UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA PAULA MADI

**Análise microscópica quantitativa da influência do processo
inflamatório na angiogênese tumoral**

BAURU
2014

ANA PAULA MADI

**Análise microscópica quantitativa da influência do processo
inflamatório na angiogênese tumoral**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Versão Corrigida

BAURU
2014

M265a Madi, Ana Paula
Análise microscópica quantitativa da influência
do processo inflamatório na angiogênese tumoral –
Bauru, 2014.
106 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis
Taveira

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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 da FOB-USP
Protocolo nº CAAE: 23528214.6.0000.5417
Data: 10/03/2014

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
--------	-------	------------	---------

Folha de Aprovação

DEDICATÓRIA

*Com enorme carinho,
Dedico a concretização deste sonho a vocês, pessoas
fundamentais de mais um objetivo alcançado
em minha vida, meus familiares:
Osíres, Maria Inês, Nassim e Cláudio.*

*Aos meus pais, fonte de sabedoria, conselheiros dos momentos
decisivos, meus maiores e melhores amigos, mestres
e guias da minha formação moral, meu sincero
e eterno obrigado por me ensinarem e ajudarem
a viver e acreditarem nos meus ideais.
Amo vocês!!!*

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, pela vida, pela proteção, pela força e pela luz que me guia e ilumina meus caminhos.

À Minha Família

Aos meus adoráveis pais, **Osires Madi** e **Maria Inês Garrone Madi**, pelo constante apoio, dedicação, pelo amor incondicional, pela paciência, orientação, pela liberdade de escolha e incentivos. Vocês sempre acreditaram em mim, sempre fizeram muito por mim, e ainda fazem muito. Em todos os momentos de minha vida vocês sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, me dando força, desejando sempre a minha felicidade. Vocês são tudo que é de mais importante em minha vida. Amo vocês, estejam onde estiverem...

Ao meu irmão, **Nassim**, que sempre do seu jeito calado está me demonstrando seu amor, carinho e zelo. Agradeço por ter você ao meu lado nos momentos mais importantes em minha vida.

Ao meu marido, **Cláudio**, pela paciência e por compreender minha ausência durante alguns momentos, pelo apoio nos momentos de alegria e tristeza, por ter me ajudado e apoiado em mais essa etapa da minha vida, e com certeza não esquecerei de todo o seu carinho, amor e paciência dado nessa fase, nem dos incentivos de coragem para seguir em frente em momentos tão difíceis de lhe dar. Te amo.

Aos meus avôs maternos, **Magali** e **Walter**, pelas orações e pelo incentivo constante aos meus estudos. O amor e o carinho de vocês sempre foram muito importantes pra mim.

Aos meus avôs paternos, **Nassim** e **Olga**, que mesmo tendo pouco convívio por circunstâncias da lei da vida, sempre estão em meus pensamentos e em meu coração.

A minha prima, amiga e irmã, **Michele**, agradeço pelo carinho, amor, amizade, por todos os momentos de convívio. Obrigada por fazer parte da minha vida e dividir minhas alegrias e angústias.

As minhas sobrinhas, **Bruna, Luiza, Yasmin, Tainá, Nina** e a minha afilhada **Nanda**, pelos vários momentos de carinho, alegria e descontração que sempre me proporcionam.

A minha tia **Ednéia**, obrigada pela atenção, o carinho, pelos ouvidos que sempre me escutaram nos meus momentos de desespero. Obrigada por estar ao meu lado no momento mais triste de minha vida, obrigada também pelas leituras (livros e emails) que me fazem pensar e acrescentam no meu desenvolvimento pessoal.

A minha madrinha **Maria do Carmo** e minha prima **Eloína**, que apesar da distância estão sempre torcendo pelo meu conhecimento profissional.

Ao grupo que chamamos de “**ASAMIGAS**”, que não vou colocar os nomes para não me esquecer de nenhuma, vocês todas são muito importante para mim, cada uma com uma característica que no final cada uma delas completa a todas nós. Obrigada por existirem e por sempre estar uma apoiando a outra em todos os momentos.

“Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”. (*W. Shakespeare*)

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, que quando deveria ser simplesmente professor, foi meu mestre transmitindo seus conhecimentos e experiências de vida; que quando deveria ser mestre foi meu amigo e em sua amizade me compreendeu e incentivou a seguir pelo melhor caminho, expresso os meus maiores agradecimentos e o meu profundo respeito, que sempre serão poucos diante do muito que me foi oferecido. Obrigada pela orientação e ensinamento. Minha eterna gratidão pela oportunidade de ter convivido com o senhor durante esse tempo!

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira** agradeço pelo cuidado especial ao me ensinar a análise crítica pela qual a ciência deve ser encarada, pelo exemplo de dedicação à carreira acadêmica e pelos ensinamentos durante o curso.

À **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** obrigada pelo auxílio e orientações durante o curso, contribuindo para o meu aprendizado. Admiro-a por sua competência e dedicação. Agradeço também pela gentileza de permitir o uso de seu microscópio para realizar as fotos desse trabalho.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira** e **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara**, por dividirem ensinamentos e por toda atenção durante o curso de mestrado, contribuindo para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

“O verdadeiro mestre é aquele que transmite uma realidade universal, não foge aos objetivos, aponta novos horizontes e perspectivas.”

Ao **Prof. Dr. Cléverson Teixeira Soares**, médico patologista, agradeço os conhecimentos transmitidos e as oportunidades de aprendizado sempre com demonstração de muita dedicação e profissionalismo.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, da Estatística, pela ajuda com seus conhecimentos e pela contribuição para este trabalho.

À **Cris**, secretária da disciplina de Patologia Bucal da FOB-USP, agradeço a dedicação, a paciência e o carinho ao decorrer desses anos.

À **Marina**, secretária da disciplina de Patologia Bucal da FOB-USP, agradeço todo carinho e afetos por mim nesses anos de convívio.

À **Fatiminha**, técnica do laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP, por todo seu conhecimento técnico e ensinamentos. Uma pessoa com gestos muito especiais e doces.

À **Regina**, uma pessoa que conheci há oito anos e me identifiquei muito. Muito bom lhe ter por perto praticamente todos os dias da semana mesmo sendo contatos rápidos, porém muito verdadeiro. Obrigada primeiramente pela confiança, amizade, troca de carinho, incentivo profissional.

Ao **CEO**, agradeço a DEUS a cada dia por estar lá! Obrigada pelo convívio de todos os colegas diariamente e pelo apoio de todos durante o mestrado.

À **Mariana**, uma pessoa muito dedicada que me acolheu quando cheguei ao departamento de Patologia da FOB, o convívio com você foi muito bom!

Aos amigos **Pepe, Francisco, Nath, Mariana, Agnes, Diego, Alexandre, Taiane, Karen, Kellen, Helinton, Rafaela e Felipe**, agradeço a todos vocês a esse período de convivência e aprendizado que passamos juntos, pela amizade e incentivos. Foi muito bom conhecer vocês! Meus sinceros agradecimentos pela contribuição e o apoio prestados a mim durante essa jornada! **Pepe**, obrigada pela amizade e pela disponibilidade em me ajudar nos momentos que precisei de “uma dupla”.

“Aqueles que passam por nós não vão só, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (Felipe Cortelline Roque)

Ao técnico de laboratório do Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (Anatomed), **Daniel**, que dividiu comigo um pouco de seu conhecimento sobre a técnica de imunoistoquímica de forma bem paciente.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À comissão de Pós-Graduação de Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof.** Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

À **Prof. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Aos **funcionários da Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia e Bauru da Universidade de São Paulo, por toda a eficácia.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por todos os esclarecimentos e eficiência.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; se não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.*

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

Os carcinomas de cabeça e pescoço representam um problema na saúde pública, sendo a oitava causa no mundo de morte por câncer. A taxa de crescimento do tumor, o seu local de expansão, bem como a metástase das células cancerígenas depende muito da vascularização do tumor, sendo que esta é a responsável pelo fornecimento constante de nutrientes e de oxigênio para o crescimento tumoral. Sendo assim a angiogênese é considerada um processo essencial dentro do processo neoplásico. A avaliação dos vasos sanguíneos tumorais neoformados em carcinomas espinocelulares de boca, usando o anticorpo CD105, mostra um crescimento significativo da densidade microvascular. Baseado nestes, o objetivo do trabalho é avaliar através da imunoistoquímica a possível correlação de aumento no número de vasos sanguíneos correlacionando com diferentes grupos de processo inflamatório divididos em: pouco, moderado e intenso infiltrado inflamatório no *front* tumoral. Na literatura os autores de um modo geral correlacionam infiltrados inflamatórios e angiogênese, neste trabalho tentamos correlacionar se um maior ou menor infiltrado inflamatório tem influência nessa angiogênese. As lâminas foram avaliadas microscopicamente por dois profissionais de forma que eles não sabiam da classificação dada pelo outro e só quando ambos estavam em comum acordo essas lâminas foram classificadas. Para a análise estatística foi realizado a comparação múltipla entre os 03 grupos através da Análise de variância (comparação das três médias) e também o teste de Tukey, onde se observou diferença entre os grupos I e III e nos grupos II e III, porém entre os grupos I e II não houve diferença significativa. Com isso os resultados nos mostram uma correlação positiva entre a presença de maior quantidade de vasos sanguíneos, onde se encontra maior quantidade de infiltrado inflamatório, quando comparado com áreas de menor infiltrado inflamatório.

PALAVRAS CHAVES: Inflamação. Carcinoma de células escamosas. Angiogênese Patológica. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Quantitative microscopic analysis of the influence of inflammation in tumor angiogenesis

Carcinomas of the head and neck represent a public health problem, being the eighth leading cause of worldwide cancer deaths. The growth rate of the tumor, its location expansion and metastasis of cancer cells depends greatly on tumor vascularity, and this is responsible for the constant supply of oxygen and nutrients for tumor growth. Thus angiogenesis is considered an essential process within the neoplastic process. The evaluation of newly formed tumor blood vessels in oral squamous cell carcinoma using the CD105 antibody, shows a significant increase in microvascular density. Based on these, the goal is to evaluate by immunohistochemistry the possible correlation of an increased number of blood vessels correlate with different groups of inflammatory process divided into: minor, moderate and intense inflammatory infiltrate in the tumor front. In the literature, authors generally correlated angiogenesis and inflammatory infiltrates, in this work we try to correlate to a greater or lesser inflammatory infiltrate that affects angiogenesis. The slides were evaluated microscopically by two professionals so that they did not know the rating given by others and only when both were in agreement these slides were classified. For statistical analysis, the multiple comparisons between the three groups was performed by analysis of variance (comparison of three average) and also the Tukey test, where a difference was observed between groups I and III and groups II and III, but between groups I and II significativa. Com that there was no difference in the results show a positive correlation between the presence of a larger amount of blood vessels, where it is most inflammatory infiltrate when compared to areas of lesser amounts of inflammation.

KEY WORDS: Inflammation. Squamous cell carcinoma. Neovascularization Pathologic. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inter relações entre angiogênese e inflamação.....	39
Figura 2 -	Corte microscópico do <i>front</i> de invasão tumoral de carcinoma espinocelular utilizado como controle positivo interno.....	52
Figura 3 -	Avaliação da expressão imunoistoquímica do anticorpo anti-CD105 nos carcinomas espinocelulares de boca. A - Obtenção das imagens através do Programa Axiovision Rel. 4.6. B - Imagens analisadas quanto à quantificação da densidade microvascular intratumoral (MVD).....	53
Figura 4 -	Recorde da tabela utilizada para coleta da contagem dos vasos sanguíneos.....	54
Figura 5 -	Cortes microscópicos em HE representativos de carcinoma espinocelular de boca (400X). Onde foi avaliado a quantificação do processo inflamatório.....	59
Figura 6 -	Corte microscópico representando a imunoistoquímica para o anticorpo CD105 em carcinoma espinocelular de boca (20X).....	61
Figura 7 -	Fotomicrografia representando o Grupo II fotografado – A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva se 10X e C) com objetiva de (40X).....	63
Figura 8 -	Fotomicrografia representando o Grupo III fotografado - A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva 10X e C) com objetiva de	
Figura 9 -	(40X).....	65
	Fotomicrografia representando o Grupo IV fotografado - A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva de 10X e C) com objetiva de (40X).....	67
Figura 10	Cortes microscópico representando a imunoistoquímica com o anticorpo CD105 em carcinoma espinocelular de boca, com imagens de uma única lâmina contendo 10 campos diferentes fotografados com objetiva de 40 para a contagem dos vasos sanguíneos.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de pizza representando a porcentagem da amostra trabalhada em cada grupo.....	57
Gráfico 2 - Gráfico de colunas representando a média e a soma total de vasos encontrados em cada grupo estudado.....	73
Gráfico 3 - Gráfico de colunas do grupo II - pouco processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105.....	74
Gráfico 4 - Gráfico de colunas do grupo III - moderado processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105.....	75
Gráfico 5 - Gráfico de colunas do grupo IV - intenso processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpo e protocolo de reação imunoistoquímica.....	50
Tabela 2 - Distribuição dos valores correspondentes ao número de vasos avaliados nos carcinomas no Grupo II, Grupo III e Grupo IV utilizando a técnica da imunoistoquímica para identificação e contagem dos vasos sanguíneos, com a média e resultado estatístico.....	73
Tabela 3 - Comparação entre os três grupos: II, III e IV através do Teste de Tukey.....	74

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANATOMED	Laboratório de Anatomia Patológica de Bauru
CA	Câncer
CEC	Carcinomas Espinocelulares
CD105	Endogлина
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
IFN-γ	Interferon gamma
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
μm	Micrometro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MVC	Contagem Microvascular
MVD	Densidade Microvascular
MVV	Volume Microvascular
NK	Célula Natural Killer
pH	Potencial hidrogeniônico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
VEGF	Vascular endothelial growth fator (Fator de crescimento endotelial vascular)
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular - A
VEGF-B	Fator de crescimento endotelial vascular - B
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular - C
VEGF-D	Fator de crescimento endotelial vascular - D
VEGF-F	Fator de crescimento endotelial vascular - F

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	NEOPLASIA	29
2.2	ANGIOGÊNESE	31
2.3	ANGIOGÊNESE TUMORAL	32
2.4	IMUNOISTOQUÍMICA.....	34
2.5	FATOR DE CRESCIMENTO	35
2.5.1	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	35
2.6	MARCADOR CD105 (Endoglinta)	37
2.7	DENSIDADE MICROVASCULAR E CÂNCER	38
2.8	INFLAMAÇÃO X ANGIOGÊNESE	38
2.9	IMUNIDADE	40
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAL DE ESTUDO	47
4.2	REGISTROS DE DADOS CLÍNICOS.....	48
4.3	VARIÁVEIS DO ESTUDO	48
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	48
4.4.1	Avaliação do processo inflamatório nas lâminas coradas por HE	49
4.4.2	Técnica Imunoistoquímica	49
4.4.3	Avaliação da expressão Imunoistoquímica do CD105	53
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.6	REGISTRO FOTOGRÁFICO	54
4.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	54

5	RESULTADOS.....	55
5.1	CASUÍSTICA.....	57
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	57
5.2.1	Classificação do processo inflamatório	61
5.2.2	Avaliação da expressão do anticorpo CD105	69
5.2.3	Correlação entre processo inflamatório e o marcador imunohistoquímico.....	74
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXO.....	101

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A definição de saúde bucal não é consenso na literatura e pode-se considerar que um paciente apresenta condições inadequadas de saúde bucal quando se encontra qualquer espécie de processo inflamatório, infeccioso, traumático ou ainda má higiene bucal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

A palavra câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células malignas que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, ocorrendo assim à metástase (INCA, c2013). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco à vida.

O câncer de cavidade bucal é constituído pelas neoplasias malignas, localizadas nas superfícies da mucosa do lábio, assoalho de boca, língua, mucosa bucal, gengiva, palato duro e trígono retromolar, podendo também envolver as glândulas salivares maiores e menores e tecidos subjacentes (HUANG; O'SULIVAN, 2013).

Cerca de 263 mil novos casos são diagnosticados a cada ano, sendo que destes o de cabeça e pescoço são os mais frequentes. As estatísticas para os tumores de cabeça e pescoço indicam que mais da metade desses casos sobrevivem (127.654 mortes por ano) (FERLAY et al., 2008).

Esses tumores malignos, de cabeça e pescoço, são representados, na sua imensa maioria, por neoplasias epiteliais do tipo carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas (CEC) que acometem as vias aerodigestivas superiores. Trata-se de doenças neoplásicas das mais frequentes no Brasil (FRANCO et al., 1989). O tratamento destas neoplasias é complexo, de caráter multidisciplinar. As taxas de controle local e de sobrevida aumentaram com os tratamentos loco regionais avançados nos últimos 30 anos. (FRANCESHI et al., 1993).

Algumas falhas das cirurgias radicais para a cura de pacientes com câncer levaram os cientistas a desacreditarem em algumas teorias do passado e acreditarem que o câncer pode se espalhar pela corrente linfática e sanguínea, antes mesmo de sua detecção clínica, sendo este um resultado determinado muito

mais pela biologia tumoral e suas interações com o hospedeiro (TANIS et al., 2001; RAYTER; MANSI, 2003; DAS; SKOBE, 2008).

Sabe-se hoje que a maioria dos tumores sólidos sofre metástase para os linfonodos regionais, preferencialmente via vasos linfáticos e que este é um dos primeiros sinais de disseminação do câncer nos pacientes (TOBLER; DETMAR, 2006; DAS; SKOBE, 2008). A partir do sistema linfático, as células neoplásicas podem ser transportadas para a circulação e podem se espalhar para órgãos e tecidos distantes, através dos vasos sanguíneos (CAO, 2005; TOBLER; DETMAR, 2006; ACHEN; STACHER, 2008).

Os tumores estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos do hospedeiro, num processo chamado de angiogênese, essencial para fornecer os nutrientes para o tumor (FOLKMAN, 2002). Logo, a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essa neovascularização um aspecto bem estabelecido e fundamental na biologia do câncer (FOLKMAN, 1974; EICHHORN et al., 2007).

A angiogênese é essencial para o crescimento da grande maioria dos tumores primários e de suas metástases. Os tumores podem absorver nutrientes e oxigênio suficientes por difusão simples, até o tamanho de 1 a 2 mm, sendo que a partir desse ponto o tumor requer a elaboração de um suprimento vascular para continuar progredindo. Acredita-se que esse processo envolve o recrutamento de vasos maduros, vizinhos ao tecido hospedeiro para iniciar o desenvolvimento de novos capilares sanguíneos os quais crescem em direção à massa tumoral, infiltrando-a. Os tumores podem crescer pelo compartilhamento de vasos sanguíneos existentes no tecido hospedeiro. Os vasos envolvidos pelo tumor poderão sofrer alterações que geram um ambiente de hipóxia, que será o fator de estimulação da angiogênese na margem tumoral. O controle da angiogênese tumoral depende do balanço de vários fatores ativadores (fatores angiogênicos) e inibidores (fatores antiangiogênicos), que podem ser secretados pelas células tumorais, assim como por leucócitos e fibroblastos (FERRARA, 2004; EICHHORN et al., 2007).

A taxa de crescimento do tumor, o seu local de expansão, bem como a metástase das células cancerígenas, depende da vascularização do mesmo e da capacidade de vasos sanguíneos para fornecer uma fonte constante de substâncias

nutritivas e de oxigênio para eliminar os produtos residuais, resultado do crescimento tumoral (BUNGET et al., 2013).

Os fatores angiogênicos são liberados pelas células envolvidas com as lesões, como por exemplo os macrófagos ativados, considerados uma das principais fontes de fatores angiogênicos, os mastócitos e os linfócitos, os quais além de secretar fatores angiogênicos, também secretam citocinas e fatores quimiotáticos para as células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992).

As células endoteliais expressam o receptor CD40, seu reconhecimento e ligação pelos linfócitos T CD4. Determina ainda a ativação das células endoteliais e neovascularização (MACH et al., 1999).

Uma vez que os fatores estimuladores da angiogênese podem ser detectados em tecidos nos quais aparentemente não há angiogênese, acredita-se que a manutenção da quiescência endotelial seja, essencialmente, devida à presença de inibidores angiogênicos (PEPPER, 2001).

Como a maioria dos outros processos biológicos, a angiogênese é o resultado de complexas interações entre os fatores inibidores e efetores (PEPPER, 2001). A alteração no equilíbrio entre estes fatores desencadeia o fenótipo angiogênico em algumas condições patológicas, podendo levar as células a exibir expressão excessiva de um ou mais fatores estimuladores da angiogênese, a mobilizar uma proteína angiogênica da matriz extracelular e/ou recrutar células hospedeiras sintetizadoras de fatores angiogênicos (FOLKMAN, 1995; HANAHAN, 1996).

A super expressão de fatores angiogênicos pode induzir a formação cística, desenvolvimento, invasão e metástase de tumores (ZANG, et al., 2006).

De longa data, sabe-se que a imunidade inativa e adaptativa inicia um importante papel na vigilância imune e destruição tumoral, sendo que a presença do infiltrado imune/inflamatório em contato com as células neoplásicas pode representar uma resposta imunológica favorável do hospedeiro contra o câncer (MACH et al., 1999). Porém, sabe-se também que a correlação entre a intensidade dos processos de angiogênese e linfangiogênese com a intensidade do infiltrado inflamatório crônico no estroma do tumor mostrou que onde o número de vasos sanguíneos apresentava maior quantidade era onde se observava um intenso infiltrado inflamatório, além do papel desempenhado pelas células do sistema imunitário para o desenvolvimento do tumor (BUNGET et al., 2013).

A resposta inflamatória é um processo ativo no câncer e pode atuar na progressão e/ou regressão da lesão. No local da inflamação, os macrófagos e neutrófilos estão presentes, bem como as citocinas, tais como TNF - α e IFN- γ (LAGES et al., 2011).

Imunoistoquímica ou IHQ se refere ao processo de localizar antígenos (e.g. proteínas) em células de uma amostra de tecido, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico (RAMOS-VARA, 2005). O nome da técnica provém das raízes "imuno", em referência aos anticorpos utilizados no procedimento, e "histo", significando tecido. A marcação de imunoistoquímica é amplamente utilizada no diagnóstico de células, tais como aquelas encontradas em neoplasias. Marcadores moleculares específicos são característicos de eventos celulares particulares, tais como proliferação ou morte celular (apoptose). IHQ é também amplamente utilizada na pesquisa básica para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas diferentemente expressas em partes de um tecido biológico. A visualização de uma interação antígeno-anticorpo pode ser obtida de diversas formas.

Numerosas proteínas, incluindo os fatores/receptores de crescimento, moléculas de adesão celular e produtos de oncogenes ou genes supressores tumorais, são especialmente examinadas através de secções de material tumoral embebido em parafina e fixado em formalina, por técnicas de imunoistoquímicas que usam anticorpos específicos (TAHARA, 2005).

A endoglina, também conhecida como o grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*) número 105 (CD105) (GOUGOS et al., 1988) é uma glicoproteína presente em níveis elevados no endotélio da microvasculatura humana (CHEIFETZ, 1992) e em células endoteliais de tecidos que estão em angiogênese ativa, tecidos em regeneração, processos inflamatórios e tumores (LOMONTE, GUITIÉRREZ, 1989; KUDO et al., 1993; FUH et al., 1998; FONSATTI et al., 2003). O gene codificador da endoglina encontra-se localizado no cromossomo 9q34 e foi identificado utilizando hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (FERNANDEZ-RUIZ et al., 1993).

A descoberta que os níveis de CD105 regulam a expressão de diferentes componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, inibidor de plasminogênico ativado 1 (PAI-1) e lumican (RABIN, 2006; SERVICE, 2008;

AACHAMAN, 2009), também sugere que o CD105 possa estar envolvido no processo de migração celular (KERBEL, 2008).

A idéia de que CD105 pode ser associada com angiogênese do tumor desenvolvido a partir de observações de que CD105 foi fortemente sobre-regulada no endotélio de vários tecidos tumorais em comparação com tecidos sem patologia tumoral. (WANG et al., 1998; KUMAR; WANG, 1996).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIA

No organismo verificamos formas de crescimento celular, que podem ser controladas e não controladas. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos de crescimento controlado, enquanto que as neoplasias correspondem às formas de crescimento não controladas e são denominadas, na prática, de “tumores” (INCA – Ministério da Saúde. c2014).

O crescimento (multiplicação) e a diferenciação (especialização morfológica e funcional) celular são processos essenciais para os seres vivos. A multiplicação celular é indispensável durante o desenvolvimento normal dos organismos e necessário para repor as células que morrem pelo processo natural de envelhecimento. As especializações morfológicas e funcionais permitem o desenvolvimento do organismo como um todo integrado. Esses dois processos recebem influências de um grande número de agentes internos e externos as células. Não é surpresa que com certa frequência, surjam transtornos nos mecanismos que os controlam. A multiplicação e a diferenciação celular esta sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Alterações nesse sistema regulatório resultam em distúrbios do crescimento e da diferenciação ou de ambos ao mesmo tempo. As alterações do crescimento e da diferenciação celular, onde a proliferação é autônoma e, geralmente acompanhada de perda de diferenciação, é chamada neoplasia (BRASILEIRO-FILHO et al., 2000).

Willis, R. A. em 1952 definiu as neoplasias como sendo uma “massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos normais e persiste na mesma maneira excessiva depois de interrupção dos estímulos que originaram a mudança”. A persistência do crescimento tumoral, com ausência de estímulo é resultado de alterações genéticas hereditárias na célula tumoral progenitora. Estas alterações levam a proliferação excessiva e desregulada tornando-a autônoma (KUMAR; ABBAS; FAUSTON, 2005).

A palavra câncer (CA) tem origem no latim cujo significado é caranguejo, sendo adotado porque as células doentes atacam e se infiltram nas células saudáveis. Caracteriza-se por um crescimento desordenado de células que podem se disseminar para outras regiões do corpo além do local da lesão inicial (metástases). A palavra câncer vem a ser um termo genérico apenas para as neoplasias malignas. (ROBBINS, 2010).

Do ponto de vista clínico, evolutivo e comportamental, as neoplasias são divididas em duas categorias: as benignas e as malignas. As neoplasias benignas em geral têm suas células bem diferenciadas, as atípicas celulares e arquiteturais são discretas, possuem baixo índice mitótico, o crescimento tende a ser lento e expansivo, o tumor é bem delimitado e geralmente não recidivam após ressecção cirúrgica. As neoplasias malignas apresentam algumas características tais como alterações na expressão gênica com tendência a síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária, suas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células normais, as células são mais resistentes a hipóxia, são mais indiferenciadas, tem menos adesão entre si, tem motilidade considerável, geralmente dão metástase (BRASILEIRO-FILHO et al., 2000).

Todas as neoplasias têm como componente básico o parênquima constituído pelas células tumorais e o estroma, composto principalmente de vasos neoformados, células inflamatórias (principalmente macrófagos e linfócitos) e de tecido conjuntivo (células e matriz extracelular) (DVORAK, 1986). As células parenquimatosas determinam o comportamento, as consequências patológicas, o crescimento e a evolução do tumor. Entretanto, o tumor é criticamente dependente de seu estroma (KUMAR; ABBAS; FAUSTON, 2005).

A indução de vasos sanguíneos na massa tumoral é um fenômeno complexo que envolve uma multiplicidade de fatores. O estímulo para a angiogênese tumoral é produzir diretamente pelas próprias células neoplásicas e em menor grau e indiretamente pelas células inflamatórias recrutadas no sítio tumoral (ECCLES; ALEXANDER, 1970, RUSSEL et al., 1976, TALMADGE et al., 1981).

2.2 ANGIOGÊNESE

O termo angiogênese é uma palavra de origem grega (aggeïon: vaso, gênese: formação) empregada para conceituar a produção de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, ou melhor, a neoformação vascular. Ela é classificada em angiogênese fisiológica sob circunstâncias fisiológicas controladas, sendo que esta é um processo normal e essencial e também pode ser classificada como angiogênese patológica em situações patológicas em que o processo persiste de forma descontrolada com duração de meses ou anos (POLVERINI, 2002). Ela é notada em grande número de processos fisiológicos como a embriogênese, alterações associadas ao ciclo reprodutivo feminino e reparo tecidual. Em eventos patológicos, pode ser observada nos processos inflamatórios, condições isquêmicas, crescimento tumoral e metástase, é rapidamente iniciada em resposta à hipóxia ou isquemia, a partir da secreção de fatores angiogênicos (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; PEPPER, 1997).

Em 1787, Hunter apud Carmeliet, 2000 foi o pioneiro a usar o termo angiogênese para descrever o crescimento de vasos sanguíneos semelhantes a galhos de árvore. Portanto, na angiogênese, após a formação dos grandes troncos vasculares, os vasos ramificam-se e distribuem-se numa rede vascular complexa. Os vasos neoformados surgem a partir de vasos preexistentes e este processo mantém-se durante toda a vida do indivíduo, respondendo sempre que necessário a alterações na demanda de oxigenação tecidual (SCOTT, 2000).

Em outras palavras a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essa neovascularização um aspecto bem estabelecido e fundamental na biologia do câncer (FOLKMAN, 1974; EICHHORN et al., 2007).

Todas as células dependem de oxigênio e nutrientes para a sua sobrevivência, assim como necessitam eliminar de um modo efetivo seus restos catabólicos. (BERGERS, 2003). Essa necessidade implica em que as células se encontrem próxima a capilares sanguíneos, a uma distância que permita a troca de gases, nutrientes e catabólicos (DANIEL, 2000).

A rede vascular basal é insuficiente em situações de aumento de consumo de oxigênio e nutrientes, como por exemplo, no crescimento e na regeneração tecidual. Para eliminar o déficit nestas situações, o aumento do fluxo sanguíneo decorrente a

vasodilatação muitas vezes não é suficiente, sendo necessária a formação de novos vasos a partir de pré-existentes. Este processo com já mencionado acima se denomina, angiogênese (DANIEL, 2000) (BECK, 1997).

Essa formação pode ser descrita por dois mecanismos distintos de angiogênese: a angiogênese por brotamento (RISAU, 1997) e a angiogênese por intussuscepção (CADUFF, 1986).

A angiogênese por brotamento consiste na degradação proteolítica da matriz extracelular, seguida pela atração quimiotática e proliferação de progenitores endoteliais e células endoteliais circulantes. As células epiteliais, então se reorganizam formando luz no vaso e terminam sua maturação funcional (RISAU, 1997). Já o mecanismo de intussuscepção refere-se ao processo pelo qual um único capilar se divide longitudinalmente em dois pela formação de um septo. Neste caso, as células endoteliais de lados opostos do vaso se estendem intraluminalmente até entrarem em contato formando um septo, levando ao surgimento de dois vasos (CADAUFF, 1986). Ela ocorre quando o sistema capilar se expande “dentro dele mesmo” como, por exemplo, no crescimento do tipo intersticial no tecido cartilaginoso (CADUFF, 1986). Este tipo de angiogênese está envolvido na remodelação vascular (BURRI, 2004).

2.3 ANGIOGÊNESE TUMORAL

A formação de novos vasos sanguíneos é uma das condições essenciais para o desenvolvimento tumoral (HASINA et al., 2001). Maiores níveis de angiogênese estão geralmente associados com um maior risco de metástase e um pior prognóstico para os pacientes (GUPTA et al., 2007).

A angiogênese é essencial para o crescimento da grande maioria dos tumores primários e de sua metástase. Os tumores podem absorver nutrientes e oxigênio suficientes por difusão simples até o tamanho de 1 a 2 mm, sendo que a partir desse ponto o tumor requer a elaboração de um suprimento vascular para continuar progredindo. Acredita-se que esse processo envolva o recrutamento de vasos maduros, vizinhos ao tecido hospedeiro, para iniciar o desenvolvimento de novos capilares sanguíneos os quais crescem em direção à massa tumoral, infiltrando-a. Os tumores podem crescer pelo compartilhamento de vasos

sanguíneos existentes no tecido hospedeiro. Os vasos envolvidos pelo tumor poderão sofrer alterações que geram um ambiente de hipóxia que será o fator de estimulação da angiogênese na margem tumoral. O controle da angiogênese tumoral depende do balanço de vários fatores ativadores (fatores angiogênicos) e inibidores (fatores antiangiogênicos), que podem ser secretados pelas células tumorais, assim como por macrófagos e fibroblastos (FERRARA, 2004; EICHHRORN et al., 2007).

Com exceção da neoformação vascular que ocorre em resposta à injúria tecidual ou nos órgãos reprodutivos femininos, a modificação das células endoteliais em condições fisiológicas é bastante baixa. A angiogênese é rigorosamente controlada por fatores estimuladores angiogênicos endógenos e reguladores negativos da proliferação endotelial, os quais atuam de forma antagônica para manter a quiescência da microvasculatura responsável pela renovação endotelial (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995; PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

Os fatores angiogênicos são liberados pelas células presentes nas lesões, como os macrófagos ativados, considerados uma das principais fontes de fatores angiogênicos, os mastócitos e os linfócitos, os quais além de secretar fatores angiogênicos, também secretam citocinas e fatores quimiotáticos para as células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992).

Além dos fatores angiogênicos descritos, a neovascularização que comumente acompanha respostas imunes e inflamatórias crônicas também pode ser induzida pelas células T do proeminente infiltrado inflamatório crônico que está presente nestas condições. As células endoteliais expressam o receptor CD40 e seu reconhecimento e ligação pelos linfócitos T CD4 determina ativação das células endoteliais e neovascularização (MACH et al., 1999).

Uma vez que os fatores estimuladores da angiogênese podem ser detectados em tecidos nos quais aparentemente não há angiogênese, acredita-se que a manutenção da quiescência endotelial seja, essencialmente, devida à presença de inibidores angiogênicos (PEPPER, 2001).

Os inibidores angiogênicos fazem parte de um extenso grupo de supressores e normalmente defendem o endotélio vascular de um estímulo mitógeno. Dentre eles, destacam-se principalmente a angiostatina e a trombospondina, além da endostatina e a tunstatina. A angiostatina é um fragmento interno do plasminogênio com potente ação inibitória sobre a angiogênese. A trombospondina, por outro lado,

é uma glicoproteína trimérica que modula a angiogênese de forma multifuncional e dose dependente. Em baixas concentrações aumenta a angiogênese, enquanto que em altas doses atua inibindo a proliferação das células endoteliais (FOLKMAN, 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

Como a maioria dos outros processos biológicos, a angiogênese é o resultado de complexas interações entre os fatores inibidores e efetores (PEPPER, 2001). A alteração no equilíbrio entre estes fatores desencadeia o fenótipo angiogênico em algumas condições patológicas, podendo levar as células a exibir expressão excessiva de um ou mais fatores estimuladores da angiogênese, a mobilizar uma proteína angiogênica da matriz extracelular e/ou recrutar células hospedeiras sintetizadoras de fatores angiogênicos (FOLKMAN, 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

A super-expressão de fatores angiogênicos pode induzir à formação cística, desenvolvimento, invasão e metástase de tumores (ZHANG et al., 2006).

POLVERINI (2002) postulou que a angiogênese tumoral pode ter diversas origens: a) expansão dos vasos do hospedeiro para o espaço intratumoral; b) formação de vasos tumorais a partir do estímulo de células endoteliais pré-existentes no tecido adjacente ao tumor; c) formação dos vasos tumorais a partir de precursores endoteliais embrionários (vasculogênese).

2.4 IMUNOISTOQUÍMICA

O nome da técnica Imunoistoquímica ou imunocitoquímica provém das raízes “imuno”, em referência aos anticorpos utilizados no procedimento, e “histo”, significando tecido. É uma técnica que tem relevância no diagnóstico de doenças humanas e veterinárias, e no campo da pesquisa para a detecção de microorganismos e moléculas em diversos materiais. Também pode ser usada na fenotipagem de células tumorais.

O propósito da Imunoistoquímica ou IHQ é reconhecer antígenos e assim identificar e classificar células específicas dentro de uma população celular morfológicamente heterogênea (ou aparentemente homogênea). A visualização do complexo antígeno-anticorpo é possível pela adição de um fluorocromo conjugado ao anticorpo, que pode então ser observado ao microscópio, ou alternativamente

uma enzima, cujo produto de reação pode igualmente ser visualizado. Em alguns casos, os anticorpos não são inteiramente específicos e podem reagir de maneira cruzada com mais de um antígeno, ou pode haver resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos, ambos resultantes de altos níveis de coloração de fundo e adsorção (CAPELOZZI, 2009).

A Imunoistoquímica pode ser aplicada na rotina diagnóstica complementar do câncer para a identificação de marcadores biológicos no diagnóstico e prognóstico (CAPELOZZI, 2009).

Em outras palavras, a Imunoistoquímica é um método muito sensível e específico, que reconhece e localiza os antígenos em amostras histológicas e citológicas, usando um anticorpo.

Rapidis et al. (2009), em trabalho de revisão de literatura, concluíram que a técnica de imunoistoquímica e a identificação de alterações genéticas levam a uma importância significativa do prognóstico, além de adicionar um prognóstico mais preciso pré e pós-operatório.

2.5 FATORES DE CRESCIMENTO

Os fatores de crescimento atuam na estimulação da angiogênese e da divisão celular, na modulação da diferenciação, como agentes quimiotáticos e na indução da síntese de proteínas (TERRANOVA, 1985).

2.5.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor)

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína produzida pelas células que estimula a angiogênese. Ele faz parte do sistema que restaura o fornecimento de oxigênio aos tecidos, quando a circulação do sangue for inadequada. A função normal do VEGF é a criação de novos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário, após a lesão muscular e novos vasos (circulação colateral) para ignorar vasos obstruídos.

Quando o VEGF é abundante, pode contribuir para a doença, como por exemplo, os tumores sólidos não pode crescer além de um tamanho limitado, sem

que haja um suprimento de sangue adequado; ou seja, cânceres que podem expressar VEGF é capaz de crescer e metástase. Drogas tais como bevacizumab podem inibir VEGF e controlar ou retardar as doenças.

Os tumores necessitam de uma quantidade suficiente de suprimento de sangue para crescer. Muitos tumores produzem grandes quantidades de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que auxilia no crescimento dos vasos sanguíneos. Pesquisas estão sendo conduzidas para explorar o uso de VEGF como marcador tumoral em um grande número de tumores.

O Fator de crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um potente gene mitótico das células endoteliais que aumenta a permeabilidade vascular. Níveis de VEGF são elevados em condições inflamatórias e neoplásicas. (MANGINI et al., 2002; OLSSON et al., 2006)

O VEGF é uma sub-família de factores de crescimento, para ser mais específico, a família do factor de crescimento derivado das plaquetas factores de crescimento de cistina-nó. Eles são importantes proteínas sinalizadoras envolvidas em vasculogénese, tanto (a formação de novo do sistema circulatório embrionário) e angiogénese (o crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente).

O membro mais importante é o VEGF-A. Outros membros são factor de crescimento da placenta (PGF), o VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Estes últimos foram detectados mais de VEGF-A, e, antes da sua descoberta, o VEGF-A foi chamado apenas VEGF.

Os genes ou moléculas que participam na invasão tumoral e nas metástases são fatores reguladores de carácter positivo ou negativo. O VEGF promove a formação de vasos sanguíneos no início do desenvolvimento (vasculogénese) e desempenha um papel central no crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese). Seu papel no crescimento tumoral é fundamental, visto que sem vascularização os tumores não podem ultrapassar 1-2 mm de diâmetro ou de espessura. Além disso, a angiogénese é indispensável para a formação de metástases. O VEGF e o fator de crescimento de fibroblastos são dois dos maiores indutores de angiogénese produzidos em câncer de pulmão. (FONTANINI et al., 1997). Há vários estudos realizados que mostram a relação entre um alto nível de VEGF e mau prognóstico nos casos de CNPC. (FONTANINI et al, 1997) (SAITO et al., 2007). Recentemente, alguns autores (PARRA et al., 2008) demonstraram a

importância do VEGF como marcador de prognóstico em adenocarcinomas e em suas metástases hematogênicas.

Das substâncias pró-angiogênese a que mais se destaca é o VEGF, pois o mesmo se liga a um receptor, promovendo a proliferação das células endoteliais. Existem 03 receptores para o VEGF:

- VEGFR1: fraco estimulador da angiogênese
- VEGFR2: Mais importante para a angiogênese
- VEGFR3: ligado à proliferação dos vasos linfáticos

2.6 MARCADOR ANTÍGENO CD105 (ENDOGLINA)

A Endogлина (CD105) é uma glicoproteína transmembrana expressada em células endoteliais vasculares activada. (LETAMENDIA et al., 1998)

O CD105 é amplamente expresso em pequenos vasos de tumores sólidos de diferentes tipos histológicos, como mama, próstata, estômago e endométrio (KUMAR et al., 1999; VEIKKOLA et al., 2000; SAAD et al., 2003; EL-GOHARY., 2007; NIKITEAS et al., 2007). Estudos utilizando anticorpos monoclonais anti-CD105 mostraram que a expressão antigênica foi identificada quase que exclusivamente no endotélio venoso e arterial dos vasos peritumorais e intratumorais (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999; FONSATTI et al., 2001). Pesquisas tem mostrado uma imunomarcção forte para CD105 nos vasos ao redor do tumor, e nenhuma marcação tem sido detectada nos grandes vasos ou vasos sanguíneos dos tecidos normais (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999). Por isso, tem se sugerido que o CD105 é um marcador mais específico e sensível para vasos neoformados em relação aos outros anticorpos (BODEY et al., 1998; SAAD et al., 2003).

FONSATI et al. (2001) indicaram a endogлина como o marcador endotelial mais apropriado no monitoramento terapêutico antiangiogênico em neoplasia malignas e salientaram que inúmeras pesquisas evidenciam esse marcador como um importante fator preditivo de metástases regionais e sobrevida dos pacientes oncológicos.

O CD105 é expresso predominantemente em células endoteliais angiogênicas e está aumentado na hipóxia. Ele é constitutivamente fosforilado em células endoteliais, principalmente em serina e resíduos de treonina. As células endoteliais são a maior fonte de CD105. Outros tipos celulares, incluindo células da musculatura

lisa, fibroblastos, macrófagos e precursores endoteliais, pré-B e eritróides, expressam esse marcador em menor quantidade. A placenta e o cordão umbilical humano apresentam altos níveis de CD105. Evidências dão suporte ao importante papel do CD105 na angiogênese e progressão de tumores. O CD105 é predominantemente ativo em células endoteliais em proliferação, e sua atividade é induzida pela hipóxia. (DUFF et al., 2003)

A mensuração do índice angiogênico pela MVD através da imunomarcação pelo anticorpo anti-CD105 tem sido verificado em uma variedade de tumores malignos com a finalidade de compreender os mecanismos de progressão dessas lesões. (TANIGAWA et al., 1997).

2.7 DENSIDADE MICROVASCULAR E CÂNCER

A Densidade Microvascular (MVD) é o método mais utilizado para mensurar a angiogênese tumoral através da contagem da quantidade de vasos sanguíneos de um determinado tumor, ela tem sido considerada como um bom indicador de prognóstico para avaliar o comportamento tumoral em pacientes com carcinomas espinocelulares de boca (HASINA et al., 2001).

A imunoistoquímica possibilita identificar e quantificar a microcirculação do tumor o que não é permitido com as técnicas convencionais de microscopia.

Vários estudos demonstram que a MVD se correlaciona com o crescimento do tumor e com a ocorrência de metástases a distância (VERMEULEN, 1996). Para a marcação dos vasos na imunoistoquímica são utilizados anticorpos, sendo o anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 e anti-FVIII os mais utilizados (VERMEULEN, 2002).

2.8 INFLAMAÇÃO X ANGIOGÊNESE

Diversas evidências sugerem que angiogênese e inflamação crônica são processos interligados (Figura 1). A natureza dessa interconexão envolve o aumento da migração e da proliferação de células inflamatórias bem como a ação regulatória de citocinas e de fatores de crescimento (JACKSON et al., 1997).

A neovascularização esta comumente associada a condições que apresentam diferentes estágios de infiltrado de células inflamatórias. Sendo assim, a angiogênese inflamatória pode ser entendida devido à habilidade das células

endoteliais e dos leucócitos de responderem a um estímulo comum: as citocinas (JACKSON et al., 1997).

A angiogênese inflamatória é um processo complexo que envolve, portanto, grande intercomunicação entre as células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelulares (LIEKENS et al., 2000). Este processo é controlado pelo balanço entre a produção e a secreção de moléculas que possuem atividade regulatória positiva (fatores angiogênicos) e negativa (fatores anti-angiogênicos) (PEPPER, 1983). O equilíbrio entre a produção de substâncias endógenas pró e anti-angiogênicas pode ser rompido por fatores químicos e físicos (injúrias tissular, hipóxia, liberação de citocinas) ou mecânicos (alterações no fluxo sanguíneo e no formato celular) (INGBER, 1998).

Figura 1- Fonte de Albini et al., 2005. Inter relações entre angiogênese e inflamação. (1) Diferentes estímulos (proliferação de células tumorais, necrose apoptose) causam ativação de macrófagos residentes e outros fagócitos causando a liberação de mediadores pró-inflamatórios. (2) Estes fatores derivados de fagócitos estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. (3) Moléculas de adesão e fatores solúveis do endotélio ativado recrutam e estimulam fagócitos circulantes que aumentam o infiltrado de células. (4) Fagócitos ativados estimulam a remodelação tecidual, liberando fatores que provêm o crescimento e migração de células endoteliais para a formação de novos vasos.

Os fatores angiogênicos e inflamatórios são representados, principalmente por citocinas, essas são polipeptídeos que induzem uma ou mais etapas destes processos, interagindo com receptores específicos nas células endoteliais e/ou recrutando e ativando células, tais como macrófagos e outros leucócitos, que possuem a capacidade de produzir fatores angiogênicos (BERNARDINI et al., 2003).

2.9 IMUNIDADE

A imunidade inata não é altamente específica e responde da mesma forma a todos os antígenos. As células natural killer (NK) são importantes para imunidade contra infecções e tumores (SHANKAR, 2000) (IBS, 2000).

A imunidade específica ou adquirida envolve a proliferação de células antígenos específicas B e T, o que ocorre quando a superfície destas células entra em contato com um antígeno. Células especializadas, chamadas de apresentadoras de antígenos, mostram os antígenos aos linfócitos, colaborando com sua resposta aos antígenos. Os linfócitos T auxiliam os do tipo B a produzir anticorpos e também pode erradicar patógenos intracelulares, ativando macrófagos e matando células infectadas por vírus (DELVES, 2000).

O sistema imune constitui uma das primeiras linhas de defesa para prevenir o desenvolvimento tumoral devido a sua habilidade em identificar e destruir células tumorais (imunovigilância) (TRAVÉS, LUQUE, HORTELANO, 2012). Está bem documentado que o escape imune é uma característica fundamental do câncer. É proposto que a interação entre o tumor e as células do hospedeiro segue três etapas: eliminação que representa o conceito clássico da imunovigilância do câncer, equilíbrio que representa o período de latência imunologicamente mediada após a destruição incompleta do tumor durante a fase de eliminação, enquanto o escape se refere ao crescimento final dos tumores que superaram todas as barreiras imunológicas (BREMNES et al., 2011; COICO; SUNSHINE, 2010)

3 PROPOSIÇÃO

1. Neste estudo, foi analisado microscopicamente um total de 80 biópsias excisionais de pacientes portadores de carcinomas espinocelulares (CEC) de boca, localizados no lábio, língua e assoalho bucal. Dessa amostra, apenas 54 se enquadraram para a pesquisa, após os critérios de inclusão e exclusão, onde se propõe verificar:

- ✓ processo inflamatório de cada espécime e classificação em 4 grupos (grupo I - sem inflamação, grupo II - pouco inflamado, grupo III - moderado e grupo IV - intensamente inflamado);
- ✓ a correlação, através da imunoistoquímica, pelo marcador CD105, através do número dos vasos sanguíneos com os grupos determinados pela intensidade do processo inflamatório.

2. Contribuir com o conhecimento da relação do processo inflamatório correlacionando-o com a angiogênese tumoral das neoplasias de carcinomas espinocelulares de boca.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

O material de estudo foi constituído por lâminas de pacientes, portadores de carcinoma espinocelulares de boca, submetidos a tratamento no Hospital Estadual e Hospital de Base da cidade de Bauru-SP, no período de 2005 à 2012. Essas lâminas são do acervo do Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), de onde foram cedidas para a referida pesquisa, conforme declaração anexa. (Anexo 1)

As lâminas foram previamente selecionadas, de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- lâminas com diagnóstico de carcinoma espinocelular localizados em lábio, língua ou assoalho bucal;
- lâminas oriundas de peças cirúrgicas de pacientes submetidos à cirurgia como tratamento inicial;
- disponibilidade dos respectivos blocos de parafina.

Os critérios de exclusão foram:

- lâmina com material insuficiente para análises microscópicas;

Durante a análise das lâminas também foram descartadas aquelas onde não se observou a periferia da lesão e também aquelas cujos cortes apresentavam somente mucosas, sem tecido conjuntivo representativo e lâminas com cortes de lesões muito pequenas. Isso fez com que o total de lâminas incluídas na pesquisa totalizasse em 54 lâminas.

A quantidade de lâminas que constituiu o grupo I não foi suficientemente significativa para a análise estatística. Com isso, o grupo I foi excluído deste trabalho, lembrando que toda a amostra utilizada para esta pesquisa foi cedida de forma aleatória em relação ao processo inflamatório encontrado em cada lâmina de carcinoma espinocelular pela ANATOMED. Sendo assim, obteve-se apenas três grupos classificados como pouco, moderado e intenso infiltrado inflamatório. Dessa

foram, os grupos foram novamente classificados como: grupo I - representado com pouco infiltrado inflamatório, grupo II – representado com moderado infiltrado inflamatório e grupo III – representado com intenso infiltrado inflamatório.

4.2 REGISTROS DE DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas e microscópicas, referentes ao acervo de lâminas dos pacientes do Hospital Estadual e do Hospital de Base de Bauru, foram obtidas através do banco de dados pertencente ao Laboratório de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), devido à impossibilidade de acesso aos respectivos prontuários através do arquivo de ambos os hospitais. Estes registros incluíram apenas o laudo dessas biópsias, cedidas unicamente pelo Laboratório de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED).

4.3 VARIÁVEIS DO ESTUDO

O presente estudo foi limitado aos casos com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma espinocelular, registrados no Laboratório de Anatomia Patológica de Bauru (ANTOMED), não tendo acesso aos prontuários para a obtenção de dados como gênero, idades, e outras informações como etilismo ou não, tabagismo ou não, dentre outros.

4.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Para as análises microscópicas de cada espécime tumoral, baseou-se inicialmente no diagnóstico da ANATOMED, no qual as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) foram analisadas histologicamente por dois examinadores, previamente calibrados, para padronização da análise de forma subjetiva quanto à quantificação do processo inflamatório encontrado em cada lâmina. Posteriormente, foram realizadas as análises das lâminas correspondentes a cada caso, marcadas por imunoistoquímica, nas quais houve a quantificação dos

índices de angiogênese, por meio do marcador CD105, seguindo as especificações do fabricante. A confecção das lâminas de imunoistoquímica foi feita pelo Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED).

4.4.1 Avaliação do processo inflamatório nas lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE)

O processo inflamatório foi classificado como pouco, moderado e intenso através das lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Neste trabalho, esta classificação da intensidade do processo inflamatório foi determinada através da utilização do método visual subjetivo para quantificar a presença de infiltrado inflamatório, sem auxílio de qualquer dispositivo, onde dois observadores independentes procederam à leitura das lâminas e coleta dos dados. Essa avaliação foi realizada visualmente de forma panorâmica em cada lâmina. Somente quando houve a concordância de ambos se estabeleceu a divisão dos grupos em grupo I com pouco, grupo II com moderado e grupo III com intenso infiltrado inflamatório.

4.4.2 Técnica Imunoistoquímica

A marcação imunoistoquímica para avaliar a quantificação de vasos neoformados (angiogênese) foi com o marcador CD105, realizada de acordo com a técnica da imunoperoxidase, seguindo as especificações do fabricante e a metodologia utilizada no Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), como descrita a seguir:

- ✓ Os cortes microscópicos de 4µm de espessura das lesões de carcinoma espinocelulares de boca foram obtidos a partir dos blocos de parafina originais, colocados em lâminas de vidro do tipo silanizadas (25 X 75 X 1mm, Superfrost Plus Easypath) e fixadas em estufa a 65° por 24 horas;
 - ✓ em seguida, realizou-se a desparafinização através da imersão, por três vezes, em temperatura ambiente por 10 minutos cada e, em
-

seguida, foram submetidas a quatro imersões em álcool absoluto por 30 segundos cada e, na sequência, procedeu-se à lavagem das lâminas em água corrente e destilada;

- ✓ a recuperação antigênica foi realizada por meio da incubação dos espécimes tumorais em solução de tampão e colocados numa panela de pressão (Pascal S2800, Dako), preenchida com 450ml de água destilada. A seguir, a temperatura da panela foi regulada à 118°C por 2 minutos e as lâminas foram fervidas. A solução de tampão, a temperatura e o tempo utilizados na recuperação antigênica foram determinados de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo utilizado (Tabela 1);

Tabela 1 – Anticorpo e protocolo de reação imunoistoquímica

ANTICORPO (Clone)	Diluição	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário
CD105 (4G11) (NOVOCASTRA)	1:100	Citrato pH 6,0 118°C/2min	Kit-ADVANCE HRP

- ✓ as lâminas foram retiradas da panela e aguardou-se seu resfriamento por 40 minutos. Em seguida, realizou-se a lavagem das lâminas em água destilada por duas vezes;
 - ✓ realizou-se também o bloqueio da peroxidase endógena, mediante a incubação dos cortes teciduais em solução de 3% Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂ – 30v) durante 15 minutos. Em seguida, procedeu-se à lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
 - ✓ através da utilização de uma bandeja de coloração em câmara úmida, (EasyPath[®], Erviegas), as lâminas foram dispostas lado a lado e, com o auxílio de um sugador, retirou-se o excesso de água dos cortes e as amostras foram, então, delimitadas com caneta hidrofóbica (Dako Pen S2002, Dako);
-

- ✓ procedeu-se a lavagem da lâminas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS = Phosphate Buffered Saline) a 10mm e pH7,2;
 - ✓ realizou-se a incubação “*overnight*” com o anticorpo CD105, por 18 horas a 4°C. As especificações e diluições de cada anticorpo foram detalhadas na tabela acima (Tabela 1);
 - ✓ após incubação, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos;
 - ✓ procedeu-se à lavagem da lâminas em tampão PBS, pH 7,4 com duas trocas;
 - ✓ seguiu-se à incubação com o anticorpo secundário como especificado na Tabela 1 e detalhado a seguir:
 - ❖ Kit-ADVANCETMHRP (Complexo AB, Carpinteira, Califórnia, EUA): inicialmente, incubação com ADVANCETMHRP Link, por período de 30 minutos em temperatura ambiente e lavagem por duas vezes com PBS, pH 7,4, seguindo a incubação com ADVANCETMHRP Enzyme por 30 minutos
 - ✓ procedeu-se à lavagem das lâminas em PBS, pH 7,4;
 - ✓ procedeu-se daí a visualização da reação antígeno-anticorpo, através da incubação com a solução de 3'3 diaminobenzidina (DAB) (DAKO), por 5 minutos ao abrigo da luz;
 - ✓ os cortes microscópicos dos tumores foram lavados em água destilada e, em seguida contra corados com hematoxilina de Harris por 5 minutos;
 - ✓ os cortes contendo os fragmentos teciduais foram lavados em água corrente e destilada e, em seguida, desidratados em concentrações
-

graduais de álcool (80%, 95% e absoluto), mergulhados em solução de xilol e montados com a utilização de resina sintética (Entella Neu, Merck) e lamínulas;

- ✓ o anticorpo foi incluído em um controle positivo de amígdala humana na coloração imunoistoquímica, realizadas para CD105, apenas para padronização.

Figura 2 - Corte microscópico do *front* de invasão tumoral de carcinoma espinocelular utilizado como controle positivo interno. Detalhes em maior aumento da imunoexpressão para o anticorpo anti-CD105 em vasos sanguíneos

4.4.3 Avaliação da expressão imunoistoquímica do CD105

A avaliação da expressão imunoistoquímica do anticorpo anti-CD105, nos carcinomas espinocelulares de boca, foi realizada por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens na região do *front* de invasão tumoral. Dez campos microscópicos foram capturados para cada espécime tumoral a partir de uma câmera de alta resolução (AxioCam MRc, da marca ZEISS), acoplada a um microscópio óptico binocular (Axiostar HBO plus 50/AC (Carl Zeiss, Alemanha) contendo uma objetiva de 40x. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador contendo um programa de aquisição e análise de imagens Axiovision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha, Figura 3A e B). Cada campo microscópico capturado pelo programa correspondia a uma área de $93.992,05\mu\text{m}^2$.

O número de campos microscópicos obtidos por carcinoma espinocelular foi de dez campos sequenciais na região de *front* de invasão tumoral, tomando-se cuidado para que nenhum vaso fosse repetido por campo.

A expressão imunoistoquímica do CD105 pelos vasos neoformados foi avaliada por dois examinadores, sem o conhecimento da classificação quanto ao processo inflamatório dos espécimes e sem o conhecimento prévio dos dados coletados do outro colega. Cada colega preencheu a tabela demonstrada abaixo para futura a análise estatística. (Figura 4)

Foi considerada positiva a marcação de todos os vasos que exibiram coloração acastanhada em seu endotélio de forma bem definida.

Figura 3 - Avaliação da expressão imunoistoquímica do anticorpo anti-CD105 nos carcinomas espinocelulares de boca. **A** - Obtenção das imagens através do Programa Axiovision Rel. 4.6. **B** - Imagens analisadas quanto à quantificação da densidade microvascular intratumoral (MVD)

Lâmina	campo 1	campo 2	campo 3	campo 4	campo 5	campo 6	campo 7	campo 8	campo 9	campo 10
H 10 - 0465										
HB05 - 1023										
HB08 - 1467										
HB05 - 1509										
HB07 - 1936										
HB6 - 2577										

Figura 4- Recorde da tabela utilizada para coleta da contagem dos vasos sanguíneos

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar o número médio de vasos na expressão do CD105 entre os carcinomas classificados com pouco, moderado e muito infiltrado inflamatório na quantificação da neovascularização tumoral, foi utilizada a Análise de Variância e do Teste de Turkey.

Para a análise foi considerado um nível de significância P- valor 0,05 (5%).

4.6 REGISTROS FOTOGRÁFICOS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas através do microscópio óptico binocular Axiostar HBO plus 50/AC (Carl Zeiss, Alemanha), em objetivas de 40x, acoplada a um microcomputador que captura as imagens por meio do programa Axiovision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha).

4.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, em reunião dia 14/04/2014, sob o número CAAE 23528214.6.0000.5417, conforme declaração anexa. (Anexo 2)

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão previamente mencionados, selecionou-se para a realização desta pesquisa um total de 54 lâminas com diagnóstico de carcinoma espinocelular sendo todos com localização bucal. A partir daí as lâminas foram classificadas em três grupos de acordo com o processo inflamatório encontrado: pouco processo inflamatório, moderado processo inflamatório e intenso processo inflamatório.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Das 54 lâminas 05 corresponderam ao grupo II sendo representados por 9% da amostra da pesquisa, 15 ao grupo III representando 28% e 34 ao grupo IV representando 63%. (Gráfico 1)

Gráfico 1 – Gráfico representando a porcentagem da amostra trabalhada em cada grupo

Todo o material foi analisado em microscópico de luz, usando inicialmente o aumento de 100X para identificação do corte; 200X para delimitação dos campos que foram estudadas as alterações inflamatórias no *front* de invasão tumoral e um aumento de 400X para as lâminas com marcação da imunoistoquímica com a expressão do marcador CD105.

Os cortes representativos de cada espécime tumoral corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) foram analisados somente para a quantificação do processo inflamatório no *front* de invasão tumoral (Figura 5). Já os cortes com a técnica de imunoistoquímica com expressão do marcador CD105 foi utilizando para a contagem dos vasos neoformados (Figura 6).

Figura 5 - Fotomicrografia em HE representativos de carcinoma espinocelular de boca (400X). Onde foi avaliado a quantificação do processo inflamatório

Figura 6 - Fotomicrografia representando a imunohistoquímica para o anticorpo CD105 em carcinoma espinocelular de boca (400X)

5.2.1 Classificação do processo inflamatório

A classificação dos grupos de acordo com o processo inflamatório foi realizada através dos cortes de lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) de forma subjetiva onde foram classificados de Grupo I – pouco infiltrado inflamatório (Figura 7), Grupo II – moderado inflamatório (Figura 8) e Grupo III intenso infiltrado inflamatório (Figura 9).

Figura 7 - Fotomicrografia representando o Grupo I fotografado com a coloração em HE – A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva se 10X e C) com objetiva de 40X

Figura 8 - Fotomicrografia representando o Grupo II fotografado com a coloração em HE - A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva 10X e C) com objetiva de 40X

Figura 9 - Fotomicrografia representando o Grupo III fotografado com a coloração em HE - A) com objetiva de 2,5X; B) com objetiva de 10X e C) com objetiva de 40X

5.2.2 Avaliação da expressão do anticorpo CD105

A expressão do marcador CD105 foi detectada nos vasos sanguíneos das lâminas das biópsias dos carcinomas espinocelulares de boca. As marcações observadas variaram em intensidade entre as lâminas (amostras) e também dentro de uma mesma lâmina, de fraca a forte. Foram considerados positivos todos os vasos sanguíneos que exibiram coloração acastanhada estando bem delimitado sua parede, independente da intensidade de marcação. Em algumas situações foram observadas marcações de células epiteliais neoplásicas.

Cada lâmina foi fotografada em dez campos diferentes de forma aleatória com aumento de 400X seguindo o *front* de invasão tumoral, onde foi feita a contagem dos vasos neoformados. (Figura 10 e 11)

Figura 10 – Fotomicrografia representando a imunoistoquímica com o anticorpo CD105 em carcinoma espinocelular de boca, com imagens de uma única lâmina contendo 10 campos diferentes fotografados com objetiva de 40 para a contagem dos vasos sanguíneos.

Figura 11 – Fotomicrografia representando a imunoistoquímica com o anticorpo CD105 em carcinoma espinocelular de boca, com imagens de uma única lâmina contendo 10 campos diferentes fotografados com objetiva de 40 para a contagem dos vasos sanguíneos.

Foi observada maior quantidade de vasos sanguíneos marcados pelo CD105 nos grupos classificados com maior intensidade de processo inflamatório quando comparado com os de menor intensidade, apesar do número da amostra ser de diferentes entre os grupos. Na tabela abaixo podemos avaliar o total de lâminas selecionadas para cada lâmina, a soma dos vasos sanguíneos corados pelo CD105 em todos os campos estudados em cada grupo e a média dos mesmos. (Tabela 2) (Gráfico 2)

Tabela 2 - Distribuição dos valores correspondentes ao número de vasos avaliados nos carcinomas no Grupo I, Grupo II e Grupo III utilizando a técnica da imunohistoquímica para identificação e contagem dos vasos sanguíneos, com a média e resultado estatístico

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Total de lâminas	5	15	34
Total de nº de vasos encontrados	144	540	1613
Média	2,7	3,9	5,323529
DP	1,440486073	1,901127458	1,740265

Gráfico 2 - Gráfico de colunas representando a média e a soma total de vasos encontrados em cada grupo estudado

Durante a contagem dos vasos sanguíneos foi observado maior quantidade nos grupos de maior intensidade quando comparado com os grupos de menor quantidade.

5.2.3 Correlação entre processo inflamatório e o marcador imunoistoquímico

Foi detectada uma diferença estatisticamente significante de vasos sanguíneos em maior quantidade onde se observou maior quantidade de processo inflamatório quando comparado com o grupo de menor quantidade de processo inflamatório. Para estabelecer o coeficiente de correlação significantemente positivo foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman, onde se obteve um valor $R=0,48$ e $p\text{-level} = 0,000176$.

Foi realizado também um teste de comparação múltipla entre os 3 grupos através da Análise de variância (comparação das três médias) e teste de Tukey descritos na Tabela 3 onde se observou diferença entre os grupos I e III e os grupos II e III, porém entre os grupos I e II não houve diferença significativa entre os grupos eles.

Tabela 3 - Comparação entre os três grupos: I, II e III através do Teste de Tukey

Descrição de média geral	Grupo I 2,700000	Grupo II 3,900000	Grupo III 5,323529
Grupo I		0,392624	0,008709
Grupo II			0,031998
Grupo III			

GRUPO I

Gráfico 3 - Gráfico de colunas do grupo I - pouco processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105

GRUPO II

Gráfico 4 - Gráfico de colunas do grupo II - moderado processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105

GRUPO III

Gráfico 5 - Gráfico de colunas do grupo III - intenso processo de infiltrado inflamatório com a expressão encontrada dos vasos sanguíneos marcado pelo CD105

6 DISCUSSÃO

Há evidências de que o risco aumentado para transformação maligna em determinados tecidos tem relação com a inflamação associada a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e à alteração na arquitetura do tecido pela ativação de células e componentes do estroma capazes de influenciar a sobrevivência, crescimento, proliferação e diferenciação celular. (MONGNETTI et al., 2006)

Segundo WIRCHOW existe uma íntima relação entre a inflamação crônica e o câncer já sugerido por Galeno desde 180.D.C, onde defendem a idéia que lesões cancerígenas aproveitam do desequilíbrio do mecanismo natural de defesa, para invadir o organismo e levá-lo à morte; ou seja, os mediadores químicos da inflamação, fazem jogo duplo, desempenhando papel nocivo no aparecimento e desenvolvimento das lesões cancerígenas sendo que o excesso da produção de mediadores da inflamação produzido pelas células cancerígenas, acarretam o bloqueio do suicídio celular (apoptose) geneticamente programado.

Para que possam proliferar, as células malignas dependem não só de suprimir a resposta imune tumoral do hospedeiro, mas também da formação de novos vasos sanguíneos. Deste modo, tem se sugerido que angiogênese e tolerância imune tumoral estão intimamente relacionadas e cooperam para sustentar o crescimento e disseminação neoplásica. (FACCIABENE et al., 2011).

A angiogênese é um processo dinâmico caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da divisão ou migração da vasculatura pré-existente sendo essencial em uma série de mecanismos fisiológicos e patológicos sediados na cavidade bucal. Neste contexto, várias pesquisas tem sido conduzidas buscando detalhes sobre a participação da angiogênese nos tumores em virtude da mesma fornecer um grande aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes, bem como estabelecer condições favoráveis à disseminação metastática (FOLKMAN, 1995; SCHIMMING et al., 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005, SOARES, 2007, SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; CORTEZE NETTO et al., 2008).

Ela é considerada um requisito não só para o crescimento tumoral continuado, mas também para metástase. Sem acesso à vascularização, as células

tumorais não podem se disseminar para locais a distância. (CORTEZE NETTO et al., 2008).

Em decorrência das diferentes recomendações de técnicas destinadas à quantificação da angiogênese (WEIDNER; SAMPLE; FOLKMAN, 1991; PAZOUKI et al., 1997; MAEDA et al., 1995) procedeu-se, inicialmente, uma avaliação da MVD, MVC e MVV e constatou-se que a MVC foi o método, de obtenção do índice angiogênico, mais simples, efetivo e de fácil aplicabilidade encontrado para análise da angiogênese de tumores de cabeça e pescoço (MAEDA et al., 1995; FRIDMAN et al., 2000; FREITAS et al., 2005; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). Todavia, Fridman et al. (2000) sugerem que essas técnicas deve ser mais bem estudada e otimizada, antes de ser utilizada na rotina para determinação prognóstica nos mais variados tipos de cânceres humanos.

Os autores são conflitantes na indicação do marcador imunoistoquímico que oferece melhores resultados na avaliação da angiogênese, porém de acordo com Martone et al. (2005), Chien et al. (2006), Chuang et al. (2006), Kyzas, Agnantis e Stefanou (2006), Taskiran et al. (2006), Nikiteas et al. (2007), Soares et al. (2007) e Corteze Netto et al. (2008) o CD105 é um excelente anticorpo de eleição na avaliação da angiogênese. Por outro lado, Traweek et al. (2003), Guttman et al. (2004) e Ascani et al. (2005) recomendam para análise de vascularização o CD34, por acreditarem ser o marcador mais eficaz para vasos e células endoteliais.

Em um estudo realizado por Cortezze Netto et al. (2008) em oligodendrogliomas, verificou que pela avaliação da angiogênese pela MVD o CD34 e o CD105 revelaram-se serem bons marcadores endoteliais, contudo somente o CD105 mostrou-se eficaz como possível fator e prognóstico e alvo para terapêutica anti-angiogênica nas referidas lesões estudadas.

No estudo de Duff et al. (2003) a decorrência do mecanismo de ação do CD105 vem sugerindo a sua aplicabilidade clínica como um dos critérios de diagnóstico e para avaliar a progressão e identificar ao risco de recorrência e metástase que determina neoplasia apresenta e, com isso predizer a resposta do tratamento mensurar a taxa de sobrevida de muitos pacientes.

Com isso, no estudo realizado, optou-se em avaliar a quantificação dos vasos sanguíneos com a expressão imunoistoquímica do marcador angiogênico CD105 (endogлина), por estarmos mais interessados em vasos neoformados.

Foi avaliada a quantidade do processo inflamatório, correlacionando com o índice de formação da angiogênese no *front tumoral*, através da imunoistoquímica do anticorpo CD105. Este marcador é conhecido na literatura por marcar apenas vasos sanguíneos recém-formados. Realmente foi encontrada a expressão deste marcador nos vasos sanguíneos de pequeno calibre, e também detectada a presença de alguns vasos que não expressavam este marcador, sugerindo que se trata de vasos sanguíneos quiescente do tecido.

Ao analisar os resultados nos três grupos II, III e IV, nas lâminas coradas com o marcador CD105, notou-se que a quantidade de vasos corados no grupo IV foi maior que quando comparada com o grupo II. Isto nos leva a concluir que a neoformação vascular acontece em maior quantidade de vasos sanguíneos onde há maior quantidade de células inflamatórias, ou seja, os resultados encontrados nesta pesquisa sustentam que onde há maior quantidade de processo inflamatório irá encontrar maior quantidade de vasos neoformados, mostrando assim uma relevância no estudo da neoformação vascular, como também a tendência apresentada na literatura de considerar importante a participação de fatores angiogênicos na patogênese dos carcinomas. Essa diferença de quantidade de vasos também foi encontrada nos grupos III e IV, porém não se encontrou diferença estatística quando nos grupos II e III.

Neste trabalho foi encontrada uma correlação positiva como esperado entre a presença de maior quantidade de vasos sanguíneos, onde o infiltrado inflamatório foi classificado com maior intensidade, sendo estatisticamente encontrado um coeficiente de correlação positiva significativa (0,48).

Pelo teste de Tukey houve diferença entre os grupos II e IV e o grupo III e IV, porém entre os grupos II e III não houve diferença estatística. A ausência de diferença significativa entre o grupo II e III pode ser pela quantidade da amostra selecionada, como o trabalho foi realizado através de uma amostra de 80 lâminas obtidas de forma aleatória e a partir daí feito o processo de exclusão totalizando 54 lâminas para a pesquisa.

Observou-se na amostra estudada que a expressão imunohistoquímica do anticorpo anti CD105 nos carcinomas foi restrita ao citoplasma das células endoteliais de revestimento e aos agrupamentos de células endoteliais proliferantes que não formavam lúmen sendo, dessa forma, congruentes com os trabalhos que afirmam ser o CD105 anticorpo com afinidade por epítomos específicos de células

endoteliais (MARTONE et al., 2005; SOARES et al., 2007; YANG et al., 2006; CORTEZE NETTO et al, 2008).

Nos estudos de Amar et al. (2002), onde avaliaram a densidade microvascular de carcinomas de língua, através da imunoistoquímica empregando o anticorpo anti-CD34, não houve relação significativa entre a densidade microvascular no tumor primário e as variáveis histológicas avaliadas (grau de diferenciação, padrão de invasão, infiltrado inflamatório, necrose e desmoplasia).

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem uma correlação positiva entre a presença de maior quantidade de vasos sanguíneos no *front* de invasão tumoral, onde se encontra maior quantidade de células inflamatórias, quando comparado com áreas de menor quantidade de processo inflamatório.

Por se saber que a angiogênese é um processo caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, que vão fornecer um grande aporte nutricional ao crescimento das células neoplásicas proliferantes, várias pesquisas tem sido conduzidas buscando mais detalhes sobre a participação delas nessas lesões. Nesse sentido, observou-se que o CD105 vem se apresentando como um dos biomarcadores sensíveis e específicos para a avaliação da densidade microvascular (MVD), além de ter uma boa imunomarcção forte para vasos ao redor de tumores. Com isso, observa-se um avanço no conhecimento sobre essas neoplasias, onde esses conhecimentos podem, no futuro, gerar uma melhora da sobrevida e da qualidade de vida dos portadores dessas neoplasias.

Contudo, nossos resultados com o CD105, não diferem da maioria dos autores, que acreditam na influência dos mediadores da inflamação na neoformação vascular. Diferente de nossa dúvida inicial de que a neoformação vascular pudesse talvez ser influenciada somente pelas células neoplásicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aachaman FL, Aune TEV. Use of cyclodextrin and its derivatives for increased transformation efficiency of competent bacterial cell. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;83(3):589-96.

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

Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DMI. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res*. 2005;65(23):10637-41.

Amar A, Giovanini AF, Rosa Marilene P, Yamassaki HO, Carvalho MB, Rapoport A. densidade microvascular no carcinoma de lingual. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(3):204-8.

Ascani G, Balercia P, Messi M, Lupi L, Goteri G, Filosa A, et al. Angiogenesis in carcinoma oral squamous cell carcinoma, *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2005;25(1):13-7.

Beck L Jr., D'Amore P. Vascular development: celular and molecular regulation. *FASEB J*. 1997;11(5):365-72.

Bergers G, Benjamin, LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.

Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, et al. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol*. 2003;273:83-101.

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

Brasileiro-Filho G, Guimarães RC, Bogliolo L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro-Filho G, editor. *Patologia clínica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.148-92.

Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, et al. The role of tumor - infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non - small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(4):824-33.

Bunget A, Fronie A, Afrem E, Corlan Pușcu D, Manolea H, Dan AR, et al. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryology*. 2013;54(3):623-7.

Burri PH, Hlushchuck R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*. 2004;231:474-88.

Cadauff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscopic study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec*. 1986;216(2):154-64.

Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):735-43.

Capelozzi VL. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. *J Bras Pneumol*. 2009;35(4):375-82.

Hunter 1787 apud Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 2000;6(3):389-95.

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19027-30.

Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM, Huang CC. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol*. 2006;1(5):413-7.

Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High Expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1175-9.

Coico R. Sunshine G. *Imunologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Cortez Netto GC, Bleil CB, Hilbig A, Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF- β (CD105/endoglin) and

CD34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathol.* 2008;28(1):17-23.

Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med.* 2001;193:23-6.

Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1131:235-41.

Daniel OT, Abrahamson D. Endothelial signal intergration in vascular assembly. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:649-71.

Delves PJ, Roit IM. The immune system: first of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: vidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-92

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315:1650-9.

Eccles AS, Alexander P. Macrophages content of tumor in relation to metastatic spread and host immune reactions. *Nature.* 1970;250:667-9.

Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch K, Bruns CJ. Angiogenesis in câncer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langen Arch Surg.* 2007;392(3):371-9.

El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Conhen JK, Miller R, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(4):572-9.

Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Bachetti A, Wang LP, et al. Tumor hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nat Rev Immunol.* 2014;475(73355):226-30.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008. France: IARC, International Agency for Research on Cancer. 2010;127:2893-917.

Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet.* 1993;64(3-4):204-7.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist.* 2004;9(Suppl 1):2-10.

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1974;19:331-58.

Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med.* 1995;333(26):1753-7.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29:15.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chemistry.* 1992;267(16):110931-4.

Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene.* 2003;22(42):6557-63.

Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, et al. Endoglin: an accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 2001;188(1):1-7.

Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chinè S, Silvestri V, Lucchi M, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(6):861-5.

Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP. Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 1993;166:360-5.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1989;43:992-1000.

Freitas TMC, Miguel MC, Silveira EJ, Freitas RA, Galvão HC. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exp Mol Pathol.* 2005;79(1):79-85.

- Fridman V, Humblet C, Bonjean K, Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virch Arch*. 2000;437(6):611-7.
- Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(18):11197-204.
- Gougos A, Letarte M. Identification of human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pré-B leukemic cell line. *J Immunol*. 1988;141(6):1925-33.
- Gupta S, Joshi WD, Arora SK. Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol*. 2007;46(6):792-7.
- Guttman D, Stern Y, Shpitzer T, Ulanovski D, Druzd T, Feinmesser R. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*. 2004;40(8):798-803.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;68(3):353-64.
- Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ*. 2001;65(11):1282-90.
- Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):e233-40.
- INCA. O que é o câncer? [internet]. Rio de Janeiro: INCA; c2013 [acesso 2013/08/05]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322.
- INCA - Ministério da Saúde. Neoplasia - conceito [internet]. Manual de técnicas APAC-ONCO. c2014 [acesso 2014/03/04]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/publicacoes/Manual_APAC_setembro_2003.pdf
- Ingber D. In search of cellular control: signal transduction in context. *J Cell Biochem*. 1998;30(31):232-7.
- Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr*. 2000;130:1452-6.
-

Jackson JR, Seed MP, Kircher C.H, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*. 1997;11:457-65.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358(19):2039-49.

Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1170(3):217-31.

Kumar P, Wang JM, Bernabe'u C. CD105 and angiogenesis. *J Pathol*. 1996;178:363-6.

Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;59(4):856-61.

Kumar V, Abbas AK, Fauston N. Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 1592p

Kumar V, Cotran RS, Schoen FJ. Robbins: patologia estrutural e funcional. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2006;448(6):768-75.

Lages EL, Belo AV, Andrade SP, Rocha MA, Freitas GF, Lamaita RM, et al. Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(7):496-9.

Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- β . A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem*. 1998;273:33011-9.

Liekens S, De Clerck E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:253-70.

Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural modelo of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol*. 2007;365(3):694-705.

Lomonte B, Guitiérrez JM. A new muscle damaging toxin, mytoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1989;27(7):725-33.

Mach F, Schönbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, et al. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism. Implications for tube formation. *Am J Pathol*. 1999;154(1):229-38.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, et al. Tumor angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicator in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 1995;72(2):319-23.

Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol*. 2002;24(3):270-81.

Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, et al. Prognostic relevance of CD105⁺ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol*. 2005;4(2):147-55.

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006;42(5):448-60.

Moreira G, Fulgencio LB, Mendonça EF, Leles CR, Batista AC, Silva TA. T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: relationship with survival and tumor aggressiveness. *Oncology Lett*. 2010;1(1):127-32.

Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):12-7.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-371.

Parra ER, Park JY, Saito DM, Takagaki TY, Rodrigues OR, et al. Prognostic index expression of cyclin-D1, cerbB-2 and VEGF: metastases vs corresponding primary cancers and metastatic vs non-metastatic adenocarcinomas. *Histol Histopathol*. 2008;23(8):987-93.

Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR, et al. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol.* 1997;183(1):39-43.

Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1983;8:21-43.

Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):605-19.

Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(7):1104-17.

Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ.* 2002;66(8):962-75.

Rabin S. The human use of humanoid beings: chimeras and patent law. *Nat biotechnol.* 2006;24(5):517-9.

Rapidis AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):299-300.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Rev Pathol.* 2005;42(4):405-26.

Rayter Z, Mansi J. Medical Therapy of breast cancer. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2003.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.

Robbins & Cotran. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8ª Ed. 2010. cap 7.

Russel SW, Gillespie GY, Hansen CB, Cochrane CG. Inflammatory cells in solid murine neoplasms. II. Cell types found throughout the course of moloney sarcoma regression or progression. *Int J Cancer.* 1976;18:331-5.

Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22(3):248-53.

Saito DM, Franco MR, Parra ER, Ab'saber AM, Farhat C, Eher E, et al. Cell cycle regulator in primary lung adenocarcinoma and its haematogenous metastases. *Histopathology*. 2007;50(4):525-7.

Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R.. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;32(3):176-181.

Sciubba JJ, Waterhouse JP, Meyer J. A fine structural comparison of the healing of incisional wounds of mucosa and skin. *J Oral Pathol*. 1978;7:214-27.

Scott FG. *Developmental biology*. 6. ed. New York: Sinauer; 2000.

Service RF. Noel prize in chemistry. Three scientists bask in prize's fluorescent glow. *Science*. 2008;322(5900):361.

Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:447-63.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer*. 1999;86:1537-43.

Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metze K, Altemani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Vichows Arch*. 2007;451(1):65-71.

Souza GFM, Freitas RA, Miranda JL. Agiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras*. 2007;10(1):12-8.

Tahara E. Genetic alteration in human gastrointestinal cancers: the application to molecular diagnosis. *Cancer*. 1995;75(6Suppl):1410-7.

Talmadge JE; Key M, Fidler IJ. Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasms. *J Immunol*. 1981;126:2245-8.

Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Association of tumour vaculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br J Cancer*. 1997;75(4):566-71.

Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Th Rutgers EJ, Kroon BB. History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res.* 2001;3(2):109-12.

Taskiran C, Erdem O, Onan A, Arisoy O, Acar A, Vural C, et al. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(5):1789-93.

Traweek ST, Kandalaft PL, Mehta P, Battifora H. The human hmatopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 1991;96(1):25-3.

Terranova VO, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol.* 1985;101(6):2330-4.

Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on câncer metastasis. *J Leukoc Biol.* 2006;80(4):691-6.

Través PG, Luque A, Hortelano S. Macrophages, Inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflammn.* 2012;2012:568783.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60(2):203-12.

Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996;32A:2474-84.

Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Colpaert C, Marson L, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564-79.

Virchow R. Cellular pathology as based upon physiological and pathological history. Philadelphia, Lippincott; 1863.

Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer.* 1993;54:363-70.

Weidner N, Sample JP, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8. 1991.

Willis, RA. The Spread of Tumors in the Human Body. London: Butterworth, 1952.

World Health Organization. Oral Health Surveys. Basic methods. Levantamentos básicos em saúde bucal. 4. ed. São Paulo: Ed. Santos; 1999.

Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2006;6(110):1-8.

Zhang A, Meng L, Wang Q, Xi L, Chen G, Wang S, et al. Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2. Oncol Rep. 2006;15(4):831-6.

Anexo 1 – Declaração da ANATOMED

DECLARAÇÃO

Declaro que tenho ciência e autorizo o desenvolvimento da Pesquisa “Análise microscópica quantitativa da influência do processo inflamatório na angiogênese tumoral” (através da utilização de lâminas de pacientes do Instituto de Anatomia Patológica de Bauru - ANATOMED), a ser conduzida pela aluna do mestrado da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP), Ana Paula Madi, orientada pelo Dr. Luis Antônio de Assis Taveira, junto a esta entidade, após aprovação do CEP da FOB/USP.

Declaro que conheço, cumprirei e farei os Requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares e como esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste Projeto, autorizo sua execução.

Por ser verdade, firmo a presente.

Bauru, 18 de março de 2014.

Cleversom Teixeira Soares

Anexo 2 – Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: "Análise microscópica quantitativa da influência do processo inflamatório na angiogênese tumoral"

Pesquisador: LUIS ANTONIO DE ASSIS TAVERIA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23528214.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 619.056

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa intitulado "Análise microscópica quantitativa da influência do processo inflamatório na angiogênese tumoral", de autoria de Ana Paula Madi sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Antônio de Assis Taveira. Nessa pesquisa será realizado um estudo com lâminas adquiridas de biópsias onde o diagnóstico foi compatível com carcinoma espinocelular de área da cavidade bucal. São lâminas de pacientes, portadores de carcinoma espinocelulares de boca submetidos a tratamento no Hospital Estadual e Hospital de Base da cidade de Bauru, SP, no período de 2005 a 2012. Essas lâminas são do acervo do Instituto de Anatomia e Patologia de Bauru (ANATOMED) e cedidas por esta instituição para a referida pesquisa. As lâminas serão divididas em 4 grupos (20 para cada grupo) classificados em: sem infiltrado inflamatório, pouco infiltrado inflamatório, moderado infiltrado inflamatório e intenso infiltrado inflamatório onde será correlacionado com a angiogênese tumoral com auxílio de fotomicrografia. Espera-se encontrar uma maior quantidade de vasos sanguíneos onde houver um intenso infiltrado inflamatório.

Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar através da imunohistoquímica, pelo marcador CD105 o aumento ou não do número dos vasos sanguíneos com os grupos determinados pelo processo inflamatório.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 619.056

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Segundo a pesquisadora, nenhum, pois não haverá contato direto com seres humanos e a pesquisa será realizada a partir de material já coletado.

Benefícios:

Benefício de valor científico: maior conhecimento da vascularização em neoplasias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que não apresenta nenhum problema ético para sua realização, sem procedimentos ou práticas invasivas uma vez que a pesquisadora irá trabalhar apenas com material já coletado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para análise da pesquisa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa foi analisada por este CEP em data de 26 de fevereiro de 2014 e, naquela data foi considerada com pendências para sua aprovação. Faltava corrigir o cronograma, a declaração do departamento de Estomatologia que deveria afirmar que o Departamento possui infraestrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa e solução de eventuais problemas dela resultantes e documento de autorização do responsável pelo Hospital Estadual e do Laboratório de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), autorizando a pesquisadora a fazer uso das lâminas para sua pesquisa e que estão sob seus cuidados. O cronograma foi corrigido. Também foi anexado uma declaração assinada por Cleverson Teixeira Soraes autorizando a pesquisadora a desenvolver sua pesquisa nas instalações da ANATOMED. Não se fala explicitamente que a pesquisadora poderá usar as lâminas que estão sob a guarda deles, apenas se diz que a pesquisa poderá ser desenvolvida lá. Embora não se diga que a pesquisadora poderá usar as lâminas, podemos supor que sim. Não foi anexada nenhuma declaração do Hospital Estadual autorizando a pesquisadora a fazer uso de lâminas oriundas de lá. Porém os pesquisadores nos informam que "a população de estudo será constituída por lâminas de pacientes, portadores de carcinoma espinocelulares de

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 619.056

boca submetidos a tratamento no Hospital Estadual e Hospital de Base da cidade de Bauru, SP no período de 2005 a 2012. Essas lâminas são do acervo do Instituto de Anatomia Patologia de Bauru (ANATOMED) e cedidas por esta instituição para a referida pesquisa." Essa informação não constava na primeira vez que o projeto foi apresentado para análise por isso foi solicitado uma autorização para o uso das lâminas que estavam sob a guarda do Hospital Estadual. Com essa nova declaração, somente a autorização do responsável pelo laboratório ANATOMED nos basta. Por fim, depois do exposto, sou de parecer pela aprovação da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do dia 14.4.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 17 de Abril de 2014

Assinador por:**Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)****Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901**UF:** SP **Município:** BAURU**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br