC I, CEC II, CEC III ou CEC SOE), serviu de base para o início da análise microscópica da peça cirúrgica.

A queratinização, o pleomorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e o infiltrado inflamatório foram graduados de 1 a 4, de acordo com o índice de graduação da malignidade de Bryne et al. (1989) (Tabela 1).

A embolização vascular angiolinfática, a infiltração perineural, a infiltração muscular e a infiltração de glândulas salivares foram classificadas como ausentes ou presentes.

Informações sobre as margens cirúrgicas (0- livres; 1- presente; 2- comprometidas; 9- ignorado) e o número de linfonodos comprometidos e dissecados foram obtidos do laudo anatomopatológico da peça cirúrgica inicial. O comprometimento linfonodal cervical histopatológico (pN) foi registrado como negativo (pN0) ou positivo (pN+).

Quanto à evolução dos pacientes, registrou-se a ocorrência ou não de recidiva local, de metástase regional, de metástase à distância e de segundo tumor primário.

Com o objetivo de caracterização da amostra, registraram-se também a data da primeira recidiva, os locais de recidiva (0- não teve; 1- local; 2- pescoço ipsilateral; 3- pescoço contralateral; 4- pulmão; 5- osso; 6- fígado; 7- outro à distância ou 8- recidiva em local ignorado), assim como a data do diagnóstico e o local do segundo tumor primário.

Foi registrada a data da última informação de seguimento e a situação do paciente: 1- vivo sem evidência da doença (000); 2- vivo com câncer; 3- morte por intercorrência cirúrgica (MOCI); 4- morte decorrente do câncer (MOCA); 5- morte por outras causas não relacionadas ao câncer (MOASS) e 6- perdido de vista. Pacientes perdidos de vista eram considerados aqueles com menos de cinco anos de seguimento. Pacientes assintomáticos perdidos de vista após cinco anos foram classificados como vivos livre da doença. Os prontuários dos pacientes perdidos de vista foram encaminhados aos responsáveis pela convocação destes pacientes e as respostas obtidas foram posteriormente conferidas.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.4.1 Graduação da Malignidade Tumoral

A graduação da malignidade tumoral foi realizada utilizando-se o índice histopatológico de malignidade proposto por Bryne et al. (1989), que se baseia na análise de características morfológicas apresentadas pelas células na região do *front* de invasão tumoral, a porção mais invasiva visualizada no corte microscópico analisado.

Para a análise microscópica, a área do *front* de invasão tumoral de cada espécime foi percorrida e analisada por dois examinadores (ASA e DTO), sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes e/ou do grupo tumoral, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha), contendo uma objetiva de 40X.

Cortes microscópicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir das peças cirúrgicas do tumor primário, que estavam arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) e, posteriormente, analisados quanto à graduação da malignidade nas áreas mais invasivas, de acordo com o escore de malignidade de Bryne et al. (1989); apresentado na Tabela 1.

Para cada carcinoma espinocelular de boca o componente individual do sistema de graduação foi analisado e, posteriormente, somado em um escore final de malignidade, que variou de 5 a 20 pontos. Os espécimes tumorais foram então classificados como pouco agressivos (escore final entre 5 e 9) ou muito agressivos (escore final entre 10 e 20).

Tabela 1 - Graduação de malignidade do *front* de invasão tumoral, segundo Bryne et al. (1989).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	ESCORES DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Queratinização	Intensa (>50% das células)	Moderada (21-50% das células)	Baixa (6-20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Discreto (>75% das células maduras)	Moderado (51-75% das células maduras)	Intenso (26-50% das células maduras)	Extremo (0-25% das células maduras)
Número de mitoses	0 a 1	2 a 3	4 a 5	>5
Padrão de invasão	Compressivo e com bordas bem definidas	Cordões sólidos e grossos de células tumorais	Cordões finos de células tumorais	Células tumorais isoladas ou dissociadas em pequenos grupos
Resposta do hospedeiro	Intensa	Moderada	Leve	Ausente

4.4.2 Técnica Imuno-Histoquímica

A marcação imuno-histoquímica dos carcinomas espinocelulares de boca pelo anticorpo anti-VEGF-C seguiu a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, previamente padronizada por Faustino (2007), enquanto que a marcação destes tumores pelo anticorpo anti-podoplanina seguiu a técnica de polimerização controlada para preparação de conjugados de anticorpos poliméricos de ligação HRP (*horseradish peroxidase*), proposta por Shi et al. (1999). Ambas as reações foram realizadas de acordo com o protocolo de reações imuno-histoquímicas do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, São Paulo-SP, conforme a Tabela 2.

Entre cada uma das etapas do protocolo de reações imuno-histoquímicas, as lâminas que continham os cortes microscópicos dos tumores foram lavadas com tampão PBS com três trocas de três minutos cada.

A contra-coloração dos espécimes foi realizada com Hematoxilina de Harris e as lâminas foram montadas com resina adesiva *Entellan Neu* (Merck, 1.07961, Alemanha) e lamínulas.

Um controle positivo e um controle negativo foram incluídos em cada série de colorações imuno-histoquímicas. Foi utilizado como controle positivo um espécime de placenta humana e como controle negativo um corte do mesmo tecido com a omissão do anticorpo primário.

Para o anticorpo anti-VEGF-C, a presença de mucosa bucal com padrão de normalidade nas margens cirúrgicas dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca foi utilizada como controle imuno-histoquímico interno.

A expressão do anticorpo anti-podoplanina nas células endoteliais dos vasos linfáticos foi utilizada como controle interno para este anticorpo nas amostras tumorais.

Tabela 2 - Protocolo de reações imuno-histoquímicas realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP.

ETAPAS	VEGF-C	PODOPLANINA
Recuperação Antigênica	<ul style="list-style-type: none"> Solução tampão citrato a 10mM e pH 6,0 Panela de pressão: 4min 	<ul style="list-style-type: none"> Solução tampão citrato a 10mM e pH 6,0 Panela de pressão: 4min
Bloqueio da Peroxidase Endógena	<ul style="list-style-type: none"> H₂O₂ a 3% 4 trocas de 5min 	<ul style="list-style-type: none"> H₂O₂ a 3% 4 trocas de 5min
Anticorpos Primários	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo policlonal de bode anti-VEGF-C (Santa Cruz Biotechnology, sc-1881, Santa Cruz, CA, EUA), Diluição: 1:100 Incubação: 18h a 4°C em câmara úmida 	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo anti-podoplanina (Acris Antibodies, cod# DM3500, Hiddenhausen, Alemanha), Diluição: 1:200 Incubação: 18h a 4°C em câmara úmida
Anticorpo Secundário	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo biotilado (<i>Biotinylated anti-goat Ig (HTL) made in rabbit</i>, Vector BA-5000, Burlingame, CA, EUA), Diluição: 1:500, Incubação: 30min a 37°C <i>StreptABCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit)</i> (Dako A/S, K0492, Dinamarca), Diluição: 1:200, Incubação: 30min a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo pós-primário Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod# RE7260-k, Reino Unido), Incubação: 30min a 37°C Polímero NovoLink Polymer (NovoLink Max Polymer cod# RE7260-k, Reino Unido), Incubação: 30min a 37°C
Revelação do Complexo Ag/Ac	<ul style="list-style-type: none"> Solução substrato: 3,3' <i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i> (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido; 1mL de H₂O₂ a 6% 	<ul style="list-style-type: none"> Solução substrato: 3,3' <i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i> (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido 1mL de H₂O₂ a 6%

4.4.3 Avaliação Imuno-Histoquímica

A expressão dos anticorpos anti-VEGF-C e anti-podoplanina nos espécimes de carcinomas espinocelulares bem diferenciados foi avaliada individualmente por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens na região do *front* de invasão tumoral. Aproximadamente 30 campos microscópicos para o anticorpo anti-VEGF-C e 20 campos microscópicos para o anticorpo anti-podoplanina, para cada espécime tumoral (42 CEC), foram adquiridos a partir de uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.5, ZEISS, Jena, Alemanha). Cada campo microscópico capturado pelo programa correspondia a uma área de $93.992,05\mu\text{m}^2$. A área percorrida na porção mais invasiva de cada espécime tumoral está discriminada no Apêndice B.

O número de campos microscópicos por carcinoma espinocelular variou de 16 a 32 para o anticorpo anti-VEGF-C, e de 9 a 26 campos para o anticorpo anti-podoplanina. Estes campos microscópicos foram obtidos sequencialmente na região do *front* de invasão tumoral, tomando-se o cuidado de não deixar nenhuma célula repetida por campo.

Cada campo microscópico capturado foi previamente padronizado no programa para microcomputador Axiovision 4.5 (ZEISS, Jena, Alemanha) a fim de evitar diferenças na intensidade da expressão dos anticorpos anti-VEGF-C e anti-podoplanina.

A expressão imuno-histoquímica do VEGF-C e da podoplanina pelas células epiteliais malignas, foi avaliada por método semi-quantitativo de escores, baseado na soma da proporção e da intensidade das células tumorais com imunomarcagem positiva, conforme previamente descrito por Soini et al. (2001).

Para cada campo microscópico adquirido, a porcentagem de células com imunomarcagem positiva foi avaliada e classificada em um dos cinco escores abaixo:

- 0 = ausência de células tumorais imunopositivas
- 1 = menos de 25% de células tumorais imunopositivas
- 2 = 26 a 50% de células tumorais imunopositivas
- 3 = 51 a 75% de células tumorais imunopositivas
- 4 = mais de 75% de células tumorais imunopositivas

Posteriormente, a intensidade da imunomarcção foi avaliada e classificada em um dos cinco escores abaixo:

- 0 = ausência de imunomarcção
- 1 = imunomarcção fraca
- 2 = imunomarcção moderada
- 3 = imunomarcção forte
- 4 = imunomarcção intensa

Por fim, a soma dos escores, baseada na extenso e na intensidade, foi classificada em trs grupos:

- 0 (Escore 0) = ausência de imunomarcção
- 1 (Escore de 1 a 4) = imunomarcção fraca
- 2 (Escore de 5 a 8) = imunomarcção forte

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os registros das informaes clnicas e microscópicas dos pacientes com carcinomas espinocelulares bem diferenciados e os dados relativos à expresso imuno-histoquímica do anticorpo anti-VEGF-C e do anticorpo anti-podoplanina nos dois grupos de carcinomas analisados (CECpN0 e CECpN+) foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS *for Windows*, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Para a verificao das medias de idade, do tempo de história clínica e dos intervalos de sobrevida global, especifica por cncer e livre de doena utilizou-se o teste *t* de Student.

A comparao entre as variáveis demográficas, clnicas e microscópicas nos dois grupos de carcinomas espinocelulares (CECpN0 e CECpN+) e a associao destas variáveis com a expresso imuno-histoquímica do VEGF-C e da podoplanina pelas células malignas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para a análise da sobrevida global utilizou-se o tempo de seguimento, em meses, entre a data da cirurgia do tumor primário e o óbito do paciente, independente da causa da morte, ou a data da última informao objetiva do seguimento.

Quanto à sobrevida livre de doença considerou-se para sua análise o tempo em meses transcorrido entre a data da remoção cirúrgica do tumor primário e o aparecimento de recidiva tumoral (local, regional ou à distância) ou até a data da última informação objetiva registrada no prontuário médico.

O tempo decorrido, em meses, entre a cirurgia do tumor primário e o óbito em decorrência específica deste tumor foi utilizado para a análise da sobrevida específica por câncer. Para os casos censurados considerou-se a data da última informação objetiva de seguimento.

Para as análises de sobrevida global, livre de doença e específica por câncer foram considerados “não censurados” os pacientes que não apresentaram um evento de interesse (óbito para sobrevida global, recorrência do tumor primário para a sobrevida livre de doença e óbito pelo tumor primário para a sobrevida específica por câncer). Os casos considerados “censurados” foram aqueles em que até a data da última informação objetiva de seguimento não ocorreu nenhum evento de interesse.

As análises das sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer foram feitas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo teste *log-rank*, com o nível de significância igual a 5%.

4.6 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.5, ZEISS, Jena, Alemanha), utilizado para a avaliação imuno-histoquímica.

4.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo – SP, Brasil, em reunião do dia 11 de dezembro de 2007, sob o número 1022/07 (Anexo A).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Após a realização de um levantamento de carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca a partir do banco de dados do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia e do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, no período de 1980 a 2000, foram aplicados os critérios de inclusão do presente estudo e selecionados 42 pacientes com carcinomas espinocelulares primários localizados em língua, soalho bucal, gengiva superior e inferior, área retromolar, palato mole e palato duro, mucosa jugal, lábio superior e inferior. Foram incluídos neste estudo oito carcinomas verrucosos e 34 carcinomas espinocelulares convencionais conforme a Tabela 3.

Para caracterização demográfica, clínica e microscópica, os carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca foram divididos em dois grupos de acordo com a ocorrência ou não de comprometimento linfonodal, confirmado pela histopatologia (pN). Portanto, nossa amostra foi constituída de 25 carcinomas espinocelulares de boca sem comprometimento linfonodal (CECpN0); e 17 com comprometimento linfonodal, (CECpN+).

Tabela 3 - Distribuição dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca quanto aos critérios de inclusão estabelecidos. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

GRUPO	Nº	%
Carcinoma verrucoso	8	19,0
Carcinoma espinocelular convencional	34	81,0
TOTAL	42	100,0

5.2 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A análise dos 42 carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca revelou um predomínio de pacientes do gênero masculino e de cor branca, para ambos os grupos CECpN0 e CECpN+ (Tabela 4).

A idade mínima observada entre os pacientes do grupo CECpN0 foi de 28 anos e a máxima foi de 83 anos. No grupo CECpN+, a idade mínima observada foi de 35 anos e a máxima foi de 73 anos (Tabela 4).

O tabagismo e o etilismo foram fatores de risco para o carcinoma espinocelular freqüentemente observados na maioria dos pacientes deste estudo conforme descrito na Tabela 4.

Na amostra estudada, a localização anatômica mais freqüente no grupo CECpN0 foi a gengiva (36,0%), seguida pelo lábio inferior (16,0%), palato duro (16,0%) e mucosa jugal (16,0%). No grupo CECpN+, o local mais comumente acometido foi o assoalho bucal (58,6%) como pode ser visualizado na Tabela 4.

Clinicamente, 68,0% dos tumores do grupo CECpN0 apresentavam aspecto úlcero-vegetante, enquanto que no grupo CECpN+ as lesões ficaram igualmente distribuídas (47,1%) entre os aspectos úlcero-vegetante e úlcero-infiltrativo (Tabela 4).

Não foram realizadas biópsias em lesões prévias a ocorrência do carcinoma espinocelular de boca na grande maioria dos pacientes incluídos nesta análise (Tabela 4).

Quanto ao tamanho dos tumores no momento do diagnóstico, de acordo com os critérios de estadiamento clínico definidos pela UICC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), 64% eram T1N0 ou T2N0 no grupo CECpN0 e portanto, apresentavam estadiamento inicial (I e II). Para o grupo CECpN+ a maioria dos tumores (52,9%) apresentavam estadiamento T3 ou T4 e comprometimento linfonodal (N+) sendo classificados com estadiamento clínico avançado III ou IV (Tabela 5).

De acordo com os critérios de inclusão deste estudo, todos os pacientes foram submetidos à cirurgia como tratamento inicial do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. O esvaziamento cervical foi realizado em todos os pacientes do grupo CECpN+ e em 36,0% dos pacientes do grupo CECpN0 (Tabela 5).

Tabela 4 - Distribuição das características demográficas e da história clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		CECpN0		CECpN+		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Gênero	Feminino	11	44,0	5	29,4	0,339
	Masculino	14	56,0	12	70,6	
Cor	Branca	22	88,0	13	76,5	0,413
	Não branca	3	12,0	4	23,5	
Idade	< 57 anos	9	36,0	11	64,7	0,067
	≥ 57 anos	16	64,0	6	35,3	
Tabagismo*	Não	8	34,8	3	17,6	0,297
	Sim	15	65,2	14	82,4	
Etilismo*	Não	7	30,4	5	29,6	0,944
	Sim	16	69,6	12	70,6	
Localização	Lábio inferior	4	16,0	0	0,0	NA
	Assoalho bucal	2	8,0	10	58,6	
	Gengiva	9	36,0	6	35,3	
	Palato duro	4	16,0	0	0,0	
	Palato mole	2	8,0	0	0,0	
	Mucosa jugal	4	16,0	1	5,9	
Tipo de lesão	Ulceró-vegetante	17	68,0	8	47,1	NA
	Ulceró-infiltrativo	6	24,0	8	47,1	
	Ambas	1	4,0	0	0,0	
	Outras	1	4,0	1	5,9	
Biópsia prévia	Não	17	68,0	10	58,8	0,542
	Sim	8	32,0	7	41,2	
Total		25	100,0	17	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, Nº: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, NA: não se aplica.

A grande maioria dos pacientes do grupo CECpN0 (64%) não foi submetida ao esvaziamento cervical. No grupo CECpN+ todos os 17 pacientes foram submetidos ao esvaziamento cervical (Tabela 5), sendo 47,1% ipsilateral e 52,9% bilateral. Um total de seis pacientes (35,3%) dos 17 pertencentes ao grupo CECpN+ foram considerados, inicialmente, N0 e após o tratamento cirúrgico apresentaram comprometimento linfonodal cervical (metástase oculta), confirmado pela histopatologia.

A radioterapia pós-operatória adjuvante foi realizada em 7 (28,0%) pacientes do grupo CECpN0 e em 82,4% dos pacientes do grupo CECpN+ (Tabela 5).

A ocorrência de recidiva local e/ou regional foi detectada com maior frequência no grupo CECpN+ ocorrendo em 47,1% dos pacientes. No grupo CECpN0, 12,0% dos pacientes apresentaram recidivas, como demonstrado na Tabela 5.

O desenvolvimento de um segundo tumor primário foi constatado em 12,5% dos pacientes do grupo CECpN0 e em 11,8% dos pacientes do grupo CECpN+ (Tabela 5).

A comparação entre as variáveis demográficas, clínicas e de evolução dos dois grupos de carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,005$) em relação aos estadiamento N, estadio clínico, esvaziamento cervical, radioterapia adjuvante e recidivas local e/ou regional, como descrito na Tabela 5.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os cortes microscópicos obtidos a partir das peças cirúrgicas do tumor primário, que estavam arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, foram analisadas em hematoxilina e eosina quanto:

- à graduação histopatológica de malignidade no *front* de invasão tumoral;
- à embolização vascular;
- às infiltrações perineural, muscular, glandular e óssea;

Além disso, analisou-se, microscopicamente, a expressão de VEGF-C e de podoplanina pelas células malignas do carcinoma espinocelular de boca.

Tabela 5 - Distribuição das características clínicas de estadiamento, tratamento e evolução dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		CECpN0		CECpN+		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Estadiamento T	T1 e T2	16	64,0	8	47,1	0,276
	T3 e T4	9	36,0	9	52,9	
Estadiamento N	N0	25	100,0	6	35,3	< 0,001
	N+	0	0,0	11	64,7	
Estadio clínico	I e II	16	64,0	5	29,4	0,028
	III e IV	9	36,0	12	70,6	
Esvaziamento cervical	Não	16	64,0	0	0,0	< 0,001
	Sim	9	36,0	17	100,0	
Radioterapia	Não	18	72,0	3	17,6	0,001
	Sim	7	28,0	14	82,4	
Recidiva local e/ou regional	Não	22	88,0	9	52,9	0,029
	Sim	3	12,0	8	47,1	
Segundo tumor*	Não	21	87,5	15	88,2	1,000
	Sim	3	12,5	2	11,8	
Total		25	100,0	17	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, Nº: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

5.3.1 Graduação Histopatológica de Malignidade Tumoral

As características morfológicas analisadas para a graduação histopatológica de malignidade na região do *front* de invasão tumoral foram: o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e a resposta inflamatória do hospedeiro frente ao tumor (Apêndice C), seguindo-se o sistema de graduação histopatológica de malignidade proposto por Bryne et al, (1989).

Os resultados obtidos e a distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as características microscópicas analisadas, podem ser visualizadas na Tabela 6.

A maioria dos carcinomas espinocelulares analisados foi composta por tumores bem diferenciados (Figura 2) caracterizados por intensa queratinização, discreto polimorfismo nuclear com até três figuras de mitose por campo microscópico e infiltrado inflamatório mononuclear de moderado a intenso (Tabela 6).

O padrão de invasão na forma de cordões sólidos e grossos de células neoplásicas foi o mais freqüentemente observado nos carcinomas espinocelulares convencionais (Tabela 6 e Figura 2B), e o padrão de invasão compressivo nos carcinomas verrucosos (Figura 2A).

A variação do escore final de malignidade dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca foi de 5 a 11 pontos para o grupo CECpN0 e de 5 a 12 pontos para o grupo CECpN+. Os tumores com escores menores ou iguais a 10 foram classificados como pouco agressivos e os com escores acima de 10 como muito agressivos.

A distribuição dos tumores de acordo com a graduação histopatológica de malignidade em cada grupo está descrito na Tabela 7. Microscopicamente, a maioria dos carcinomas espinocelulares analisados de ambos os grupos estudados (CECpN0 e CECpN+) consistiu de tumores pouco agressivos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a graduação histopatológica de malignidade ($p=1,000$) nos dois grupos de carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca sem (CECpN0) e com (CECpN+) comprometimento linfonodal (Tabela 7).

Tabela 6 - Graduação de malignidade do *front* de invasão tumoral de Bryne et al. (1989).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	ESCORES DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Grau de	26	15	2	0
Queratinização	(60,5%)	(34,9%)	(4,6%)	(0,0%)
Polimorfismo	28	14	1	0
Nuclear	(65,1%)	(32,6%)	(2,3%)	(0,0%)
Número de	26	17	0	0
Mitoses	(60,5%)	(39,5%)	(0,0%)	(0,0%)
Padrão de	15	21	7	0
Invasão	(34,9%)	(48,8%)	(16,3%)	(0,0%)
Resposta do	20	20	3	0
Hospedeiro	(46,5%)	(46,5%)	(7,0%)	(0,0%)

Tabela 7 - Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo a graduação histopatológica de malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Graduação de malignidade	CECpN0		CECpN+		<i>p</i>
	N	%	N	%	
Pouco agressivo (≤ 10)	21	84,0	14	82,4	1,000
Muito agressivo (> 10)	4	16,0	3	17,6	
Total	25	100,0	17	100,0	

CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, *p*: valor descritivo do teste exato de Fisher

Figura 2 - Carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca onde observa-se intensa queratinização e padrão de invasão compressivo do carcinoma verrucoso (A), e padrão de invasão em cordões grossos na área do *front* invasivo do carcinoma espinocelular convencional de boca.(B). (Hematoxilina e Eosina)

Quanto às características histopatológicas de infiltração tumoral, 94,1% dos pacientes do grupo CECpN+ e 6,7% do grupo CECpN0 apresentaram embolizações vasculares, principalmente linfáticas, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$), de acordo com a Tabela 8.

A infiltração perineural foi maior no grupo CECpN+ (47,1%) quando comparada com o grupo CECpN0 (4,0%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$), como descrito na Tabela 8. Na Figura 3A observa-se a presença de cordões finos de células neoplásicas envolvendo o feixe neural na região peritumoral.

Ao analisarmos os dois grupos de carcinomas espinocelulares de boca (Tabela 8), uma maior frequência de infiltração muscular ($p=0,016$) foi observada no grupo CECpN+ (94,1%) quando comparada com o grupo CECpN0 (60,0%). A Figura 3B ilustra a infiltração muscular das células neoplásicas do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca.

As infiltrações de glândulas salivares e ósseas foram observadas, respectivamente, em 20,0% e 40,0% dos tumores do grupo CECpN0 e em 35,3% e 41,2% daqueles do grupo CECpN+ (Tabela 8).

As margens cirúrgicas estavam livres em todos os carcinomas espinocelulares de boca analisados (Tabela 8).

Figura 3 - Observar a infiltração perineural (A) e muscular (B) das células neoplásicas do carcinoma espinocelular de boca. Em A, destaca-se a presença de cordões finos de células neoplásicas envolvendo o feixe neural. (Hematoxilina e Eosina)

Tabela 8 - Distribuição de freqüência dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as características microscópicas dos tumores. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		CECpN0		CECpN+		<i>p</i>
		N	%	N	%	
Embolização vascular*	Ausente	14	93,3	1	5,9	<0,001
	Presente	1	6,7	16	94,1	
Infiltração perineural	Ausente	24	96,0	9	52,9	0,001
	Presente	1	4,0	8	47,1	
Infiltração muscular	Ausente	10	40,0	1	5,9	0,016
	Presente	15	60,0	16	94,1	
Infiltração glandular	Ausente	20	80,0	11	64,7	0,305
	Presente	5	20,0	6	35,3	
Infiltração óssea	Ausente	15	60,0	10	58,8	0,939
	Presente	10	40,0	7	41,2	
Margens cirúrgicas	Livres	25	59,5	17	40,5	NA
	Comprometidas	0	0,0	0	0,0	
Total		25	100,0	17	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, N°: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, NA: não se aplica.

5.3.2 Avaliação da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares de boca

A expressão do anticorpo anti-VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca encontra-se descrita na Tabela 9.

Uma forte expressão citoplasmática de VEGF-C foi observada principalmente nos CECpN+ e uma fraca expressão nos tumores com baixo poder invasivo, como o carcinomas verrucosos (Tabela 9 e Figuras 4 e 5).

Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF-C pelas células malignas e as principais variáveis demográficas, clínicas, de tratamento e evolução dos pacientes (Tabelas 10 e 11).

Ao analisarmos a forte expressão de VEGF-C somente nos tumores dos pacientes com prognóstico desfavorável notamos que esta expressão foi mais freqüente nos tumores dos pacientes com comprometimento linfonodal (estadio clínico N+), submetidos ao esvaziamento cervical e à radioterapia pós-operatória adjuvante, com maior número de recidivas local, regional e segundo tumor primário (Tabela 11).

Com relação às características microscópicas dos tumores, houve uma tendência da forte expressão de VEGF-C ocorrer nos pacientes cujos carcinomas espinocelulares apresentavam embolização vascular e infiltração muscular (Tabela 12). Dentre os nove carcinomas que apresentaram infiltração perineural, seis destes mostraram forte expressão de VEGF-C (Tabela 12).

Tabela 9 - Distribuição da expressão de VEGF-C nos 42 carcinomas espinocelulares bem diferenciado de boca. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

VEGF-C	Carcinomas espinocelulares de boca		
	CV	CECpN0	CECpN+
Fraco	5/8	8/17	7/17
Forte	3/8	9/17	10/17

CV: carcinoma verrucoso, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal.

Tabela 10 - Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as variáveis demográficas e clínicas dos pacientes. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Fraco		Forte		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Gênero	Feminino	8	40,0	8	36,4	0,808
	Masculino	12	60,0	14	63,6	
Cor	Branca	17	85,0	18	81,8	1,000
	Não branca	3	15,0	4	18,2	
Idade	< 57 anos	8	40,0	12	54,5	0,346
	≥ 57 anos	12	60,0	10	45,5	
Tabagismo*	Não	4	21,1	7	33,3	0,385
	Sim	15	78,9	14	66,7	
Etilismo*	Não	6	31,6	6	28,6	0,836
	Sim	13	68,4	15	71,4	
Localização	Lábio inferior	3	15,0	1	4,5	NA
	Assoalho bucal	3	15,0	9	40,9	
	Gengiva	6	30,0	9	40,9	
	Palato duro	4	20,0	0	0,0	
	Palato mole	1	5,0	7	31,8	
	Mucosa jugal	3	15,0	2	9,1	
Tipo de lesão	Ulceró-vegetante	13	65,0	12	54,5	NA
	Ulceró-infiltrativo	6	30,0	8	36,4	
	Ambas	0	0,0	1	4,5	
	Outras	1	5,0	1	4,5	
Total		20	100,0	22	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, Nº: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, NA: não se aplica.

Tabela 11 - Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo estadiamento, tratamento e evolução clínica. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Fraco		Forte		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Estadiamento T	T1 e T2	12	60,0	12	54,5	0,721
	T3 e T4	8	40,0	10	45,5	
Estadiamento N	N0	16	80,0	15	68,2	0,384
	N+	4	20,0	7	31,8	
Estadio clínico	I e II	10	50,0	11	50,0	1,000
	III e IV	10	50,0	11	50,0	
Esvaziamento cervical	Não	10	50,0	6	27,3	0,130
	Sim	10	50,0	16	72,7	
Radioterapia	Não	11	55,0	10	45,5	0,537
	Sim	9	45,0	12	54,5	
Recidiva local e/ou regional	Não	16	80,0	15	68,2	0,384
	Sim	4	20,0	7	31,8	
Segundo tumor*	Não	19	95,0	17	81,0	0,343
	Sim	1	5,0	4	19,0	
Total		20	100,0	22	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, Nº: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 12 - Distribuição da expressão de VEGF-C nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas e a graduação da malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Fraco		Forte		<i>p</i>
		N	%	N	%	
Embolização vascular*	Ausente	7	50,0	8	44,4	0,755
	Presente	7	50,0	10	55,6	
Infiltração perineural	Ausente	17	85,0	16	72,7	0,460
	Presente	3	15,0	6	27,3	
Infiltração muscular	Ausente	8	40,0	3	13,6	0,052
	Presente	12	60,0	19	86,4	
Infiltração glandular	Ausente	13	65,0	18	81,8	0,216
	Presente	7	35,0	4	18,2	
Infiltração óssea	Ausente	12	60,0	13	59,1	0,952
	Presente	8	40,0	9	40,9	
Margens cirúrgicas	Livres	20	100,0	22	100,0	NA
	Comprometidas	0	0,0	0	0,0	
Graduação da Malignidade	Pouco agressivo	15	75,0	20	90,9	0,229
	Muito agressivo	5	25,0	2	9,1	
Total		20	100,0	22	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, N°: número de pacientes, *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Figura 4 - Forte expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-VEGF-C no *front* de invasão tumoral do carcinoma verrucoso (A) e carcinoma espinocelular convencional de boca (B). (Imuno-histoquímica anti-VEGF-C)

Figura 5 - Fraca expressão do anticorpo anti-VEGF-C no carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca com padrão de invasão em cordões grossos. (Imuno-histoquímica anti-VEGF-C)

5.3.3 Avaliação da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca

A expressão de podoplanina foi detectada na camada basal do epitélio hiperplásico da mucosa bucal nas margens cirúrgicas do carcinoma espinocelular de boca (Figura 6A) e nas células endoteliais dos vasos linfáticos (Figura 6B), sendo este último utilizado como controle positivo interno da reação imuno-histoquímica.

A distribuição da expressão membranosa e citoplasmática de podoplanina nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca encontra-se descrita na Tabela 13 e ilustrada nas Figuras 7 e 8. A forte expressão de podoplanina foi observada em 13 tumores sendo detectada principalmente nos carcinomas espinocelulares convencionais (Figura 7) do que nos carcinomas verrucosos (Tabela 13).

Entre as características demográficas e clínicas houve uma maior frequência da forte expressão de podoplanina no gênero masculino ($p=0,037$), entretanto, não houve associação significativa entre esta expressão e as demais variáveis analisadas (Tabela 14).

Uma associação estatisticamente significativa foi detectada da expressão de podoplanina com o estadiamento T e estadio clínico (Tabela 15), sendo que os tumores com forte expressão de podoplanina apresentavam estadiamento T1-T2 e estadio clínico precoce (I e II). Entre os pacientes que apresentaram recidiva local e/ou regional, uma maior frequência da forte expressão de podoplanina foi observada nos pacientes com carcinoma espinocelular se comparada àqueles com fraca expressão desta proteína (Tabela 15).

Com relação às características microscópicas avaliadas (embolização vascular, infiltrações perineural, muscular, glandular e óssea, margens cirúrgicas e graduação de malignidade tumoral), uma associação significativa da expressão de podoplanina foi encontrada somente com a infiltração glandular ($p=0,003$), como descrito na Tabela 16.

Tabela 13 - Distribuição da expressão de podoplanina nos 33 carcinomas espinocelulares bem diferenciado de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1980 a 2000.

Podoplanina	Carcinomas espinocelulares de boca		
	CV	CECpN0	CECpN+
Negativo/Fraco	4/6	9/15	7/12
Forte	2/6	6/15	5/12

CV: carcinoma verrucoso, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal.

Figura 6 - Expressão imuno-histoquímica de podoplanina nas células da camada basal do epitélio da mucosa bucal (A). Em B, observar a imunomarcagem de podoplanina na região de transição entre o epitélio com expressão na camada basal e a forte expressão das células neoplásicas do carcinoma espinocelular. Destaca-se ainda a imunomarcagem dos vasos linfáticos (setas). (Imuno-histoquímica anti-podoplanina)

Tabela 14 - Distribuição da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as variáveis demográficas e história clínica dos pacientes. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Negativo/Fraco		Forte		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Gênero	Feminino	12	60,0	3	23,1	0,037
	Masculino	8	40,0	10	76,9	
Cor	Branca	18	90,0	11	84,6	1,000
	Não branca	2	10,0	2	15,4	
Idade	< 57 anos	7	35,0	7	53,8	0,284
	≥ 57 anos	13	65,0	6	46,2	
Tabagismo*	Não	8	44,4	3	23,1	0,275
	Sim	10	55,6	10	76,9	
Etilismo*	Não	6	33,3	5	38,5	1,000
	Sim	12	66,7	8	61,5	
Localização	Lábio inferior	2	10,0	1	7,7	NA
	Assoalho bucal	5	25,0	3	23,1	
	Gengiva	8	40,0	5	38,4	
	Palato duro	2	10,0	1	7,7	
	Palato mole	0	0,0	2	15,4	
	Mucosa jugal	3	15,0	1	7,7	
Tipo de lesão	Ulceró-vegetante	14	70,0	8	61,5	NA
	Ulceró-infiltrativo	6	30,0	4	30,8	
	Ambas	0	0,0	1	7,7	
Total		20	100,0	13	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada. CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. Nº: número de pacientes. *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 15 - Distribuição da expressão de podoplanina carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo estadiamento clínico, tratamento e evolução clínica. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Negativo/Fraco		Forte		<i>p</i>
		Nº	%	Nº	%	
Estadiamento T	T1 e T2	8	40,0	10	76,9	0,037
	T3 e T4	12	60,0	3	23,1	
Estadiamento N	N0	14	70,0	11	84,6	0,431
	N+	6	30,0	2	15,4	
Estadio clínico	I e II	6	30,0	9	69,2	0,027
	III e IV	14	70,0	4	30,8	
Esvaziamento cervical	Não	6	30,0	6	46,2	0,465
	Sim	14	70,0	7	53,8	
Radioterapia	Não	12	60,0	7	53,8	0,727
	Sim	8	40,0	6	46,2	
Recidiva local e/ou regional	Não	18	90,0	8	61,5	0,084
	Sim	2	10,0	5	38,5	
Segundo tumor*	Não	18	90,0	11	91,7	1,000
	Sim	2	10,0	1	8,3	
Total		20	100,0	13	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada. CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. Nº: número de pacientes. *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 16 - Distribuição da expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, segundo as características microscópicas e a graduação de malignidade tumoral. Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo-SP, 1980 a 2000.

Variáveis		Fraco		Forte		<i>p</i>
		N	%	N	%	
Embolização vascular*	Ausente	7	46,7	4	44,4	1,000
	Presente	8	53,3	5	55,6	
Infiltração perineural	Ausente	17	85,0	8	61,5	0,213
	Presente	3	15,0	5	38,5	
Infiltração muscular	Ausente	6	30,0	3	23,1	1,000
	Presente	14	70,0	10	76,9	
Infiltração glandular	Ausente	19	95,0	6	46,2	0,003
	Presente	1	5,0	7	53,8	
Infiltração óssea	Ausente	10	50,0	10	76,9	0,122
	Presente	10	50,0	3	23,1	
Margens cirúrgicas	Livres	20	100,0	13	100,0	NA
	Comprometidas	0	0,0	0	0,0	
Graduação da Malignidade	Pouco agressivo	17	85,0	11	84,6	1,000
	Muito agressivo	3	15,0	2	15,4	
Total		20	100,0	13	100,0	

*: excluídos os pacientes com informação ignorada, CECpN0: carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. CECpN+: carcinoma espinocelular com comprometimento linfonodal, confirmado microscopicamente. N°: número de pacientes. *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. NA: não se aplica.

Figura 7 - Forte expressão do anticorpo anti-podoplanina pelas células neoplásicas do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca (A). Em B, observar detalhe da marcação membranosa da podoplanina nas células neoplásicas do *front* de invasão tumoral. (Imuno-histoquímica anti-podoplanina)

Figura 8 - Ausência de expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-podoplanina na região do *front* de invasão tumoral do carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca. (Imuno-histoquímica anti-podoplanina)

5.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

O período de seguimento dos pacientes variou entre 0,33 e 229,57 meses (média 85,0 meses, desvio-padrão 71,69). Ao final deste período, 13 (31,0%) pacientes estavam vivos e sem evidências de recorrência da doença, um (2,4%) paciente encontrava-se vivo com câncer, dez (23,8%) pacientes haviam morrido por outras causas não relacionadas ao tumor, 16 (38,1%) pacientes morreram devido ao câncer e dois (4,8%) pacientes foram considerados perdidos de vista.

As probabilidades de sobrevida global, sobrevida específica por câncer e sobrevida livre de doença, acumuladas em 5 e 10 anos, foram calculadas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier. Para a comparação entre as curvas de sobrevida global, sobrevida específica por câncer e sobrevida livre de doença foi realizado o teste de *log-rank* com nível de significância estatística de 5%.

Não houve diferença estatística entre as probabilidades de sobrevida global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelulares de boca, em 5 e 10 anos, que apresentaram forte ou fraca expressão de VEGF-C pelas células malignas (Tabela 17 e Figura 9). Entretanto, observa-se que percentualmente as taxas de sobrevida global, específica por câncer e livre de doença para os pacientes com carcinomas espinocelulares de boca e forte expressão de VEGF-C foram menores se comparadas ao grupo com fraca expressão deste fator de crescimento.

Em relação à podoplanina, as análises de sobrevida global, específica por câncer e livre de doença acumuladas em 5 e 10 anos também não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com carcinoma espinocelular de boca com forte ou fraca expressão de podoplanina (Tabela 18 e Figura 10). Porém, a análise numérica da sobrevida global demonstra taxas menores para os pacientes com forte expressão de podoplanina se comparados aqueles com fraca expressão desta proteína (Tabela 18).

O VEGF-C e a podoplanina não se mostraram fator de prognóstico significativo para os pacientes com carcinoma espinocelular de boca na amostra analisada. O único fator com valor prognóstico que influenciou a sobrevida global ($p=0,001$) e específica por câncer ($p<0,001$) dos 42 pacientes com câncer de boca foi o comprometimento linfonodal cervical (pN+) como pode ser observado na Tabela 19 e no Figura 11.

Tabela 17 - Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo a expressão de VEGF-C. Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

VEGF-C	Sobrevida Global (%)			Sobrevida Específica por Câncer (%)			Sobrevida Livre de Doença(%)		
	5 anos	10 anos	<i>p</i>	5 anos	10 anos	<i>p</i>	5 anos	10 anos	<i>p</i>
Fraco	73,9	57,2	0,273	78,5	72,9	0,218	88,9	88,9	0,390
Forte	54,2	33,8		63,0	49,1		71,3	71,3	

p: nível descritivo do teste de *log-rbbank*.

Figura 9 - Curva de sobrevida global segundo a expressão de VEGF-C. Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 18 - Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo a expressão de podoplanina. Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

Podoplanina	Sobrevida Global (%)			Sobrevida Específica por Câncer (%)			Sobrevida Livre de Doença(%)		
	5 Anos	10 Anos	<i>p</i>	5 anos	10 anos	<i>p</i>	5 anos	10 anos	<i>p</i>
Negativo/Fraco	68,6	52,8	0,539	73,5	66,8	0,966	88,2	88,2	0,706
Forte	52,7	35,2		67,1	67,1		80,8	80,8	

p: nível descritivo do teste de *log-rbbank*.

Figura 10 - Curva de sobrevida global segundo a expressão de podoplanina. Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 19 - Análise das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo o comprometimento linfonodal cervical (pN). Probabilidade de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

Podoplanina	Sobrevida Global (%)			Sobrevida Específica por Câncer (%)		
	5 anos	10 Anos	<i>p</i>	5 anos	10 anos	<i>p</i>
CECpN0	83,1	55,1	0,001	91,5	80,0	<0,001
CECpN+	35,3	29,4		39,7	33,1	

p: nível descritivo do teste de *log-rbbank*.

Figura 11 - Curva de sobrevida global segundo o comprometimento linfonodal cervical (pN). Porcentagem de sobrevida acumulada pela técnica de Kaplan-Meier.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A disseminação dos tumores malignos por mecanismos metastáticos tem um forte impacto no prognóstico dos pacientes e permanece como uma importante causa de morte por câncer (AMARAL et al., 2004; BOCK et al., 2008).

Particularmente em relação ao câncer de boca a disseminação tumoral ocorre, preferencialmente, pelo sistema linfático. A via de sinalização VEGF-C/VEGFR-3 tem sido freqüentemente associada à linfangiogênese tumoral e a ocorrência de metástase linfonodal. Assim sendo, a expressão imuno-histoquímica de fatores de crescimento linfangiogênicos como o VEGF-C tem sido correlacionada com a maior ocorrência de metástases linfonodais (SKOBE et al., 2001; KARPANEN et al., 2001; TERVALA; SUOMINEN; SAARISTO, 2008) e com um pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRWARDENA et al., 2008).

No presente estudo o objetivo foi investigar o significado clínico da expressão pelas células epiteliais malignas do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C e da podoplanina, molécula utilizada para marcação específica dos vasos linfáticos tumorais nos carcinomas espinocelulares de boca. Foram incluídos nesta análise, tumores com baixo potencial metastático como os carcinomas verrucosos onde a expressão de VEGF-C e podoplanina não tem sido, freqüentemente, investigada.

Nossa amostra tumoral foi previamente estudada por Moraes (2005) sendo constituída por 42 pacientes portadores de carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca submetidos ao tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, no período entre 1980 e 2000. Os pacientes com carcinoma espinocelular, oito destes diagnosticados como carcinoma verrucoso de boca, foram divididos em dois grupos de acordo com a presença (CECpN+) ou não (CECpN0) do comprometimento linfonodal, confirmado pela histopatologia, para uma análise comparativa das características clínicas e evolução entre os dois grupos tumorais.

Com base nos dados clínicos e demográficos dos dois grupos de carcinomas espinocelulares de boca analisados (CECpN0 e CECpN+) verificamos uma predominância de pacientes do gênero masculino, de cor branca, tabagistas e etilistas como demonstrado na Tabela 4. O consumo simultâneo de tabaco e álcool foi observado na maioria dos pacientes de

ambos os grupos, confirmando que este sinergismo permanece como importante fator de risco para o carcinoma espinocelular de boca (WOOLGAR, 2006; PARISE JR, 2000)

Com relação à idade, a maior parte dos pacientes do grupo CECpN0 apresentou mais de 57 anos, enquanto que no grupo CECpN+, a maioria dos pacientes possuía menos de 57 anos de idade, de acordo com a Tabela 4. É importante ressaltar que no grupo CECpN0 haviam oito carcinomas verrucosos, tumores estes com comportamento clínico indolente mas que geralmente atingem pacientes em uma faixa etária mais elevada (MORAES, 2005; OLIVEIRA et al, 2006; WALVEKAR et al., 2008).

As características clínicas e demográficas descritas acima revelam um padrão bem estabelecido e conhecido sobre o câncer de boca no Brasil e no mundo (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; AMARAL et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; YUAN et al., 2006; MIYAHARA et al., 2007; WARBURTON et al., 2007; FAUSTINO et al., 2008; O'DONNELL et al., 2008).

O local mais acometido pelo carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca nos 42 pacientes analisados neste estudo foi a gengiva, seguido pelo soalho bucal. O tipo de lesão mais freqüentemente observado, clinicamente, foi o padrão úlcero-vegetante, uma característica peculiar dos tumores de crescimento lento e expansivo como o carcinoma verrucoso (Tabela 4).

Quanto ao estadiamento clínico, de acordo com os critérios de estadiamento clínico definidos pela UICC (MINISTERIO DA SAUDE, 2004), a maioria dos tumores do grupo CECpN0 apresentavam estadiamento inicial (I e II) e no grupo CECpN+ a maioria dos tumores (52,9%) apresentavam estadiamento clínico avançado III ou IV, sendo estas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5). Estes resultados eram esperados pois o comprometimento linfonodal cervical (pN+) constitui um fator bem estabelecido que influencia a evolução e o prognóstico dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca (PARISE JR, 2000; AMARAL et al., 2004; WOOLGAR, 2006).

No grupo CECpN+ todos os 17 pacientes foram submetidos ao esvaziamento cervical, e destes, seis pacientes (35,3%) foram considerados, inicialmente, N0 e após o tratamento cirúrgico apresentaram comprometimento linfonodal cervical (metástase oculta), confirmado pela histopatologia. Esta freqüência de metástase oculta é menor do que aquela descrita por Byers et al. (1998), entretanto pode ser considerada alta em comparação com as encontradas

por AMARAL et al. (2004), por OKAMOTO et al. (2002) e por FAUSTINO (2007), respectivamente de 23,1%, 23,7% e 21,9%.

Ao considerarmos o tratamento, observamos que metade dos pacientes de nossa amostra foi submetida à cirurgia com radioterapia pós-operatória adjuvante (Tabela 5). O tratamento radioterápico como realizado em alguns pacientes deste estudo está indicado na presença de margens cirúrgicas comprometidas ou exíguas ou de linfonodos histologicamente positivos, embolização vascular neoplásica, infiltração tumoral perineural e em todos os pacientes onde os tumores são classificados clinicamente nos estádios III e IV (RAPOPORT et al., 2001).

Com relação à evolução clínica tumoral, verificamos uma pior evolução para os pacientes do grupo CECpN+ onde houve maior frequência de recidiva local e/ou regional se comparado ao grupo CECpN0. Das três recidivas detectadas no grupo CECpN0, duas eram recidivas locais observadas em pacientes com carcinoma verrucoso tratados exclusivamente pela cirurgia e cujas margens cirúrgicas estavam livres. Estes resultados reforçam as afirmativas de que o carcinoma verrucoso parece ter um potencial intrínseco para recorrência local após completa excisão cirúrgica. (OLIVEIRA et al., 2006)

A confirmação do grau de diferenciação dos carcinomas espinocelulares de boca foi baseada no sistema de graduação histopatológica de malignidade tumoral proposto por Bryne et al. (1989), onde se avalia o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e o infiltrado inflamatório mononuclear. A região do *front* de invasão nos carcinomas espinocelulares deste estudo foi selecionada para todas as análises microscópicas, buscando sempre a porção mais profunda e representativa do fragmento tumoral. Esta região foi escolhida porque a morfologia das células malignas na porção mais invasiva do tumor, quase sempre, difere das partes mais superficiais, por apresentarem uma menor diferenciação das células tumorais e por conterem informações com maior valor prognóstico quando comparadas com as demais áreas tumorais (BRYNE et al., 1998).

Com base no índice de malignidade proposto por Bryne et al. (1989), confirmou-se que a maioria dos carcinomas espinocelulares de boca (83,3%) de nossa amostra era bem diferenciado com presença de intensa queratinização, discreto polimorfismo nuclear, com até três figuras de mitose por campo microscópico e com uma moderada a intensa resposta do hospedeiro (Tabela 6 e 7, Figura 2). O padrão de invasão tumoral compressivo foi observado nos carcinomas verrucosos (Figura 2A), reforçando o comportamento indolente da lesão,

descrito também por outros autores (ACKERMAN, 1948, MORAES, 2005; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007).

Em relação às características histopatológicas de invasão tumoral, a embolização vascular e as infiltrações perineural e muscular foram, significativamente, maiores no grupo CECpN+, quando comparadas ao grupo CECpN0 (Tabela 8). Estes resultados demonstram um potencial mais agressivo de invasão tumoral e evolução clínica desfavorável para o grupo CECpN+, pois as infiltrações perineural e muscular têm sido associadas a um pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca (TRALONGO et al., 1999; RAHIMA et al., 2004; WOOLGAR, 2006).

No presente estudo foi realizada a análise da expressão imuno-histoquímica de VEGF-C e de podoplanina pelas células tumorais, a partir do *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca, utilizando o sistema semi-quantitativo de escores proposto por Soini et al. (2001). Concordamos com Faustino (2007) ao afirmar que a escolha deste sistema para avaliação do VEGF-C em CEC de boca minimiza a subjetividade da avaliação imuno-histoquímica e facilita a reprodução do método, pois associa a porcentagem e a intensidade da expressão pelas células neoplásicas imunomarcadas, refletindo melhor o comportamento tumoral.

A forte expressão de VEGF-C pelas células malignas foi detectada principalmente nos carcinomas espinocelulares convencionais e a fraca expressão nos carcinomas verrucosos (Tabela 9). Na nossa amostra não houve associação significativa entre a expressão de VEGF-C e as principais variáveis demográficas, clínicas e microscópicas (Tabelas 10, 11 e 12).

Em tumores com baixa agressividade e bom prognóstico, como o carcinoma verrucoso, uma variante bem diferenciada do carcinoma espinocelular de boca, a expressão de VEGF-C pelas células malignas não foi encontrada na literatura. No presente estudo, dos oito carcinomas verrucosos, três apresentaram forte expressão de VEGF-C, o que confirma que mesmo em tumores com padrão de invasão compressivo e baixo potencial metastático, pode se observar a expressão deste fator de crescimento. Nestes tumores, o VEGF-C poderia estar participando como fator indutor da angiogênese, por meio do receptor VEGFR-2, expresso no endotélio dos vasos sanguíneos (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; ROSKOSKI JR, 2007).

Um outro aspecto a ser considerado refere-se ao comportamento clínico do carcinoma verrucoso, pois embora apresente crescimento lento e padrão de invasão compressivo, se não tratado, pode se tornar localmente agressivo e invadir os tecidos adjacentes, inclusive com o

desenvolvimento de carcinoma espinocelular convencional (MORAES, 2005; OLIVEIRA et al., 2006). Portanto, a forte expressão de VEGF-C nestes tumores, encontrada em nossa amostra, necessita ser melhor investigada com casuísticas tumorais mais representativas, para se confirmar se a expressão deste fator de crescimento pode indicar uma evolução do carcinoma verrucoso para um carcinoma espinocelular convencional. Esta hipótese pode ser reforçada pela constatação de que nas células epiteliais normais, o VEGF-C não se expressa e um aumento significativo deste fator de crescimento é observado na transição do epitélio normal para os diferentes graus de displasias ou na evolução para o carcinoma invasivo (JOHNSTONE, LOGAN; 2006).

Ao avaliarmos os CEC no subgrupo de pacientes com evolução clínica desfavorável notamos uma predominância da forte expressão de VEGF-C nos pacientes com comprometimento linfonodal (N+), que foram submetidos ao esvaziamento cervical e à radioterapia pós-operatória adjuvante e com maior frequência de recidivas local e/ou regional e segundo tumor primário (Tabela 11). Além disso, nos CEC com embolização vascular e infiltrações perineural e/ou muscular houve também o predomínio da forte expressão de VEGF-C (Tabela 12).

Em relação às recidivas locais e/ou regionais nos pacientes com CEC de boca, nossos resultados reforçam os de Tanigaki et al. (2004) onde a forte expressão de VEGF-C foi associada com a ocorrência de recidivas locais e regionais do carcinoma espinocelular de língua.

Nos últimos anos, a forte expressão de VEGF-C pelas células malignas dos carcinomas espinocelulares de boca vem sendo associada, clinicamente, com a ocorrência de metástases linfonodais (KISHIMOTO et al., 2003; SEDIVY et al., 2003; LÓPEZ DE CICCIO et al., 2004; SHINTANI et al., 2004; TANIGAKI et al., 2004; LI et al., 2006; SIRIWARDENA et al., 2008). A expressão de VEGF-C pelas células malignas pode aumentar o número de vasos linfáticos peri e intratumoral, principalmente pela via de sinalização VEGF-C/VEGFR-3 (SEDIVY et al., 2003; GOMBOS et al., 2005). O receptor VEGFR-3 expresso no endotélio linfático pode induzir a linfangiogênese e, consequentemente, facilitar a disseminação linfática do tumor primário (metástases linfonodais) (HOSHIDA et al., 2006; ROSKOSKI JR, 2007; ACHEN; STACKER, 2008). Recentemente, evidenciou-se que a via VEGF-C/VEGFR-3 aumenta a mobilidade da célula cancerosa e sua capacidade de invasão, promovendo as metástases tumorais (SHAYAN;

ACHEN; STACKER, 2006; VAN DER AUWERA et al., 2006; BALUK; MCDONALD, 2008).

Nossos resultados e o de outros autores (FAUSTINO, 2007; MIYAHARA et al., 2007; Warburton et al., 2007), porém, não conseguiram estabelecer uma associação estatisticamente significativa entre a forte expressão imuno-histoquímica de VEGF-C pelas células malignas e a ocorrência de metástases linfonodais no CEC de boca, demonstrando que o significado clínico e a análise isolada de um imunomarcador pode ser de difícil interpretação devido a diversidade do comportamento clínico e biológico dos tumores.

O outro marcador imuno-histoquímico utilizado neste estudo foi a podoplanina, uma glicoproteína transmembrana que se expressa especificamente nas células endoteliais dos vasos linfáticos e por isso tem sido utilizada no estudo da linfangiogênese e da densidade microvascular linfática dos tumores sólidos malignos (MARTIN-VILLAR et al., 2005; VAN DER AUWERA et al., 2006; YUAN et al., 2006; WICKI et al., 2006; OHNO et al., 2007; WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

Neste trabalho utilizamos a técnica imuno-histoquímica da polimerização controlada de anticorpos poliméricos de ligação HRP (*horseradish peroxidase*) para marcação do anticorpo anti-podoplanina no CEC de boca. Nossos resultados comprovaram que esta nova tecnologia de polimerização reduziu significativamente o problema da coloração não específica observada nos sistemas de detecção do tipo estreptavidina-biotina devido à biotina endógena (NOVOLINK MAX POLYMER DETECTION SYSTEM, 2006), além de aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção do anticorpo primário utilizado, como previamente sugerido por Shi et al. (1999).

A análise da expressão de podoplanina em nossa amostra foi detectada na camada basal do epitélio hiperplásico da mucosa bucal nas margens cirúrgicas do carcinoma espinocelular (Figura 6A) e nas células endoteliais dos vasos linfáticos. Nos carcinomas espinocelulares a expressão de podoplanina foi observada na camada periférica das ilhotas epiteliais malignas na região do *front* de invasão tumoral (Figura 7). Este padrão de marcação imuno-histoquímico da podoplanina também foi descrito por outros autores em lesões cancerizáveis (KAWAGUCHI et al., 2008) e em carcinomas espinocelulares de boca (MARTIN-VILLAR et al., 2005; YUAN et al., 2006), de laringe, de pulmão (KATO et al., 2005), de colo de útero (DUMOFF et al., 2006), de esôfago e de pele (SCHACHT et al., 2005; BALUK; MCDONALD, 2008).

Estudos recentes têm sugerido que a podoplanina é uma molécula importante no processo de invasão e migração coletiva das células neoplásicas. Durante este processo de invasão denominado de transição epitelial-mesenquimal, as células epiteliais perderiam seus marcadores, como a E-caderina, e passariam a expressar marcadores mesenquimais, como a N-caderina, a vimentina e, recentemente sugerida, a podoplanina (WICKI; CHRISTOFORI, 2007; WICKI et al., 2006). O papel exato da transição epitelial-mesenquimal na progressão tumoral ainda está em debate, mas esta transição parece ser particularmente importante em neoplasias com padrão de invasão de células isoladas e na disseminação precoce das células tumorais (THIERY, 2002; GRUNERT; JECHLINGER; BEUG, 2003).

Em nossa amostra de 33 tumores, apenas treze CEC de boca apresentaram forte expressão de podoplanina, sendo onze carcinomas espinocelulares convencionais com invasão tecidual local e regional das células neoplásicas (Tabela 13) e dois carcinomas verrucosos com baixo potencial invasivo. Estes resultados reforçam a teoria descrita acima da participação da podoplanina no processo de invasão tumoral, principalmente dos carcinomas espinocelulares convencionais. Além disso, nossos resultados corroboram com aqueles de Schacht et al (2005) que, ao demonstrarem em carcinomas espinocelulares de pele bem e moderadamente diferenciados, a expressão de podoplanina estava ausente ou restrita exclusivamente ao *front* de invasão tumoral.

A forte expressão de podoplanina, como a observada em dois carcinomas verrucosos de nossa amostra, precisa ser melhor elucidada futuramente com análises tumorais mais representativas desta variante do carcinoma espinocelular.

Ao avaliarmos as características demográficas e clínicas dos pacientes com CEC de boca observamos uma maior frequência da forte expressão de podoplanina no gênero masculino ($p=0,037$), nos pacientes com estadiamento T1 e T2 ($p=0,037$) e com estadio clínico precoce I e II ($p=0,027$). Estes resultados indicam que a expressão de podoplanina ocorre desde as fases iniciais do processo de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca e corroboram com os achados de Yuan et al. (2006) e Kawaguchi et al. (2008) ao afirmarem que esta expressão está presente precocemente na tumorigênese da região de cabeça e pescoço.

Entre os pacientes com carcinoma espinocelular que apresentaram recidiva local e/ou regional, houve um predomínio de tumores com forte expressão de podoplanina em comparação com aqueles com fraca expressão desta proteína (Tabela 15). Estes resultados, mesmo sem associação estatisticamente significativa, reforçam aqueles de Yuan et al (2006)

que verificaram que a forte expressão de podoplanina é um fator preditivo de metástases linfonodais em CEC de boca.

Com relação ao comportamento biológico tumoral avaliado pelas características microscópicas de embolização vascular e de infiltrações perineural, muscular, glandular e óssea (Tabela 16), constatamos uma associação estatisticamente significativa da expressão de podoplanina somente com a presença de infiltração glandular nos CEC de boca ($p=0,003$). Devido ao número reduzido de nossa amostra de CEC de boca, outros estudos precisam ser realizados para determinar o papel da podoplanina no desenvolvimento e evolução tumoral.

A expressão imuno-histoquímica de VEGF-C ou de podoplanina pelas células malignas não se mostrou fator de prognóstico significativo para os pacientes com CEC de boca, pois não influenciou as taxas de sobrevida global, específica por câncer e livre de doença. (Tabelas 17 e 18, Figuras 9 e 10). Entretanto, a análise numérica da influência do VEGF-C na sobrevida global, específica por câncer e livre de doença e da podoplanina na sobrevida global demonstrou taxas percentualmente menores para os pacientes com CEC de boca e forte expressão destes biomarcadores se comparados aqueles com fraca expressão destas proteínas.

O único fator com valor prognóstico que influenciou a sobrevida global ($p=0,001$) e específica por câncer ($p<0,001$) dos 42 pacientes com câncer de boca foi o comprometimento linfonodal cervical (pN+).

Os resultados acima indicam que a forte expressão de VEGF-C e de podoplanina pelas células malignas juntamente com o comprometimento linfonodal regional são fatores de pior prognóstico para os pacientes com CEC bem diferenciados de boca.

Mesmo com uma amostra reduzida de CEC de boca e sem associações significativas entre a expressão de VEGF-C e de podoplanina pelas células malignas e as variáveis clínico-patológicas e de prognóstico avaliadas neste estudo, nossos resultados sugerem que a forte expressão destes biomarcadores imuno-histoquímicos identificam tumores com comportamento clínico mais agressivo, com potencial de disseminação metastática linfonodal e recidivas locais e regionais, e portanto, com um pior prognóstico para os pacientes afetados por esta neoplasia maligna.

Assim sendo, a participação do VEGF-C e da podoplanina no processo de invasão e disseminação do CEC de boca, particularmente no mecanismo de metástases linfáticas, precisa continuar sendo investigada, pois podem se tornar alvos terapêuticos importantes no tratamento desta neoplasia maligna.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir de nossos resultados verificamos que a forte expressão de VEGF-C e de podoplanina ocorreu com menor frequência nos tumores malignos com baixo potencial invasivo, como os carcinomas verrucosos, sendo detectada principalmente na região do *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca convencionais.

Concluimos que a forte expressão de VEGF-C e de podoplanina pelas células malignas no *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados de boca indicam tumores com comportamento clínico e biológico mais agressivo, com potencial de disseminação metastática linfonodal, maior ocorrência de recidivas locais, regionais, segundo tumor primário, e portanto, com um pior prognóstico para os pacientes afetados por esta neoplasia maligna.

Referências

REFERÊNCIAS

Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread – new players begin to emerge. *Int J Cancer*. 2006;119(8):1755-60.

Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:225-34.

Ackerman LV. Verrucous carcinoma of the oral cavity. *Surgery*. 1948;23(4):670-8

Al-Rawi MAA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *EJSO*. 2005;31(2):117-21.

Amaral TMP, Freire ARS, Carvalho AL, Pinto CAL, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol*. 2004;40(8):780-6.

Anneroth G, Batsaki 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(3):229-49.

Arquette MA. Câncer de cabeça e pescoço. In: Govindan R. *Washington manual de oncologia*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2004, 259-75.

Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:1-12.

Beasley NJP, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2002;62(5):1315-20.

Bock JM, Sinclair LL, Bedford NS, Jackson RE, Lee JH, Trask DK. Modulation of cellular invasion by VEGF-C expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(4):355-62.

Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007;102(6):1358-67.

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 carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1989;18(8):432-7.

Bryne RM. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis*. 1998;4(2):70-7.

Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, Sample D, Hankins P, Smith TL, Wolf PJ. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue? *Head Neck*. 1998;20(2):138-44.

Cimpean AM, Raica M, Izvernariu DA, Tatucu D. Lymphatic vessels identified with podoplanin: comparison of immunostaining with three different detection systems. *Romanian J Morphology and Embryology*. 2007;48(2):139-43.

Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, Alitalo K. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25176-83.

Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:235-241.

Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol* 2005;18: 97-104

Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol*. 2006;19(5):708-16.

Faustino SES. Expressão de VEGF-C em carcinomas espinocelulares de boca: correlação com as metástases linfonodais ocultas e com o prognóstico dos pacientes [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Faustino SES, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(4):372-8.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.* 1997;18(1):4-25.

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.

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(23):8364-71.

Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(8):657-65.

He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004;1654(1):3-12.

Hiratsuka H, Miyakawa A, Nakamori K, Kido Y, Sunakawa H, Kohama G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 1997; 1;80(3):351-6

Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, di Tomaso E, Chen YL, Pytowski B, Fukumura D, Padera TP, Jain RK. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutics implications. *Cancer Res.* 2006;66(16):8065-75.

Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojika M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage 1B squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer.* In press 2008.

Jain RK, Padera TP. Prevention and treatment of lymphatic metastasis by antilymphangiogenic therapy. *J Nat Cancer Inst.* 2002;94(11):785-7.

Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K.. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997;16(13):3898-911.

Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006;42(4):337-42.

Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002;82:1255-7

Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 2001;61:1786-90.

Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2005;26(4):195-200.

Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, 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(3):354-60.

Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2003;39(4):391-6.

Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int.* 2005;55(2):83-6.

Kopfstein L, Veikkola T, Djonov VG, Baeriswyl V, Schomber T, Strittmatter K, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K, Christofori G. Distinct roles of vascular endothelial growth factor D in lymphangiogenesis and metastasis. *Am J Pathol.* 2007;170(4):1348-61.

Kowalski LP, Nishimoto IN. Epidemiologia do câncer de boca. In.: Parise Júnior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo, Sarvier; 2000; Cap 1, p. 3-11.

Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development.* 1996;122(12):3829-37.

Li QL, Chen FJ, Zeng ZY, Yang AK, Wu QL, Zhang HZ, Hou JH. Expression and clinical significance of VEGF-C and Flt-4 in tongue squamous cell carcinoma. *Ai Zheng.* 2006;25(2):235-40.

López 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.

Longatto-Filho A, Pinheiro C, Pereira SMM, Etlinger D, Moreira MAR, Jubé LF, Queiroz GS, Baltazar F, Schmitt FC. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2007;107(1):45-51.

Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circ Res*. 1999 Nov 26;85(11):992-9.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999;80:569-78.

Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2005;113: 899–910.

Ministério da Saúde; Secretaria de atenção à saúde; Instituto Nacional de Câncer. Tumores da cabeça e do pescoço. In: Ministério da Saúde. TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro, INCA, 2004, 21-8.

Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007;110(6):1287–94

Moraes RV. Carcinoma verrucoso de boca: análise das características clínica e microscópica, da expressão imuno-histoquímica e da hipermetilação do gene da E-caderina [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martín-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2004;100(3):553-60 .

Nakazato T, Shingaki S, Kitamura N, Saito C, Kuwano R, Tachibana M. Expression level of vascular endothelial growth factor C and A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates respectively with lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity. *Oncol Rep*. 2006;15(4):825-30.

Neuchrist C, Erovcic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Holleman D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M.. Vascular endothelial growth factor C and Vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck*. 2003;25(6):464-74.

Nicosia RF. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol.* 1998;153(1):11-6.

NovoLink Max Polymer Detection System. Novocastra. RE7140-K/CE/UK Form 711. 21 July 2006.

O'Donnell RK, Feldman M, Mick R, Muschel RJ. Immunohistochemical method identifies lymphovascular invasion in a majority of oral squamous cell carcinomas and discriminates between blood and lymphatic vessel invasion. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(9):803-10.

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

Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M, Konishi N. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(4):227-33.

Oliveira DT, Moraes RV, Fiamengui Filho JF, Fanton Neto J, Landman G, Kowalski LP. Oral verrucous carcinoma: a retrospective study in São Paulo region, Brazil. *Clin Oral Invest.* 2006;10(3):205-9.

Parise Júnior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. Sarvier: São Paulo, 2000, 256p.

Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res.* 2001;7(3):462:8.

Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):167-77.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *JCDA.* 2007;73(4):339-44

Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:423-31.

Rapoport A, Kowalski LP, Herter NT, Brandão LG. Rastreamento, diagnostico e tratamento do cancer de boca. Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoco. 2001.

Roskoski Jr. R, Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression, Crit. Rev. Oncol./Hematol. 2007; 62(3):179-213.

Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. Trends in Immunology. 2004;25(7):387-95.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. Am J Pathol. 2005;166(3):913-21.

Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Hönigschnabl 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(8):455-60.

Scholl FG, Gamallo C, Vilar S, Quintanilla M. Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. J Cell Sci. 1999;112(24):4601-13.

Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. Carcinogenesis. 2006;27(9):1729-38.

Shi SR, Guo J, Cote RJ, Young LL, Hawes D, Shi Y, Thu S, Taylor CR. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. Appl Immunohistochem. 1999;7(3):201-8.

Shibahara J, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M. Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system. Virchows Arch. 2006;448(4):493-9.

Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C and D in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2004;40(1):13-20.

Simpson A. Aspectos genomicos do cancer. Pesquisa FAPESP. Especial abril-setembro 2008; 15-8.

Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama K, Tilakaratne WN, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer J Clin Pathol. 2008;61(1):103-8.

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M.. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med. 2001;7(2):192-8.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, Säily M, Pääkko P, Koistinen P. 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;39(2):179-86.

Stacker SA, Hughes RA, Achen MG. Molecular targeting of lymphatics for therapy. Curr Pharm Des. 2004;10(1):65-74.

Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, Chou CH, Jeng YM, Wang MY, Chang KJ, Hung MC, Kuo ML. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. Cancer Cell. 2006;9(3):209-23.

Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. Br J Cancer. 2007;96(4):541-5.

Su JL, Chen PS, Chien MH, Chen PB, Chen YH, Lai CC, Hung MC, Kuo ML. Further evidence for expression and function of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer cells. Cancer Cell. 2008 Jun;13(6):557-60.

Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor –A and –C, and receptors 1 and 3: Correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. Int J Mol Med. 2004;14(3):389-95.

Tervala T, Suominen E, Saaristo A. Targeted treatment for lymphedema and lymphatic metastasis. Ann N Y Acad Sci. 2008;1131:215-24.

Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(6):442-54.

Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. Anticancer Res. 1999;19:3503-10.

Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 2006;107(1):563-9.

Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer*. 2006;95(12):1611-25.

Walvekar RR, Chaukar DA, Deshpande MS, Pai PS, Chaturvedi P, Kakade A, Kane SV, D'Cruz AK. Verrucous carcinoma of the oral cavity: A clinical and pathological study of 101 cases. *Oral Oncol*. In press 2008.

Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk Jr JJ, Ord RA, Wahl SM.. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral and Maxillofac Surg*. 2007;65(3):475-84.

Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006;9(4):261-72.

Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumor invasion. *Br J Cancer*. 2007;96(1):1-5.

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

Apêndices

APÊNDICE A – Formulário utilizado para a coleta de dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca.

Registro da coleta de dados

Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

Departamento de Estomatologia – Área de Patologia

Fundação Antônio Prudente / Hospital do Câncer

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

Departamento de Anatomia Patológica

**Significado clínico da expressão do VEGF-C em carcinomas espinocelulares de boca
com baixo potencial metastático**

Aroldo dos Santos Almeida; Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira;

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski; Prof. Dr. Gilles Landman

I. Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____
2. RGH: _____
3. Idade: _____ anos
4. Gênero: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino
5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-não branca

II. História clínica:

6. Tempo de história: _____ meses (999 se desconhecido)
7. Tabagismo: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-desc.
8. Etilismo: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-desc.

III. Exame loco-regional:

9. Local do tumor: ☐ 1-língua ☐ 2-assoalho
10. Extensão do tumor: ☐ 0-não ☐ 1-língua ☐ 2-assoalho ☐ 3-gengiva ☐ 4-retromolar ☐ 5-lábio ☐ 6-jugal ☐ 7-palato ☐ 8-loja amigdalina
11. Linha média: ☐ 0-não compromete ☐ 1-compromete ☐ 9- desc.
12. Tipo de lesão: ☐ 1-úlcerovo-vegetante ☐ 2-úlcerovo-infiltrativa ☐ 3-outra _____
13. Diâmetro aproximado da lesão: _____ cm
14. Estádio T (UICC 2002): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2
15. Estádio N (UICC 2002): ☐ 0-N0

IV. Cirurgia:

16. Data da cirurgia: ____/____/____

17. Esvaz. cervical ipsilateral: ☐ 0-não ☐ 1-sim18. Esvaz. cervical contral. (simult.): ☐ 0-não ☐ 1-sim

19. Data da alta hospitalar: ____/____/____

V. Radioterapia pós-operatória:20. ☐ 0-não ☐ 1-sim

21. Data do início ____/____/____ (em branco se não fez)

22. Data do final: ____/____/____ (em branco se não fez)

VI. Análise microscópica:

23. Número do AP: _____

24. Anatomopatológico do tumor primário: ☐ 1-CEC I ☐ 2-CEC II ☐ 3-CEC III ☐ 4-CEC SOE25. Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-linfática ☐ 2-sangüínea ☐ 3-ambas ☐ 9-ignorado26. Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado27. Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado28. Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado29. Infiltração de glândulas salivares: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado30. Margens: ☐ 0-livres ☐ 1-presentes ☐ 2-comprometidas ☐ 9-ignorado

31. Número de linfonodos comprometidos ipsilaterais: _____ (99 se não esv.)

32. Número de linfonodos dissecados ipsilaterais: _____ (999 se não esv.)

33. Número de linfonodos comprometidos contralaterais: _____ (99 se não esv.)

34. Número de linfonodos dissecados contralaterais: _____ (999 se não esv.)

35. pN: ☐ 0-negativo ☐ 1-positivo ☐ 9-sem esvaziamento cervical**VII. Evolução:**

36. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (em branco se não teve)

37. Locais de recidiva: ☐ 0-não teve ☐ 1-local ☐ 2-pescoço ipsi ☐ 3-pescoço contra ☐ 4-pulmão ☐ 5-osso ☐ 6-fígado ☐ 7-outra à distância _____ ☐ 8-teve recidiva, local ignorado

38. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (em branco se não teve)

39. Local do segundo tumor primário: _____ (0 se não teve)

40. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____

Situação na última informação de seguimento: ☐ 1-vivo 000 ☐ 2-vivo com CA ☐ 3-MOCI ☐ 4-MOCA ☐ 5-MOASS _____ ☐ 6- perdido de vista (definição: pacientes com menos de 5 anos de seguimento e que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como vivo 000).

APÊNDICE B – Numero de campos e area percorrida no *front* de invasão para cada espécime de carcinoma espinocelular bem diferenciado de boca, segundo o anticorpo utilizado.

AP	VEGF-C		Podoplanina	
	Numero de campos	Area percorrida por tumor em μm^2	Numero de campos	Area percorrida por tumor em μm^2
174148	17	1597864,85	9	845928,45
174860	30	2819761,50	23	2161817,15
175343	30	2819761,50	12	1127904,60
181691	30	2819761,50	20	1879841,00
186195	30	2819761,50	NE	NE
192354	30	2819761,50	20	1879841,00
192391	30	2819761,50	20	1879841,00
197625	30	2819761,50	20	1879841,00
203866	30	2819761,50	20	1879841,00
209105	30	2819761,50	21	1973833,05
216802	30	2819761,50	20	1879841,00
221804	30	2819761,50	NE	NE
222734	30	2819761,50	20	1879841,00
225157	30	2819761,50	NE	NE
226727	30	2819761,50	22	2067825,10
228211	30	2819761,50	20	1879841,00
239685	30	2819761,50	22	2067825,10
244169	30	2819761,50	20	1879841,00
249200	26	2443793,30	15	1409880,75
261120	30	2819761,50	20	1879841,00
276057	30	2819761,50	24	2255809,20
281929	30	2819761,50	NE	NE
284175	30	2819761,50	26	2443793,30
285288	30	2819761,50	17	1597864,85
287411	30	2819761,50	20	1879841,00
288129	30	2819761,50	NE	NE
292886	30	2819761,50	18	1691856,90

AP	VEGF-C		Podoplanina	
	Numero de campos	Area percorrida por tumor em μm^2	Numero de campos	Area percorrida por tumor em μm^2
297930	30	2819761,50	20	1879841,00
301981	30	2819761,50	20	1879841,00
307344	30	2819761,50	20	1879841,00
307812	30	2819761,50	NE	NE
311998	30	2819761,50	20	1879841,00
312701	30	2819761,50	19	1785848,95
314126	30	2819761,50	13	1221896,65
316804	30	2819761,50	21	1973833,05
318038	30	2819761,50	21	1973833,05
322405	30	2819761,50	19	1785848,95
324829	30	2819761,50	NE	NE
335913	30	2819761,50	20	1879841,00
B97-6746	30	2819761,50	NE	NE
B99-3935	30	2819761,50	20	1879841,00
BA1-4598	30	2819761,50	NE	NE

AP: número de registro do exame anatomopatológico do paciente. NE: não estudado

APÊNDICE C – Distribuição dos escores de malignidade nos 43 carcinomas espinocelulares de boca, segundo o índice de malignidade do *front* de invasão tumoral, de BRYNE et al. (1989). Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1980 a 2000.

AP	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS					S
	Q	PN	M	PI	RH	
174148	2	2	2	2	1	9
174860	2	2	2	3	1	10
175343	1	1	1	2	1	6
181691	1	2	2	2	2	9
186195	1	2	2	3	2	10
192354	1	2	2	1	1	7
192391	2	1	1	1	1	6
197625	2	1	1	1	1	6
203866	1	1	1	1	1	5
209105	1	1	2	3	2	9
216802	3	2	1	3	3	12
221804	1	1	1	1	1	5
222734	1	1	2	1	2	7
225157	1	2	1	2	2	8
226727	1	2	2	2	2	9
228211	1	1	2	2	2	8
239685	2	1	1	2	2	8
244169	1	1	2	1	1	6
249200	1	1	1	1	1	5
261120	3	2	1	3	2	11
276057	1	1	1	2	2	7
281929	2	2	2	2	1	9
284175	1	2	2	2	2	9

AP	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS					S
	Q	PN	M	PI	RH	
285288	2	2	2	2	2	10
287411	2	3	1	3	1	10
288129	2	2	1	2	1	8
292886	1	1	1	2	2	7
297930	1	1	2	1	2	7
300343	1	1	1	1	1	5
301981	1	1	1	2	3	8
307344	1	1	1	2	2	7
307812	2	1	2	3	2	10
311998	2	1	1	2	2	8
312701	1	1	2	2	1	7
314126	1	1	1	1	1	5
316804	2	1	2	2	1	8
318038	2	2	1	2	1	8
322405	1	1	1	2	2	7
324829	2	1	1	2	1	7
335913	1	1	1	1	1	5
B97-6746	1	1	1	1	2	6
B99-3935	1	1	1	1	2	6
BA1-4598	2	1	1	1	3	8

AP: número de registro do exame anatomopatológico do paciente; Q: grau de queratinização; PN: polimorfismo nuclear; M: número de mitoses; PI: padrão de invasão; RH: resposta do hospedeiro; S: soma dos escores.

Anexo

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisa e Tratamento do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, Brasil.

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 17 de Dezembro de 2007.

Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref.: Projeto de Pesquisa nº 1022/07
“Significado clínico da expressão do VEGF-C em carcinomas espinocelulares de boca com baixo potencial metastático”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 11/12/2007, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Justificativa da não apresentação do Orçamento Financeiro;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Carta de Comprometimento do Curso de Pós-graduação em patologia Bucal da FOB-USP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Luiz Fernando Lima Reis
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa