Renata Sampaio Góes

Valor prognóstico da microdensidade vascular linfática
intratumoral e da expressão neoplásica de podoplanina
em carcinomas escamosos vulvares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Professora Doutora Filomena Marino
Carvalho

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Góes, Renata Sampaio

Valor prognóstico da microdensidade vascular linfática intratumoral e da expressão neoplásica de podoplanina em carcinomas escamosos vulvares / Renata Sampaio Góes. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias vulvares 2.Carcinoma de células escamosas
3.Linfangiogênese 4.Prognóstico 5.Marcadores biológicos de tumor
6.Podoplanina 7.Vasos linfáticos

USP/FM/DBD-374/12

Dedicatória

Dedico essa tese ao meu amado avô (*in memoriam*) que dedicou sua vida as mulheres com câncer ginecológico e a minha grande amiga Annica que enfrenta essa doença com a maior coragem, bravura e determinação.

Essa tese é dedicada a dois grandes guerreiros...

Agradecimentos

À Professora Dra Filomena Marino Carvalho pelo incansável ensinamento e carinho. A sra foi a melhor orientadora que já tive. Essa universidade só tem a ganhar com uma profissional tão dedicada, competente e objetiva.

Ao Professor Dr Edmund Baracat pela oportunidade e pelas portas abertas sempre.

Ao Professor Dr Eduardo Lyra por sua ajuda na minha vida acadêmica e profissional.

Ao Professor Dr Marcelo Alvarenga Calil, responsável pelo início de todo esse trabalho e pelo meu ingresso na Ginecologia e Obstetrícia. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr Waldyr Muniz Oliva Filho, meu mentor, meu porto seguro. Onde sempre me tranquilizo.

Aos meus amigos médicos Renato Celso Pereira Gomes, Alejandro Povedano e Gabriel D'alessandro, sem a ajuda de vocês teria sido impossível.

A equipe da Clinica Sampaio Góes.

A Fernanda Nicolau dos Santos pelo carinho e boa vontade em todos os momentos solicitados.

À toda equipe do IBCC por ser sempre prestativa na realização deste trabalho.

À todas as pacientes citadas nesse trabalho e à todas que já tive a oportunidade de atender nessa vida. Afinal são elas que me ensinam à ser médica.

À minha mãe Tina por ter sido a pessoa de maior alto astral na minha vida nos últimos anos. Foi você que me ensinou a coisa mais importante dessa vida: sorrir.

Em especial minha irmã Camila por ter me tranquilizado nas tarefas diárias com o meu filho, sendo sua segunda mãe. Obrigada de coração.

Aos meus irmãos Joana, Fernanda e João por serem meus eternos companheiros.

Aos meus dois grandes amores eternos: meu filho Joaquim e meu marido Paulo por serem a razão da minha vida.

À minha madrastra e amiga Annica por ter sido meu suporte emocional por todos esses anos.

À minha eterna segunda mãe, Sylvia por ser uma mulher que me passa grandes valores.

Às minhas melhores amigas do peito Sussu, Pri, Babi, Bia e Fa por serem meus momentos de leveza de vida e de confidencialidade sem o menor julgamento.

Por fim, agradeço a quem me tornou médica, forte como ser humano e a lutar pelos meus objetivos: meu PAI, Joao Carlos Sampaio Góes, o ser humano mais digno que tenho a oportunidade de conviver lado a lado.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	4
3	Métodos.....	5
3.1.	Seleção dos casos	5
3.2	Estudo anatomopatológico	6
3.3	Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA – “Tissue MicroArray”).....	11
3.4	Estudo imunoistoquímico.....	14
3.5	Quantificação da densidade vascular linfática intratumoral.....	16
3.6	Análise estatística	17
4	Resultados.....	19
5	Discussão	24
6	Conclusões.....	28
7	Anexo	29
8	Referências	30

Listas de abreviaturas, siglas e símbolos

%	Porcentagem
α	Alpha
<	Menor
$\pm$	mais ou menos
μm	Micrômetro
CEC	Carcinoma espinocelular
DVL	Densidade vascular linfática
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HPV	Papiloma vírus humano
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
IVL	Invasão vascular linfática
kDa	Kilodalton
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial receptor 1</i>
Min.	Minutos
mm	Milímetro
°C	Graus Celsius
pH	Potencial de hidrogênio
VEGF	Fator de crescimento endotelial linfático
W	Watts

Lista de figuras

- Figura 1** - Carcinoma escamoso invasivo, padrão queratinizante. Neoplasia composta por células coesas constituindo grupos grandes, com mínima atipia Hematoxilina-eosina – aumento original 400X.....7
- Figura 2** - Carcinoma escamoso invasivo, padrão não queratinizante. Neoplasia composta por células ainda agrupadas, porém com maior grau de pleomorfismo nuclear em relação aos tumores de grau 1. Hematoxilina-eosina – aumento original 400X.....8
- Figura 3** - Carcinoma escamoso, padrão basalóide. Hematoxilina-eosina – aumento original 400X9
- Figura 4** - Fotografia do instrumento utilizado para a construção dos microarranjos de tecido 12
- Figura 5** - Mapa de um dos blocos de TMA para orientação dos casos 13
- Figura 6** - Corte histológico de um dos blocos de microarranjos de tecido corado pela hematoxilina-eosina 13
- Figura 7** - Detalhe de um dos casos incluídos em um dos blocos de TMA corado por hematoxilina-eosina 14
- Figura 8** - Carcinoma de células escamosas mostrando expressão imunoistoquímica de podoplanina no citoplasma de células neoplásicas (D2-40, aumento original – 400X)..... 15
- Figura 9** - Corte histológico de CEC vulvar submetido a exame imunoistoquímico para identificação de vasos linfáticos no estroma intratumoral através do anticorpo contra podoplanina D2-40. Notam-se pelo menos três vasos no campo apresentado (aumento original 400X)..... 17
- Figura 10** - Curvas de Kaplan-Meyer para sobrevida geral em 35 pacientes divididas quanto a DVL intratumoral.....22

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características clinico-patológicas das 35 pacientes com carcinoma escamoso vulvar	10
Tabela 2 - Correlação entre a DVL intratumoral e variáveis numéricas	19
Tabela 3 - Características clinico-patológicas nominais e associação com densidade de microvasos linfáticos (DVL)	20
Tabela 4 - Associação entre DVL dicotômica e variáveis clinico-patológicas.....	21
Tabela 5 - Análise univariada para sobrevida geral em 35 carcinomas vulvares	22
Tabela 6 - Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas de CEC de vulva e características clínico-patológicas.....	23

Góes RS. *Valor prognóstico da microdensidade vascular linfática intratumoral e da expressão neoplásica de podoplanina em carcinomas escamosos vulvares* [tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011. 33p.

Introdução: Os carcinomas vulvares são tumores raros com morbidade elevada associada ao tratamento cirúrgico padrão e altos índices de recorrência loco-regional. Os vasos linfáticos são importantes vias de disseminação regional e o estado linfonodal é o principal indicador prognóstico. A densidade linfática do tumor, assim como moléculas relacionadas à linfangiogênese tem sido avaliadas em vários tumores para prever metástase linfonodal e para identificar possíveis alvos terapêuticos. Entre as moléculas relacionadas ao controle da linfangiogênese destaca-se a podoplanina, cuja expressão por células neoplásicas de tipo escamoso pode inibir a disseminação linfática. Não identificamos até o momento nenhum estudo que tenha avaliado o papel da densidade de vasos linfáticos intratumorais ou da expressão de podoplanina pelas células neoplásicas no comportamento de carcinomas escamosos vulvares. **Objetivos:** Nossos objetivos foram estudar a densidade intratumoral dos vasos linfáticos (DVL) e a expressão de podoplanina pelas células neoplásicas em carcinomas escamosos vulvares no sentido de determinar sua relação com o desfecho e fatores prognósticos clássicos, incluindo metástase linfonodal. **Métodos:** Seleccionamos 35 pacientes com carcinoma de células escamosas vulvares submetidas à tratamento cirúrgico primário incluindo vulvectomia e dissecação regional de nódulos linfáticos. Após revisão dos dados dos prontuários médicos (idade da paciente, estadiamento, tipo de tratamento e tamanho do tumor), todas as lâminas foram reexaminadas para determinar o grau histológico, invasão linfática peritumoral e profundidade da infiltração. Foram selecionadas áreas do tumor para a construção de blocos de parafina com microarranjos de tecidos e identificação imunoistoquímica de podoplanina pelo anticorpo D2-40. A DVL intratumoral foi quantificada pela contagem de vasos marcados nas áreas de maior densidade. O número de vasos foi contado em 10 campos microscópicos de grande aumento e a média foi o valor atribuído para a DVL em cada caso. A expressão de podoplanina pelas células neoplásicas foi considerada positiva quando mais de 10% das células apresentaram coloração citoplasmática de intensidade moderada a intensa. Investigamos a associação das duas variáveis com as

características prognósticas clássicas (idade, estadiamento, tamanho do tumor, grau histológico, embolização vascular peritumoral, nível de infiltração do tumor, comprometimento linfonodal), assim como sua associação com desfecho. Resultados: Valores mais elevados de DVL intratumoral foram identificados em tumores de baixo grau, em estádios iniciais, em tumores sem invasão linfática e naqueles com menor infiltração estromal. Na análise univariada, DVL intratumoral elevada foi associada a maior sobrevida geral. A expressão de podoplanina pelas células neoplásicas não se relacionou a nenhuma das variáveis prognósticas, comprometimento linfonodal ou sobrevida, assim como não se associou à DVL. Conclusões: A DVL intratumoral em carcinomas escamosos vulvares associa-se a características prognósticas favoráveis. Já a expressão de podoplanina pelas células neoplásicas não parece interferir na apresentação e comportamento destes carcinomas.

Descritores: 1.Neoplasias vulvares 2.Linfangiogênese 3.Prognóstico 4.Marcadores biológicos de tumores 5.Podoplanina 6.Vasos linfáticos

Summary

Góes RS *Prognostic value of intratumoral microvessel lymphatic density and of podoplanin neoplastic expression in squamous vulvar carcinomas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011. 33p.

Introduction: Vulvar carcinomas are rare tumors presenting high morbidity associated to the standard surgical treatment and high rates of locoregional recurrence. Lymphatic vessels serve as major routes for regional dissemination and the lymph node status is the main prognostic indicator. Tumor lymphatic density as well as lymphangiogenesis-related molecules has been studied in various tumors in order to predict lymph node metastasis and to identify a possible candidate to target therapy. Among the molecules related to lymphangiogenesis in the group of squamous cell carcinomas podoplanin expression by neoplastic cells emerges as an inhibitor of lymphatic dissemination. To our knowledge, no study evaluated the role of intratumoral lymphatic vessels or podoplanin expression by neoplastic cells in the behavior of vulvar squamous carcinomas. **Objectives:** Our aims were to study the intratumoral lymphatic vessel density (LVD) and podoplanin expression by neoplastic cells in vulvar squamous carcinoma according to their relationship with outcome and classical prognostic factors, including lymph node metastasis. **Methods:** We selected 35 cases of patients with vulvar squamous cell carcinoma submitted to primary surgical treatment that included vulvectomy and regional lymph nodes dissection. After revision of medical records data (age of patient, stage, type of surgery and tumor size), all the slides were reviewed to achieve histological grade, peritumoral lymphatic invasion and depth of infiltration. Areas of the tumor were selected for construction of tissue microarrays paraffin blocs and immunohistochemical identification of podoplanin by the D2-40 antibody. Intratumoral LVD was quantified by counting the stained vessels in hotspots areas. The number of vessels was counted in 10 high power microscopic fields and the mean was the value of the LVD for each case. Podoplanin expression by neoplastic cells was considered positive when more than 10% of the cells showed moderate to strong cytoplasmatic stained. We investigated the association of the two variables with classical prognostic features (age of patient, stage, tumor size, histologic grade, vascular involvement, depth of infiltration, lymph node involvement as well outcome. **Results:** Higher values of intratumoral LVD were identified in low grade and low stage tumors, in tumors without lymphatic invasion and those with lesser stromal infiltration. In univariate

analysis, high intratumoral LVD was associated to higher overall survival. Podoplanin expression by neoplastic cells did not show association with any of the prognostic variable, nor with lymph node involvement or outcome. Conclusions: Intratumoral LVD in vulvar squamous carcinoma is associated with prognostic favorable features. On the other hand, podoplanin expression by neoplastic cells did not seem to influence the behavior of these carcinomas.

Descriptors: 1.Vulvar neoplasms 2.Lymphangiogenesis 3.Prognostic
4.Tumor markers biological 5.Podoplanin 6.Lymphatic vessels

1 Introdução

O carcinoma vulvar é uma doença rara. Nos Estados Unidos, estima-se 3900 casos novos de câncer de vulva em 2010 e 920 óbitos pela doença⁽¹⁾. Estes números representam 0,5% de todos os tipos de câncer em mulheres e 0,3% de todas as mortes por câncer. A maioria das neoplasias malignas da vulva está representada pelo carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular (CEC), que afeta principalmente mulheres idosas⁽²⁾. Entretanto, o CEC também é observado em mulheres jovens, relacionado à infecção pelo HPV, indicando que ele pode se desenvolver por duas vias patogênicas distintas⁽³⁾. O tratamento padrão para os CEC é a vulvectomy radical com linfadenectomia inguinofemoral bilateral, a qual está associada a uma elevada taxa de morbidade e severas consequências psicosssexuais.

O principal padrão de recorrência após cirurgia primária é a recorrência local, sendo que os preditores mais importantes de mau prognóstico são idade avançada e comprometimento linfonodal⁽⁴⁾. Cirurgia primária sem dissecação de linfonodo está associada a menor sobrevida geral e sobrevida livre de doença, juntamente com o estadiamento avançado e profundidade da invasão estromal acima de 9,0 mm⁽⁵⁾. A linfadenectomia é responsável pela maior parte das complicações cirúrgicas⁽⁶⁾. Entretanto,

embora a biópsia do linfonodo sentinela seja uma ferramenta promissora para a avaliação do estado linfonodal, somente a invasão estromal menor que 1 mm pode evitar a dissecação dos linfonodos inguinais⁽⁷⁾. Nenhuma outra característica de apresentação dos carcinomas vulvares foi até o presente capaz de auxiliar na previsão de comprometimento linfonodal e evitar este procedimento. Como os carcinomas vulvares metastatizam predominantemente através dos vasos linfáticos, a presença de invasão vascular linfática (IVL), sobretudo examinada com auxílio da identificação imunoistoquímica dos vasos através do anticorpo D2-40, demonstrou ser um forte preditor de metástase linfonodal⁽⁸⁾.

Apesar da importância dos vasos linfáticos como principal via de disseminação da maioria dos carcinomas, marcadores específicos deste tipo de vaso foram identificados apenas bem recentemente^(9, 10). Vários marcadores endoteliais linfáticos foram descobertos e o verdadeiro papel dos linfáticos em metástase tumoral começa a emergir⁽⁹⁾. Várias moléculas especificamente expressas em células endoteliais linfáticas, como a podoplanina, o receptor 1 do endotélio de vasos linfáticos LYVE-1 (do inglês Lymphatic Vessel Endotelial receptor 1), e o gene *prox-1*, permitiram um estudo mais preciso dos vasos linfáticos^(9, 10). A determinação da densidade de vasos linfáticos foi associada a comprometimento linfonodal em vários tipos de câncer, como os carcinomas escamosos cervicais⁽¹¹⁾, carcinoma escamoso da cabeça e pescoço⁽¹²⁾, câncer colorretal⁽¹³⁾, câncer gástrico⁽¹⁴⁾ e câncer de pulmão de células não pequenas⁽¹⁵⁾. Na vulva, a densidade vascular linfática (DVL) foi determinada por imunoexpressão de podoplanina

em vasos no líquen escleroso para avaliar seu papel no desenvolvimento de carcinoma⁽¹⁶⁾. De acordo com os resultados deste estudo, não houve evidências do valor preditivo da quantidade de vasos linfáticos para carcinogênese. Até onde sabemos, não identificamos nenhum estudo que avaliasse a DVL em carcinomas da vulva.

Deve-se ressaltar que a DVL, embora seja a resultante do processo de linfangiogênese, não é sinônimo deste e depende de fatores de crescimento vascular e seus receptores, assim como de outras moléculas que regulam a formação de vasos e sua função. Entre estas moléculas, destaca-se a podoplanina, uma glicoproteína especificamente expressa por células endoteliais linfáticas mas que também é expressa por células neoplásicas escamosas^(17, 18). Estudos mais recentes indicam que a podoplanina atenua o potencial de disseminação linfática, possivelmente com base na supressão de linfangiogênese tumoral⁽¹⁹⁾. De fato, embora a expressão de podoplanina por células neoplásicas de CECs de diferente locais foi associada a mau prognóstico^{(17, 18), (20)}, estudos mais recentes mostram resultados contrários, ou seja, alta expressão de podoplanina relacionada a menores taxas de comprometimento linfonodal⁽²¹⁾. A podoplanina também é expressa em vários tipos de células especializadas em todo o organismo e demonstrou mediar uma via de migração celular coletiva, tanto *in vivo* como *in vitro*, oposta à via de disseminação por células isoladas, mediada pela E-caderina^(22, 23). Entretanto, nenhum estudo avaliou sua expressão em carcinomas escamosos vulvares.

2 *Objetivos*

Quantificar a densidade vascular linfática intratumoral em carcinomas escamosos vulvares através da expressão imunoistoquímica da podoplanina em vasos e determinar sua associação com fatores prognósticos clássicos (idade, estadiamento, tamanho do tumor, grau histológico, embolização vascular peritumoral, nível de infiltração do tumor), comprometimento linfonodal regional e sobrevida.

Determinar a frequência de expressão de podoplanina nas células neoplásicas e sua associação com a densidade vascular linfática, fatores prognósticos clássicos (idade, estadiamento, tamanho do tumor, grau histológico, embolização vascular peritumoral, nível de infiltração do tumor), comprometimento linfonodal regional e sobrevida.

3 Métodos

3.1 Seleção dos casos

O estudo foi observacional exploratório retrospectivo com coleta de casos no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), um Centro de Referência em Câncer na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo Comitê Ético de projetos de pesquisas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Comissão de Ética para Análise de Pesquisa - CAPPesq) (número do processo 0727/08) (Anexo 1), e pelo Comitê de Ética de projetos de pesquisas do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (São Paulo, Brasil).

Selecionamos 35 pacientes com carcinoma vulvar submetidas a tratamento cirúrgico primário entre 2001 e 2009. Incluímos pacientes consecutivas com diagnóstico de CEC, comprometimento nodal conhecido e blocos de parafina disponíveis. As características de apresentação dos casos selecionados encontram-se resumidas na tabela 1. Todas as

pacientes haviam sido submetidas à vulvectomy radical com retirada de linfonodos. A partir de dados dos prontuários determinamos o estadiamento cirúrgico de acordo com os critérios da FIGO 2008⁽²⁴⁾. O número de linfonodos avaliados em cada caso variou de 2 a 41 ($15,2 \pm 11,75$) (mediana=14,5). Nos 12 casos com menos de 6 linfonodos, um teve linfonodo positivo e as outras 11 pacientes foram submetidas a biópsia de linfonodo de sentinela.

3.2 Estudo anatomopatológico

Os preparados histológicos de todos os casos selecionados foram revisados independentemente por dois patologistas e os casos que tiveram discordância foram revisados juntamente com um terceiro patologista. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios da Classificação Histológica de Tumores da Organização Mundial de Saúde e categorizados como queratinizantes, não queratinizantes e basalóides⁽²⁾. A graduação histológica foi subjetiva, embora realizada independentemente por dois patologistas, e baseada nos limites da borda do tumor (definida ou infiltrativa), no padrão de infiltração das células neoplásicas (em grupos ou com tendência à perda de coesão celular), grau de pleomorfismo nuclear (discreto, moderado ou intenso) e na contagem mitótica.

Os tumores foram classificados de acordo com estas características em três categorias. O grau 1 foi aplicado aos tumores geralmente do subtipo queratinizante, com bordas bem definidas, compostos por grupos grandes e sólidos de células coesas com pleomorfismo nuclear mínimo e poucas mitoses (Figura 1).

Figura 1 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão queratinizante. Neoplasia composta por células coesas constituindo grupos grandes, com mínima atipia Hematoxilina-eosina – aumento original 400X

Os tumores categorizados como grau 2 foram geralmente aqueles de subtipo histológico não queratinizante, com bordas menos definidas, compostos por pequenos cordões e grupos de células neoplásicas com pleomorfismo nuclear moderado e mitoses mais freqüentes (Figura 2).

Figura 2 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão não queratinizante. Neoplasia composta por células ainda agrupadas, porém com maior grau de pleomorfismo nuclear em relação aos tumores de grau 1. Hematoxilina-eosina – aumento original 400X

Os tumores grau 3 foram caracterizados por perda marcante de coesão celular e/ou padrão de infiltração por células neoplásicas menores com alta relação núcleo/citoplasmática, frequentemente isolada ou em pequenos grupos. Neste grupo incluem-se carcinomas dos subtipos queratinizante e não queratinizante com sinais evidentes de perda de diferenciação e também o subtipo basalóide, composto por células escamosas pouco diferenciadas, similares às da camada basal do epitélio escamoso (Figura 3). Para fins de análise estatística, agrupamos os graus 2 e 3.

Figura 3 - Carcinoma escamoso, padrão basalóide. Hematoxilina-eosina – aumento original 400X

Outras variáveis histológicas analisadas foram a invasão vascular linfática (IVL) peritumoral e a profundidade da invasão estromal medida em milímetros a partir da base do epitélio.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas das 35 pacientes com carcinoma escamoso vulvar

Característica	Categorias	Distribuição/frequência	
Idade dos pacientes	Variação (média±DP)	38-96anos (70,1±14,41)	
Tamanho do tumor	Variação (média±DP)	1,0-8,0 cm (5,5±2,69)	
Período de seguimento (meses)	Variação (média±DP)	1-66 m (24,03±20,12)	
Estádio FIGO 2008	IB	n (%)	16 (45,7)
	II	n (%)	2 (5,7)
	IIIA	n (%)	0
	IIIb	n (%)	14 (40)
	IIIC	n (%)	3 (8,6)
Sub-tipo histológico	Queratinizante	n (%)	29 (82,8)
	Não-queratinizante	n (%)	3 (8,6)
	Basalóide	n (%)	3 (8,6)
Grau histológico	1	n (%)	11
	2	n (%)	20
	3	n (%)	4
Profundidade de Infiltração	Variação (média±DP)	0,09-12,0mm (1,0±1,9)	
Invasão linfática peritumoral	Sim	n (%)	16 (45,7)
	Não	n (%)	19 (54,3)
Metástase linfonodal	Sim	n (%)	17
	Não	n (%)	18
Desfecho	Óbito (total)	n (%)	12 (34,3)
	Óbito pela doença	n (%)	10 (28,6)
	Vivas com doença	n (%)	0 (0)
	Vivas sem doença	n (%)	22 (62,8)
	Desconhecido	n (%)	1(2,8)

No momento da revisão histológica era selecionada uma área periférica representativa do tumor para a construção de blocos de microarranjos de tecido e estudo imunoistoquímico. A área selecionada correspondeu, em todos os casos, a uma área histológica bem preservada do ponto de vista técnico (fixação e coloração adequadas sem artefatos), mais próxima da interface com o estroma subjacente.

3.3 Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA – “Tissue MicroArray”)

As áreas tumorais selecionadas nas lâminas foram marcadas nos blocos de parafina correspondentes ao doador. Do local marcado foi retirado um cilindro de material (2,0 mm de diâmetro) de cada caso, o qual foi disposto em blocos de parafina receptores a intervalos de 1 mm, utilizando um instrumento de precisão para a construção de microarranjos (Beecher instruments, Silver Spring, MD) (Figura 4).

Figura 4 - Fotografia do instrumento utilizado para a construção dos microarranjos de tecido

Estabeleceu-se um mapa no qual cada cilindro de tecido tinha uma coordenada x e y para identificação da amostra (Figura 5). Foram obtidos dois blocos com 35 amostras de tecido. Os blocos foram selados a 60°C por 10 min e submetidos a cortes histológicos com 3 µm de espessura que foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA) e mantidos em estufa por 4 horas. As primeiras secções histológicas foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina para confirmar se as áreas corretas haviam sido incluídas nos blocos (Figuras 6 e 7).

Linha (x) ▶ ▼ Coluna (y)							
	A	B	C	D	E	F	G
	(1,00)	(2,00)	(3,00)	(4,00)	(5,00)	(6,00)	(7,00)
01 (1,00)	FIGADO	00-3797 LE	01-1429 LE	01-2951 TU	02-1014 L	03-6148 C	
02 (2,00)	03-11545 D	03-11545 A	04-8383 H	04-10322 G	05-527 E	05-4088 B	
03 (3,00)	05-4169 D	05-5593 D	05-6418 A	05-8550 B	05-10023 A	05-10339 A	
04 (4,00)	05-11596 D	06-1141 C	06-2800 L	06-2876 H	06-2904 A	06-5418 B	
05 (5,00)	06-5746 B	06-7003 A	06-8037 E	06-8543 G	07-782 A	07-1395 H	
06 (6,00)							

Figura 5 - Mapa de um dos blocos de TMA para orientação dos casos

Figura 6 - Corte histológico de um dos blocos de microarranjos de tecido corado pela hematoxilina-eosina

Figura 7 - Detalhe de um dos casos incluídos em um dos blocos de TMA corado por hematoxilina-eosina

3.4 Estudo imunoistoquímico

Os cortes histológicos foram submetidos a desparafinização com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS; Sigma, St. Louis, EUA), com bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% por 20 min. Para a recuperação antigênica, após várias lavagens em PBS, as secções histológicas foram aquecidas em forno de microondas (Electrolux, 900W) por 15 min em tampão de citrato 0,01 M, pH 6,0 e foram então resfriadas

em temperatura ambiente por 20 min. As seções foram então incubadas “overnight” com uma diluição de 1:400 do anticorpo monoclonal contra podoplanina humana (clone D2-40, REF. M3619, Dako, Carpinteria, CA). Após incubação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com “Post-Primary Block” (Novocastra REF. 7159). Foi utilizado o sistema de detecção por polímeros Novolink (Novolink Polymer, Novocastra REF. 7161), conforme instruções do fabricante. Para expressão em células neoplásicas, consideramos positivos todos os casos com coloração moderada ou intensa no citoplasma, em mais de 10% das células neoplásicas (Figura 8).

Figura 8 - Carcinoma de células escamosas mostrando expressão imunoistoquímica de podoplanina no citoplasma de células neoplásicas (D2-40, aumento original – 400X)

3.5 Quantificação da densidade vascular linfática intratumoral

As secções histológicas de TMA marcadas foram analisadas utilizando microscopia ótica padrão (microscópio marca Nikon, modelo Eclipse 200). As áreas intratumorais mais vascularizadas foram identificadas com menor aumento microscópico. Contamos o número de vasos linfáticos corados observados no total de 10 campos microscópicos de grande aumento (400X) das áreas com maior densidade selecionadas ao menor aumento. Apenas os vasos que apresentaram morfologia típica de vaso (disposição de células no formato de vasos com lúmen) foram considerados vasos linfáticos (Figura 9). O valor da DVL para cada caso foi 10 campos microscópicos com alto poder (X400).

Figura 9 - Corte histológico de CEC vulvar submetido a exame imunoistoquímico para identificação de vasos linfáticos no estroma intratumoral através do anticorpo contra podoplanina D2-40. Notam-se pelo menos três vasos no campo apresentado (aumento original 400X)

3.6 Análise estatística

A DVL foi analisada como uma variável contínua e como variável dicotômica. A mediana de todos os valores numéricos da DVL foi a linha de corte para classificar os tumores nos grupos de alta DVL (valor acima da mediana) e baixa DVL (abaixo da mediana), conforme sugerido por Hall e cols.⁽²⁵⁾.

O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para comparar a variável DVL contínua em dois grupos determinados pelas variáveis categóricas Estadiamento FIGO (precoce e avançado), grau histológico (1 e 2/3), IVL (presente ou ausente), metástase linfonodal (presente ou ausente) e desfecho (óbitos e vivas). A correlação entre a DVL numérica e as demais variáveis numéricas (idade, tamanho do tumor e profundidade da invasão) foi feita através do coeficiente de postos de Spearman.

O teste exato de Fisher foi utilizado para se determinar a associação entre a variável DVL intratumoral dicotômica e as seguintes características: estágio FIGO, grau histológico, IVL, metástase linfonodal e desfecho. O teste *t* com correção automática para variâncias desiguais (teste de Welch) foi utilizado para comparar a idade das pacientes, tamanho do tumor e profundidade da invasão nos grupos de alta e baixa DVL.

Curvas de sobrevida geral e de comprometimento linfonodal foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas quanto a DVL através da estatística do logrank de Cox-Mantel.

As associações entre a expressão de podoplanina pelas células neoplásicas e as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. As associações entre expressão de podoplanina pela neoplasia e as variáveis numéricas foram feitas através do teste de Mann-Whitney U.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o MedCalc para Windows, versão 11.5.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

4 Resultados

Os valores de DVL variaram de 0 a 8,8 ($1,8 \pm 2,2$). A mediana foi de 0,9 vasos. A correlação entre DVL e as variáveis numéricas pode ser vista na tabela 2. Houve uma significativa relação inversa entre profundidade de invasão e DVL e uma tendência à relação inversa entre DVL e idade da paciente.

Tabela 2 - Correlação entre a DVL intratumoral e variáveis numéricas

Variáveis	Alto LVD	Baixo LVD	Valor-p
Idade dos Pacientes (anos)	66.6 ± 17.00	73.8 ± 10.30	0.138
Tamanho do Tumor	4.5 ± 2.08 cm	5.4 ± 2.86 cm	0.274
Profundidade de Invasão (mm)	5.4 ± 2.7	8.8 ± 2.81	0.0007

Os resultados referentes à associação entre DVL numérica com o sub-tipo histológico, grau histológico, estadiamento da FIGO, IVL, comprometimento linfonodal, e desfecho são apresentados na tabela 3. Os resultados mostram uma associação negativa entre a DVL e IVL ($p=0,0191$). A DVL foi mais alta nos casos de carcinomas de baixo grau, tumores de

estádio precoce, com linfonodo negativo e nas pacientes que estavam vivas, embora as diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas nominais e associação com densidade de microvasos linfáticos (DVL)

		DVL (média±DP)	DVL (mediana)	IC 95% para a mediana	Valor de p*
Estádio FIGO 2008	IB/II	2,43±2,58	2,10	0,1795 a 3,3000	0,2021
	III	1,14±1,54	0,70	0,1016 a 1,2984	
Grau histológico	1	2,03±2,21	1,20	0,0000-3,6492	0,6816
	2 ou 3	1,69±2,24	0,60	0,1747-2,4760	
Invasão linfática	Sim	0,9±1,69	0,25	0,0000-0,9807	0,0191
	Não	2,5±2,39	1,50	0,9346-3,3872	
Metástase linfonodal	Sim	1,14±1,54	0,70	0,1016 a 1,2984	0,2021
	Não	2,43±2,58	2,10	0,1795 a 3,3000	
Desfecho	Mortas	1,3±1,26	0,9	0,2950 a 2,5575	0,6948
	Vivas	2,17±2,51	1,2	0,1698 a 3,2651	

* Teste de Mann-Whitney U

As associações entre a DVL dicotômica e as variáveis clínico-patológicas estudadas encontram-se na tabela 4. A profundidade da invasão e IVL foram confirmadas com as únicas variáveis com diferenças estatísticas significativas nos grupos de alta e baixa DVL, mostrando relação inversa com esta. A DVL alta em comparação com DVL baixa foi mais frequentemente associada a baixo estágio (55,6% vs. 35,3%), baixo grau (38,9% vs. 23,6%), linfonodos negativos (61,1% vs. 41,2%), e menos mortes

relacionadas ao câncer (27,8% vs. 33,3%). Entretanto, essas diferenças não tiveram significância estatística.

Tabela 4 - Associação entre DVL dicotômica e variáveis clínico-patológicas

Variável	Categorias	DVL elevada	DVL baixa	Valor de p
Idade dos pacientes		66,6±17,00 anos	73,8±10,30 anos	0,138 *
Estágio FIGO 2008	IB/II	11 (61,1%)	7 (41,2%)	0,3175
	III	7 (38,9%)	10 (58,8%)	
Tamanho do tumor		4,5±2,08 cm	5,4±2,86cm	0,274
Grau histológico	1	7 (38,9%)	4 (23,6%)	0,2705
	2 ou 3	11 (61,1%)	13 (76,4%)	
Invasão linfática	Sim	4 (22,2%)	12 (70,6%)	0,0067**
	Não	14 (77,8%)	5 (29,4%)	
Profundidade da invasão (mm)		5,4±2,7	8,8±2,81	0,0007
Metástase linfonodal	Sim	7 (38,9%)	10 (58,8%)	0,1482
	Não	11 (61,1%)	7 (41,2%)	
Desfecho	Mortas	5 (27,8%)	5*** (33,3%)	0,2779
	Vivas	13 (72,2%)	10 (66,7%)	

* teste t

** Teste exato de Fisher

*** Excluindo-se 2 casos de morte não relacionada ao câncer

Os resultados das análises univariadas relacionadas a sobrevida geral são apresentados na tabela 5. As curvas de Kaplan-Meier para visualização da influência da DVL intratumoral na sobrevida geral estão ilustradas nas figura 10.

Tabela 5 - Análise univariada para sobrevida geral em 35 carcinomas vulvares

Fator	Sobrevida geral			
	HR	IC95%	Teste <i>Logrank</i>	
			χ^2	p
Estágio FIGO IB/II vs. III	0,1771	0,05391 – 0,5819	6,4357	0,011
Invasão linfática	1,0366	0,3157 – 3,4040	0,0036	0,9523
DVL	2,8172	0,8354 – 9,5004	3,0902	0,078
Comprometimento linfonodal	5,6458	1,7184 – 18,5496	6,4357	0,011

HR: Hazard Ratio; DVL:Densidade do vaso linfático

Figura 10 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida geral em 35 pacientes divididas quanto a DVL intratumoral

Os resultados referentes a expressão de podoplanina pelas células neoplásicas e sua associação com as características clínico-patológicas estudadas pode ser vista na tabela 6.

Tabela 6 - Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas de CEC de vulva e características clínico-patológicas

Características estudadas	Podoplanina			P
	Número de casos	Positiva 11/35 (31,4%)	Negativa 24/35 (68,6%)	
Idade da paciente (anos)	média±DP	67,3±15,43	71,4±14,06	0,328*
Estágio FIGO 2008	I/II	5	13	0,724**
	III	6	11	
Tamanho do tumor	média±DP	6,1±2,39	4,4±2,40	0,046*
Grau histológico	1	3	8	1,000**
	2 ou 3	8	16	
Profundidade de invasão (mm)		0,7±0,33	0,7±0,32	0,748*
Invasão linfática	Sim	6	11	1,000**
	Não	5	13	
DVL intratumoral, numérica	média±DP	2,6±3,09	1,4±1,62	0,682*
DVL, categórica	Alta	6	12	1,000**
	Baixa	5	12	
Comprometimento linfonodal	Sim	6	11	0,724**
	Não	5	13	
Desfecho	Óbito	4	8	1,000**
	Vivas	7	15	

* teste de Mann-Whitney U

** teste exato de Fisher

5 Discussão

A vasculatura linfática funciona como uma via importante para a disseminação regional e sistêmica em muitos tipos de câncer, incluindo-se nos carcinomas vulvares. Acredita-se que o microambiente, incluindo a linfangiogênese, tenha um papel essencial para a metastatização de células cancerígenas para os linfonodos regionais. Neste cenário, atingir a linfangiogênese através de agentes anti-linfangiogênicos parece ser uma forma promissora de prevenir a progressão linfática^(13, 26).

Entretanto, a linfangiogênese é um processo muito complexo sob controle gênico caprichoso e está longe de estar completamente elucidada. O crescimento linfático depende da interação de vários ligantes do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os membros de famílias receptoras. Os ligantes VEGF-A, VEGF-E, VEGF-C e VEGF-D podem estimular a angiogênese através dos receptores VEGF 1 e 2, e a linfangiogênese tumoral através dos receptores 2 e 3 do VEGF⁽²⁷⁾. Entretanto, no câncer, esses fatores linfangiogênicos conhecidos levam à estimulação simultânea da angiogênese e linfangiogênese⁽²⁸⁾. Além disso, vários genes como o *Prox1*, *T1α/podoplanina*, e o *LYVE1* tem um papel essencial na linfangiogênese de forma que os produtos destes genes vem sendo utilizados para especificamente identificar e

quantificar vasos linfáticos em tumores⁽¹⁰⁾. Entre estes, a podoplanina, uma mucina glicoproteica transmembrana de 38kDa que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40, é considerada como o marcador mais confiável com alta especificidade e sensibilidade⁽¹⁰⁾. O papel dos vasos linfáticos na disseminação neoplásica, ainda por ser compreendido, depende da compilação de resultados de diferentes grupos, diferentes cânceres e dos diferentes marcadores moleculares implicados em várias etapas do desenvolvimento dos linfáticos. Estes resultados mostrarão o que está por trás da propensão para disseminação linfática evidente em vários tipos de cânceres, como carcinoma escamoso vulvar. Como não há estudos sobre a linfangiogênese em carcinomas vulvares, decidimos começar determinando a DVL intratumoral. Deve ficar claro que a densidade linfática não é sinônimo de linfangiogênese, embora seja resultado de todo o processo até este ponto. Outras moléculas implicadas no processo de linfangiogênese, especialmente os fatores de crescimento vascular, podem ser agregadas para melhor compreender as vias de disseminação regional e distante dos tumores. Na verdade, vários autores descreveram uma associação significativa entre os fatores de crescimento e seus receptores com a densidade de vasos no tumor^(29, 30).

A própria avaliação da densidade vascular não nos apresenta consenso sobre qual é o melhor compartimento para avaliar a DVL, se intra ou peritumoral, nem sobre quais seriam os melhores marcadores moleculares para definir todo o processo de linfangiogênese e os possíveis alvos terapêuticos. Quanto à avaliação da DVL, os resultados são controversos, em parte devido aos diferentes métodos de estudo. Podemos

citar, por exemplo, os resultados de estudos que avaliaram o carcinoma de colo uterino. No estudo de Zhang e cols, tanto a DVL intra quanto a peritumoral foram associadas a comprometimento linfonodal⁽¹¹⁾. Já Saad e cols. descreveram que apenas a DVL peritumoral apresentou uma associação significativa com comprometimento linfonodal e sobrevidas livre de doença e geral⁽³¹⁾. Por outro lado, no estudo de Birner e cols⁽³²⁾ e do nosso grupo em estudo prévio⁽³³⁾, a DVL intratumoral foi associada a um prognóstico favorável, muito similar ao que encontramos neste trabalho.

Surpreendentemente, nossos resultados com câncer vulvar, embora limitados pelo tamanho da amostra, também sugeriram uma associação entre DVL mais elevada com fatores prognósticos favoráveis. Em estudo prévio utilizando o mesmo método de avaliação da DVL em carcinomas endometriais encontramos resultados semelhantes, ou seja, uma associação de DVL intratumoral com características relacionadas a doença mais localizada e melhor desfecho⁽³⁴⁾. Considerando-se que o método de avaliação foi o mesmo nos três estudos, esses achados são difíceis de explicar. Intuitivamente esperávamos que quanto mais vasos um tumor tivesse, mais fácil seria a disseminação linfática. A maior parte dos dados da literatura ou não apresenta uma associação entre DVL intratumoral e prognóstico^(29, 35) ou apresenta uma associação positiva^(11, 25, 36), resultados que são mais fáceis de explicar. Entretanto, nossos resultados atuais com os carcinomas vulvares e com câncer endometrial e cervical em estudos anteriores^(33, 34) demonstraram o contrário. Uma possível explicação para os nossos resultados é que, embora um número mais elevado de vasos linfáticos esteja presente no estroma intratumoral, estes

vasos não são funcionais, e, além disso, podem prejudicar a drenagem local dificultando o transporte de células neoplásicas para fora da área tumoral. A próxima etapa para uma melhor compreensão do que de fato ocorre nos carcinomas vulvares seria acrescentar mais casos e analisar o papel dos fatores de crescimento vascular e seus receptores, assim como outras moléculas que regulam não apenas a formação de vasos, mas sua função. Entre essas moléculas, está a podoplanina expressa pelas células neoplásicas escamosas e que deve atenuar o potencial de disseminação linfática, possivelmente com base na supressão da linfangiogênese tumoral⁽¹⁹⁾. Neste estudo não pudemos identificar nenhuma associação da podoplanina com DVL ou com as características clínico-patológicas estudadas. Entretanto, em estudo prévio, o nosso grupo avaliou a expressão de podoplanina em carcinomas de colo uterino e pode demonstrar uma tendência a associação entre ela e prognóstico mais favorável⁽³⁷⁾.

Deve-se ressaltar que a densidade vascular linfática resulta de um processo biológico complexo que envolve uma interação entre o tumor, vasos e micro-ambiente. Entretanto, podemos dizer que, em nossas mãos, a densidade vascular linfática intratumoral tem uma associação inversa com o desfecho, pelo menos em casos de câncer ginecológico. Esses resultados indicam que ainda é muito cedo para se considerar qualquer terapia anti-linfangiogênica. É necessário compreender melhor todo o transporte linfático de células neoplásicas antes de planejar novas abordagens terapêuticas tendo como alvo os vasos linfáticos.

6 Conclusões

A densidade vascular linfática intratumoral (DVL) em cada caso variou de 0 a 8,8 ($1,8 \pm 2,2$) e apresentou mediana de 0,9 vasos. Houve tendência a associação inversa entre DVL e idade da paciente. A DVL se associou inversamente a nível de profundidade de invasão e invasão vascular linfática. Embora não tenha atingido nível estatístico de significância, valores mais altos da DVL se associaram a estádios mais precoces da doença, tumores menores, menor grau histológico, linfonodos negativos e menores taxas de óbito pela doença.

Na análise univariada a DVL apresentou tendência a maior sobrevida.

A podoplanina apresentou expressão em células neoplásicas em 11 (31,4%) casos. Ela se associou a tumores maiores. Não houve associação significativa com a DVL, demais características prognósticas, comprometimento linfonodal e sobrevida.

7 Anexo

Anexo 1 – Aprovação do projeto

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ao
Departamento de Ginecologia e Obstetria

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.09.2010, tomou conhecimento da alteração de título, relatório de andamento do Protocolo de Pesquisa nº **0727/08** "Avaliação da Linfangiogênese em Carcinoma Espinocelular de Vulva" para "Avaliações da Microdensidade Vascular Linfática Intratumoral e da Expressão de Podoplanina em Carcinomas Escamosos Vulvares" será dissertação de mestrado de aluna Renata Sampaio Goes, tendo como orientadora a Profa. Dra. Filomena M. Carvalho.

CAPPesq, 09 de setembro de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Chada Baricau
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação Obstetria e
Ginecologia - DGG/FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
Julio Cesar

8¹ Referências

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;**60**: 277-300.
- [2] Tavassoli FA, Deville A. *Pathology & Genetics Tumours of Breast and Female Genital Organs*. Lion: International Agency for Research on Cancer - IARC Press 2003.
- [3] van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol.* 2006;**25**: 22-9.
- [4] Cheng X, Zang R, Wu X et al. Recurrence patterns and prognostic factors in Chinese patients with squamous cell carcinoma of the vulva treated with primary surgery. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;**19**: 158-62.
- [5] Nicoletto MO, Parenti A, Del Bianco P et al. Vulvar cancer: prognostic factors. *Anticancer Res.* 2010;**30**: 2311-7.
- [6] Gaarenstroom KN, Kenter GG, Trimbos JB et al. Postoperative complications after vulvectomy and inguinofemoral lymphadenectomy using separate groin incisions. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;**13**: 522-7.
- [7] Oonk MH, Hollema H, de Hullu JA, van der Zee AG. Prediction of lymph node metastases in vulvar cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;**16**: 963-71.
- [8] Braun M, Wardelmann E, Debal M et al. Detection of lymphovascular invasion in vulvar cancer by D2-40 (podoplanin) as a predictor for inguinal lymph node metastases. *Onkologie.* 2009;**32**: 732-8.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

-
- [9] Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *J Clin Oncol*. 2007;**25**: 4298-307.
- [10] Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer*. 2006;**95**: 1611-25.
- [11] Zhang SQ, Yu H, Zhang LL. Clinical implications of increased lymph vessel density in the lymphatic metastasis of early-stage invasive cervical carcinoma: a clinical immunohistochemical method study. *BMC Cancer*. 2009;**9**: 64.
- [12] Maula SM, Luukkaa M, Grénman R et al. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res*. 2003;**63**: 1920-6.
- [13] Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y et al. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;**50**: 308-14.
- [14] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M et al. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol*. 2006;**59**: 77-82.
- [15] Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;**11**: 7344-53.
- [16] van der Avoort IA, van der Laak JA, Otte-Höller I et al. The prognostic value of blood and lymph vessel parameters in lichen sclerosis for vulvar squamous cell carcinoma development: an immunohistochemical and electron microscopy study. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;**203**: 167.e1-8.
- [17] Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC et al. Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2009;**24**: 1021-7.
- [18] Yuan P, Temam S, El-Naggar A et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 2006;**107**: 563-9.

-
- [19] Suzuki H, Onimaru M, Yonemitsu Y et al. Podoplanin in cancer cells is experimentally able to attenuate prolymphangiogenic and lymphogenous metastatic potentials of lung squamoid cancer cells. *Mol Cancer*. 2010;**9**: 287.
- [20] Dumoff KL, Chu C, Xu X et al. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2005;**18**: 97-104.
- [21] Suzuki H, Onimaru M, Koga T et al. High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2010.
- [22] Wicki A, Lehembre F, Wick N et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006;**9**: 261-72.
- [23] Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007;**96**: 1-5.
- [24] Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;**105**: 103-4.
- [25] Hall FT, Freeman JL, Asa SL et al. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;**129**: 716-9.
- [26] Al-Rawi MA, Jiang WG. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Front Biosci*. 2011;**16**: 723-39.
- [27] Hirakawa S. From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci*. 2009;**100**: 983-9.
- [28] Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005;**5**: 735-43.
- [29] Wang XL, Fang JP, Tang RY, Chen XM. Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: a retrospective study of 123 cases. *BMC Cancer*. 2010;**10**: 299.
- [30] Miyata Y, Kanda S, Ohba K et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin Cancer Res*. 2006;**12**: 800-6.

-
- [31] Saad RS, Ismiil N, Ghorab Z et al. Lymphatic vessel density as a prognostic marker in clinical stage I endocervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2010;**29**: 386-93.
- [32] Birner P, Schindl M, Obermair A et al. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2001;**95**: 29-33.
- [33] Zaganelli FL, Carvalho FM, Almeida BG et al. Intratumoral lymphatic vessel density and clinicopathologic features of patients with early-stage cervical cancer after radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;**20**: 1225-31.
- [34] Kawamura L, Carvalho FM, Alves BG et al. Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol*. 2010;**8**: 89.
- [35] Sotiropoulou N, Bravou V, Kounelis S et al. Tumour expression of lymphangiogenic growth factors but not lymphatic vessel density is implicated in human cervical cancer progression. *Pathology*. 2010;**42**: 629-36.
- [36] Maula SM, Luukkaa M, Grenman R et al. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res*. 2003;**63**: 1920-6.
- [37] Carvalho FM, Zaganelli FL, Almeida BG et al. Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas. *Clinics*. 2010;**65**: 1279-83.