

LINFANGIOGÊNESE EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

ELEN ALVES DE SOUSA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

Co-Orientadora: Dra Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sousa, Elen Alves de

Linfangiogênese em carcinoma epidermóide oral e associação com características clinicopatológicas / Elen Alves de Sousa – São Paulo, 2012.

72p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. LINFANGIOGÊNESE. 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 3. CAVIDADE ORAL. 4. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que são à base da minha vida e as pessoas que me inspiram a ser a pessoa de caráter que eu me tornei.

Dedico também a Dra Cláudia, minha orientadora que é uma pessoa fantástica, resumindo uma mulher incrível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me da saúde, uma família linda, pessoas maravilhosas ao meu redor.

Agradeço aos meus pais por tudo o que eles são e representa na minha vida, o quanto me ajudam e sei que irão me ajudar ainda.

Agradeço a Dra Cláudia por me orientar de verdade, por ser uma pessoa fantástica que eu gostaria de me tornar pelo menos metade de tudo o que ela é e representa pra mim e pra muita gente.

Agradeço a Dra Silvia por me orientar e me ensinar muitas coisas durante esse período de convivência.

Agradeço a minha Irmã Erika por ser do jeito que ela é, por ser a pessoa mais generosa que eu conheço, e principalmente por ter um filho lindo que eu amo de paixão Eduardo meu amarelo.

Agradeço ao meu sobrinho lindo que todos os dias faz a minha vida mais colorida.

Agradeço meu irmão Lucas por ser o maior e melhor irmão que eu podia ter.

Agradeço ao meu cão Maylon que nos deixou há pouco tempo, mas que sempre foi o melhor cão do mundo.

Agradeço meus avôs que não estão mais aqui, e as minhas avós que sempre se preocupam e me colocam em todas as orações.

Agradeço a todos os meus tios e tias pela preocupação e pelo carinho e por me ligarem sempre pra me incentivar a ir mais longe.

Agradeço ao meu namorado pelo companheirismo, pelo apoio, pelo carinho, amor, dedicação e por sempre me incentivar a ir sempre mais longe.

Agradeço também a família do meu namorado por me incentivarem e por me emprestar o computador por muitas vezes, e também por me dar esse filho maravilhoso.

Agradeço a Malu por ser mais do que uma colega de trabalho da minha mãe, obrigado por fazer parte da minha família.

Agradeço a Nina por ser tão carinhosa com toda a minha família.

Agradeço a professora Mariana Cristofi, que foi a pessoa que me fez ser apaixonada por biologia, e além de uma incrível professora se tornou uma amiga que quero sempre perto de mim.

Agradeço a Gabriela Madureira por ser sempre a minha amiga e fazer parte dos meus dias.

Agradeço a Bárbara porque além de amiga, foi ela que me mostrou a oportunidade de entrar no mestrado.

Agradeço a Rafinha por me permitir fazer parte da vida dela e por abrir as portas da sua casa todos os dias, e também por me fazer ganhar uma nova família.

Agradeço a Sandrinha por ser uma amiga tão bacana.

Agradeço meus ex-alunos do Colégio Arbos que até hoje me ligam desejando a minha volta.

Agradeço a Laura por me ensinar muita coisa, pelas risadas e conversas muito proveitosas e por ser a minha italiana favorita.

Agradeço as meninas da pós (Vanuza, Luciana e Ana) pela gentileza e agilidade e pronto atendimento para tudo o que precisamos.

Agradeço a todo corpo docente da Fundação Antonio Prudente por passarem seus conhecimentos.

Agradeço a Aline da estatística pela enorme ajuda.

Agradeço a todos os funcionários do hospital pela prestação de serviços (meninas do comitê de ética, funcionários do CIPE).

Agradeço a todos os funcionários da biblioteca em especial a Suely e o Jefferson, pela paciência de corrigir tudo e ainda ensinar como fazer tudo de novo.

Agradeço aos meninos do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico-SAME por me ajudarem a desvendar os quebra cabeças mais difíceis daqueles prontuários.

Agradeço as meninas e meninos do CIPE pelas ajudas sempre bem vindas, pelas risadas nos momentos vagos e por fazerem parte da minha vida de alguma maneira. Em especial Renatinha, Priscila Samara, Bárbara, Beatriz

Nunes, Michelle, Flávia, Victoria, Ana Claudia, Ligia, Beatriz Maia, Bruninha, Fernanda, Camila, Mariana, Juliana, Alice, e é claro a Dra. Cláudia.

Agradeço os funcionários da patologia, por liberarem o espaço pra mim por muitas vezes, por serem tão gentis e por atender meus pedidos, em especial Carlinhos, Severino e Ivan.

Agradeço a família Estilo por sempre se preocuparem comigo, por ter professores maravilhosos, por me ajudarem a liberar toda adrenalina acumulada.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que de alguma maneira se preocupam comigo.

RESUMO

Sousa EA. **Linfangiogênese em carcinoma epidermóide oral e associação com características clinicopatológicas**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma de cabeça e pescoço é o quinto tumor mais comum em todo o mundo, sendo 90% das neoplasias orais correspondentes a carcinomas de células escamosas (ou carcinoma epidermóide). Os principais tratamentos para pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são cirurgia e radioterapia. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, em quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevida de 5 anos não melhorou significativamente nas duas últimas décadas, sendo que a taxa de recorrência do carcinoma oral varia de 18 a 76% nos pacientes submetidos ao tratamento padrão. Muitos fatores clínicos e patológicos têm sido associados à recorrência local do carcinoma oral, tais como estadió da doença, metástases em linfonodos, invasão perineural e vascular, grau histológico, gênero, idade e local do tumor. O acometimento de linfonodos é o fator prognóstico mais importante para sobrevida de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. A linfangiogênese é o crescimento de novos vasos linfáticos por um processo de múltiplos passos similar ao da angiogênese: migração de células endoteliais, proliferação e rearranjo, associado à degradação, reconstrução e produção de matriz extracelular. Contudo, o mecanismo inicial para a proliferação linfática ainda não está estabelecido. Diversos estudos têm analisado linfangiogênese por meio de imunoistoquímica em diversos tipos tumorais, mas os resultados são controversos. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de marcadores de linfangiogênese em amostras de pacientes portadores de carcinoma epidermóide oral por imunoistoquímica utilizando-se os marcadores VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40, e integrina- β 1 e associar a expressão desses marcadores com características clinicopatológicas dos

tumores. Foram selecionados 52 pacientes portadores de CEC de cavidade oral e 30 linfonodos comprometidos por tumor correspondentes a 21 desses pacientes. As proteínas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 foram predominantemente negativas: a proteína VEGF-C foi positiva em 16 (38,8%) pacientes e negativa em 32 (61,2%) e positiva em 06 (23,0%) linfonodos e negativa em 14 (77,0%). A proteína VEGF-D foi positiva em 02 (4,0%) pacientes e negativa em 50 (96,0%) e positiva em 01 (0,3%) linfonodo e negativa em 20 (99,7%). A proteína VEGFR3 foi positiva em 07 (18,8%) pacientes e negativa em 40 (81,2%) e positiva em 07 (30,7%) linfonodos e negativa em 10 (69,3%). Já a proteína integrina- β 1 foi predominantemente positiva: 45 (90,0%) pacientes apresentaram positividade e 05 (10,0%) ausência de expressão e 13 (65,0%) linfonodos foram positivos e 07 (35,0%) negativos. A expressão da proteína D2-40 foi avaliada no equipamento ACISIII. As regiões peritumorais foram delimitadas manualmente (10 áreas por lâmina) e a contagem de vasos foi realizada utilizando-se o algoritmo *MVD*. A média do número de vasos no tumor foi de 0,000661291 e nos linfonodos foi de 0,000519792. A média da área dos vasos no tumor foi de 0,601975065 e no linfonodo foi de 0,388945956, sendo observada positividade nas amostras provenientes de todos os pacientes. Não foram observadas associações entre a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 e características clínico-patológicas: parece haver uma associação entre a expressão das proteínas integrina- β 1 no tumor, D2-40 (área dos vasos) nos linfonodos e tumores em estadio avançado. Não houve associação da expressão dessas proteínas quando comparada a expressão no tumor e linfonodo comprometido por tumor. Contudo, foi observada uma associação entre maior densidade de vasos linfáticos e ausência de expressão de VEGFR3 no linfonodo comprometido por tumor. Com relação à análise de sobrevida, não foi observada associação da expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 e as taxas de sobrevida câncer específica e livre de doença. Considerando-se as variáveis clínico-patológicas, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida câncer

específica entre os pacientes com estadiamento clínico/patológico inicial/avançado e também pacientes portadores de tumores com e sem invasão perineural, fatores que já são avaliados na determinação do prognóstico dos pacientes.

SUMMARY

Sousa EA. **[Lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Head and neck cancer is the fifth-most prevalent cancer worldwide and squamous cell carcinoma (SCC) constitutes at least 90% of all oral malignancies. The main treatments for patients with head neck SCC are surgery and radiotherapy. Although the advances in surgical techniques, chemotherapy and radiotherapy, the 5-year survival rate has not improved significantly in the last two decades, being the rates of recurrence of oral carcinoma ranging from 18 to 76% in patients undergoing standard treatment. Many clinical and pathological factors have been associated with local recurrence of oral carcinoma, such as stage of disease, metastases in lymph nodes, perineural invasion. Lymph node involvement is the strongest prognostic factor for head and neck patients. Lymphangiogenesis is the growth of newly formed lymphatic vessels by a multiple-step process similar to that of angiogenesis: endothelial cell migration, proliferation and rearrangement, along with degradation, reconstruction and production of extracellular matrix. However, the exact initiating mechanism for lymphatic proliferation is not established yet. Several studies have examined lymphangiogenesis by means of immunohistochemistry in several tumor types. However, the results are controversial. The goal of this study was to investigate the presence of VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40, and integrin- β 1 in samples from patients with oral squamous cell carcinoma by immunohistochemistry and associate the expression of these proteins with clinicopathological characteristics of the tumors. Fifty-two oral squamous cell carcinoma patients and 30 lymph nodes (from 21 out of the 52 patients) were selected. VEGF-C, VEGF-D and VEGFR3 were predominantly negative: VEGF-C protein was positive in 16 (38.8%) patients and negative in 32

(61.2%) and positive in 06 (23.0%) lymph nodes and negative in 14 (77.0%). VEGF-D protein was positive in 02 (4.0%) patients and negative in 50 (96.0%) and positive in 01 (0.3%) lymph node and negative in 20 (99.7%). VEGFR3 protein was positive in 07 (18.8%) patients and negative in 40 (81.2%) and positive in 07 (30.7%) lymph nodes and negative in 10 (69.3%). Integrin- β 1 protein was predominantly positive: 45 (90.0%) patients were positive and 05 (10.0%) were negative and 13 (65.0%) lymph nodes were positive and 07 (35.0%) negative. The expression of D2-40 protein was evaluated using an automated cell imaging system (ACISIII). Peritumoral regions were manually delineated (10 fields to slide) and the vessels count was performed using the algorithm MVD. The mean number of vessels in the tumor was 0.000661291 and 0.000519792 in lymph nodes. The mean area of the vessels in the tumor was 0.601975065 and 0.388945956 in lymph nodes. Positivity for D2-40 was observed in all patient samples. No associations were observed between the expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR3 and clinicopathological characteristics: there seems to be an association between the expression of β 1-integrin proteins in the tumor, D2-40 (vessel area) in the lymph nodes with advanced tumors. There was no association between the expression of the proteins in the tumor and in the lymph nodes. However, we observed an association between higher density of lymph vessels and absence of expression of VEGFR3 in the lymph node. Cancer-specific and disease-free survival rates were not statistically different between the patients with positive or negative expression of VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 and integrin- β 1. Considering the clinical and pathological characteristics, we observed a statistically difference between cancer-specific survival rates between patients with early/advanced clinical/pathological stage of the disease and in patients with/without perineural invasion, factors that are already assessed in determining the prognosis of patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) e seus receptores.....	5
Figura 2	Imagens representativas de algumas amostras selecionadas de carcinoma epidermóide oral corados com HE.....	17
Figura 3	Resultados representativos das reações de imunoistoquímica em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	21
Figura 4	Resultados representativos das reações de imunoistoquímica em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	24
Figura 5	Análise da correlação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos e área dos vasos) em amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	38
Figura 6	Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o estadiamento clínico.....	49
Figura 7	Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o estadiamento patológico.....	50
Figura 8	Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se a presença/ausência de invasão perineural.....	51
Figura 9	Sobrevida livre de recidiva para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o local do tumor.....	52

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos utilizados, clonalidade, procedência e padronização.....	12
Tabela 1	Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	18
Tabela 2	Imunoexpressão dos marcadores de linfangiogênese em amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	19
Tabela 3	Associação da expressão da proteína integrina- β 1 com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	25
Tabela 4	Associação da expressão da proteína integrina- β 1 com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	26
Tabela 5	Associação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos) com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	27
Tabela 6	Associação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos) com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	28
Tabela 7	Associação da expressão da proteína D2-40 (área dos vasos) com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	29

Tabela 8	Associação da expressão da proteína D2-40 (área dos vasos) com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	30
Tabela 9	Associação da expressão da proteína VEGF-C com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	31
Tabela 10	Associação da expressão da proteína VEGF-C com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	32
Tabela 11	Associação da expressão da proteína VEGF-D com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	33
Tabela 12	Associação da expressão da proteína VEGF-D com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	34
Tabela 13	Associação da expressão da proteína VEGFR3 com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	35
Tabela 14	Associação da expressão da proteína VEGFR3 com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	36
Tabela 15	Associação da expressão da proteína VEGF-C nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	37

Tabela 16	Associação da expressão da proteína VEGF-D nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	37
Tabela 17	Associação da expressão da proteína VEGFR3 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	38
Tabela 18	Associação da expressão da proteína integrina- β 1 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.....	38
Tabela 19	Associação da expressão das proteínas D2-40 (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	40
Tabela 20	Associação da expressão das proteínas D2-40 (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidas por carcinoma epidermóide oral.....	41
Tabela 21	Associação da expressão da proteína D2-40 no tumor (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	41
Tabela 22	Associação da expressão das proteínas D2-40 (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	42
Tabela 23	Associação da expressão das proteínas D2-40 (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidas por carcinoma epidermóide oral.....	42

Tabela 24	Associação da expressão da proteína D2-40 no tumor (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	43
Tabela 25	Associação da expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	44
Tabela 26	Associação da expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	45
Tabela 27	Associação da expressão das proteínas VEGF-D e VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	45
Tabela 28	Associação da expressão das proteínas VEGF-D e VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	46
Tabela 29	Associação da expressão das proteínas VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral.....	46
Tabela 30	Associação da expressão das proteínas VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral.....	46
Tabela 31	Taxas de sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	47

Tabela 32	Risco relativo para sobrevida câncer específica em pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	48
Tabela 33	Risco relativo para sobrevida livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	48
Tabela 34	Taxas de sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3.....	53
Tabela 35	Risco relativo para sobrevida câncer específica em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3.....	53
Tabela 36	Risco relativo para sobrevida livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3.....	54
Tabela 37	Risco relativo para sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão da proteína D2-40.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACIS III	Automated Cellular Imaging System
CEC	Carcinoma de células escamosas ou epidermóide
DAB	Diaminobenzidina
EDTA/TRIS	Ácido acético diaminotetraetileno/ hidroximetil amino metano
FLT-4	Tirosina quinase 4 relacionada a fms, do inglês fms-related tyrosine kinase 4
FVD	Do inglês Flt-4-positive vessel density
HE	Hematoxilina e eosina
LEC	Células linfáticas endoteliais, do inglês lymphatic endothelial cells
LVD	Densidade de vasos linfáticos, do inglês lymphatic vessel density
MVD	Densidade de micro vasos, do inglês, micro vessel density
PIGF	Fator de crescimento placentário, do inglês, placenta growth factor
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês vascular endothelial growth factor
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês vascular endothelial growth factor receptor
VEGF-C	Fator de crescimento do endotélio vascular-C, do inglês vascular endothelial growth factor-C
VEGF-D	Fator de crescimento do endotélio vascular-D, do inglês vascular endothelial growth factor-D
VEGFR-3	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular-3, do inglês vascular endothelial growth factor receptor-3
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma epidermóide oral.....	1
1.2	Linfangiogênese	2
1.3	Fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>)	3
1.3.1	VEGF-C.....	5
1.3.2	VEGF-D	6
1.3.3	VEGFR3	6
1.4	D2-40.....	7
1.5	Integrina- β 1	7
1.6	Justificativa	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo Geral.....	10
2.1	Objetivos Específicos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1	Seleção das amostras e revisão.....	11
3.2	Imunoistoquímica	12
3.3	Análise estatística.....	14
4	RESULTADOS.....	16
4.1	Seleção dos pacientes	16
4.1.1	Dados clínico patológicos e demográficos.....	16
4.2	Imunoistoquímica	19
4.3	Análise estatística.....	25
4.3.1	Análise da associação da expressão das proteínas com características clínico- patológicas	25

4.3.2	Análise da associação da expressão das proteínas no tumor e no linfonodo	37
4.3.3	Análise da associação da expressão das proteínas entre si	39
4.3.4	Análise de sobrevida	47
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de coleta de dados dos pacientes

Anexo 2 Protocolo do comitê de ética

Anexo 3 Dados clinicopatológicos dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cavidade oral

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

O carcinoma de cabeça e pescoço é o quinto tumor mais comum em todo o mundo, sendo 90% das neoplasias orais correspondentes a carcinomas de células escamosas (ou carcinoma epidermóide) (HARDISSON 2003; JEMAL et al. 2006; PÉREZ-SAYÁNS et al. 2009). O carcinoma oral é o oitavo mais incidente no mundo, incluindo os tumores de lábio e de cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua oral, assoalho da boca e retromolar) (MASSANO et al. 2006). Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012 indicam a ocorrência de 14170 pacientes no Brasil sendo, 9990 pacientes homens e 4180 mulheres (Ministério da Saúde 2011). Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 novos pacientes a cada 100 mil homens e 4 novos pacientes a cada 100 mil mulheres.

Os principais tratamentos para pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são cirurgia e radioterapia (MENDENHALL et al. 2006). Apesar dos avanços, com novas técnicas cirúrgicas, quimioterapia e radioterapia, não mostraram significativamente uma melhora na sobrevida em 5 anos nas duas últimas décadas (SOTIRIOU et al. 2004), sendo que a taxa de recorrência do carcinoma oral varia de 18 a 76% nos pacientes que são submetidos ao tratamento padrão (RODRIGO et al. 2005; DE AGUIAR

et al. 2007). Muitos fatores clínicos e patológicos têm sido associados à recorrência local do carcinoma oral, tais como estadio da doença, metástases em linfonodos, invasão perineural, entre outros (MASSANO et al. 2006; DE AGUIAR et al. 2007). A disseminação metastática destes tumores usualmente ocorre via sistema linfático. A presença de metástase linfonodal é o fator prognóstico mais importante e reduz significativamente a sobrevida de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço (LEEMANS et al. 1994; DIAS et al. 2001; LIM et al. 2004; FERLITO et al. 2006; ZHANG et al. 2010).

1.2 LINFANGIOGÊNESE

A linfangiogênese é o crescimento de novos vasos linfáticos por um processo de múltiplos passos similar ao processo da angiogênese: migração de células endoteliais, proliferação e rearranjo, associado à degradação, reconstrução e produção de matriz extracelular. Contudo, o mecanismo inicial para a proliferação linfática ainda não está estabelecido (WALSH et al. 2007; ZHANG et al. 2010).

Anteriormente, muitos pesquisadores acreditavam que tumores não poderiam induzir linfangiogênese porque não havia vasos linfáticos em tumores. Nos últimos 15 anos, com a aplicação de anticorpos específicos contra as células linfáticas endoteliais (LECs, do inglês *lymphatic endothelial cells*), o conceito de linfangiogênese em tumores tem sido gradualmente investigado (ZHANG et al. 2010). A entrada de células tumorais em vasos

linfáticos é um dos primeiros passos na metástase linfática e a linfangiogênese ao redor de tumores sólidos pode promover metástase linfática, proporcionando uma rota de escape das células tumorais do sítio primário (SUGIURA et al. 2009; ZHANG et al. 2011).

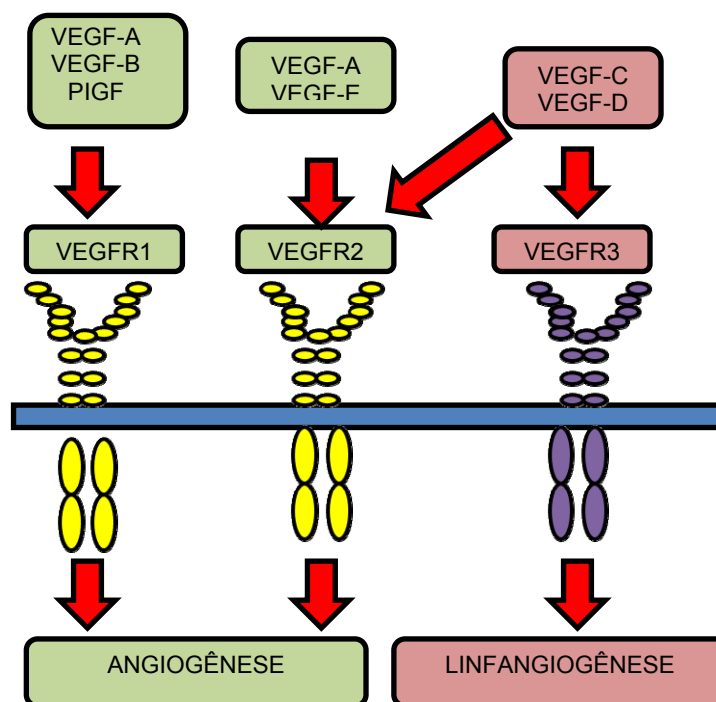
Estudos sobre linfangiogênese utilizando a técnica de imunoistoquímica foram realizados em diversos tipos de câncer, incluindo tumores de mama, pâncreas, de células renais, de fígado, de próstata e assim por diante, mas as conclusões foram controversas (ZHANG et al. 2010). Para o câncer de cabeça e pescoço a linfangiogênese foi detectada na maioria das amostras clínicas: diversos estudos demonstraram a presença de vasos linfáticos intratumorais e peritumorais heterogeneamente distribuídos nos tumores (MIYAHARA et al. 2007; ZHANG et al. 2010).

1.3 FATORES DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGFS, DO INGLÊS *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTORS*)

O mecanismo inicial de indução de linfangiogênese não está estabelecido. No entanto estudos revelam que fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs do inglês *vascular endothelial growth factor*) dentro dos tumores poderiam estimular células endoteliais a crescer e gerar novos vasos linfáticos (AL-RAWI et al. 2005; ZHANG et al. 2010). Os VEGFs e seus receptores (VEGFRs do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*) são bem conhecidos em tratamento antiangiogênicos. O VEGF faz

parte uma superfamília da qual fazem parte: VEGF-A, B, C, D e E além dos fatores de crescimento placentário (PIGFs, do inglês *placenta growth factor*). Esses fatores desempenham papel importante na angiogênese e linfangiogênese. Enquanto a angiogênese é promovida predominantemente por VEGF-A e B, VEGF-C e D têm surgido como promotores da linfangiogênese, atuando via seu receptor VEGFR-3 (também conhecido como Flt-4). Após a ativação do VEGFR3 pela ligação ao VEGF-C e VEGF-D, uma cascata de sinalização leva ao crescimento e migração das células linfáticas endoteliais, protegendo-as da apoptose (Figura 1) (DUFF et al. 2003; AL-RAWI et al. 2005; WARBURTON et al. 2007; OHNO et al. 2007; WALSH et al. 2007; KILVAER et al. 2010; ZHANG et al. 2010; TAMPOURIS et al. 2012; KARATZANIS et al. 2012).

Alguns trabalhos vêm avaliando o papel da expressão de componentes da família VEGF na progressão tumoral e metástase linfonodal em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Contudo, os resultados ainda são controversos (KISHIMOTO et al. 2003; WARBURTON et al. 2007; FAUSTINO et al. 2008; SUGIURA et al. 2009).



Fonte: (Modificado de AL-RAWI et al. 2005).

Figura 1 - Fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) e seus receptores.

1.3.1 VEGF-C

VEGF-C é fundamentalmente um fator linfangiogênico, induzindo o crescimento de vasos linfáticos em condições normais e patogênicas (ZHANG et al. 2010).

Estudos têm demonstrado que a expressão de VEGF-C em células tumorais pode induzir a linfangiogênese e promover metástases linfáticas em carcinoma epidermóide oral e tumores gastrointestinais (DUFF et al. 2003; DONG et al. 2011).

1.3.2 VEGF-D

O VEGF-D é um potente indutor da linfangiogênese na fase inicial do processo de metástase linfonodal enquanto VEGF-C é mais efetivo na fase tardia. Dessa forma, tumores que expressam as duas proteínas apresentariam uma disseminação metastática mais agressiva (SUGIURA et al. 2009; HIROTA et al. 2012).

1.3.3 VEGFR3

A proteína VEGFR-3 (também conhecida como Flt-4) é um receptor de tirosina quinase expresso predominantemente no endotélio linfático controlando o desenvolvimento e crescimento do sistema linfático (AL-RAWI et al. 2005; HIROTA et al. 2012). A expressão elevada de VEGF-C aumenta a densidade de vasos Flt-4 positivos (FVD, do inglês *Flt-4-positive vessel density*) e acelera a invasão linfática ou metástase em linfonodo em tumores experimentais e também em diversos tumores humanos (MIYAHARA et al. 2007).

Diversos estudos têm demonstrado associação da expressão de VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 com metástase em linfonodo, invasão linfática e pior prognóstico em diferentes tipos de tumores (HIROTA et al. 2012).

1.4 D2-40

Podoplanina é uma glicoproteína de membrana com 38KDa reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40, que é considerado o marcador para vasos linfáticos mais fidedigno, associado com alta especificidade e sensibilidade: é um marcador seletivo para o endotélio linfático enquanto células endoteliais dos vasos sanguíneos não são reconhecidas (OHNO et al. 2007; MIYAHARA et al. 2007; VOLKER et al. 2009; GOES et al. 2012).

Pacientes com alta densidade de vasos linfáticos (LVD, do inglês *lymphatic vessel density*) podem apresentar um risco aumentado para metástase linfonodal, corroborando a idéia de que a LVD é responsável pela predominância de disseminação linfática no carcinoma oral (SUGIURA et al. 2009; VOLKER et al. 2009; ZHANG et al. 2011; KARATZANIS et al. 2012). Biópsias pré-operatórias seguidas de coloração adicional para D2-40 podem ser importantes indicadores prognósticos para progressão da doença e podem ser cruciais para decidir as estratégias terapêuticas para pacientes com câncer de boca (MIYAHARA et al. 2007).

1.5 INTEGRINA- β 1

As integrinas fazem parte de uma família de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas expressas por diversos tipos celulares, principalmente de origem epitelial. Funcionam como importantes receptores

tanto para os componentes da matriz extracelular mediando a interação entre célula e substrato ou como moléculas de adesão de célula-célula. A expressão aberrante de integrinas tem sido implicada na invasão e metástase de carcinomas de cabeça e pescoço (CORTESINA e MARTONE 2006).

A integrina- $\beta 1$ promove fundamentalmente migração e proliferação celular, diferenciação e sobrevivência e é indispensável para o desenvolvimento e homeostase (MEVES et al. 2011).

OHARA et al. (2009) observaram uma associação significativa entre a expressão de integrinas e metástase linfonodal em amostras de carcinoma epidermóide oral: a positividade para integrinas $\alpha 3$, $\alpha 6A$ e $\beta 1$ decrescem à medida que aumenta a taxa de metástase regional e à distância. Dessa forma, a avaliação da expressão dessas integrinas poderia representar um fator útil para determinar o prognóstico e decidir a estratégia de tratamento. MEVES et al. (2011) também demonstraram que a integrina- $\beta 1$ apresenta uma expressão elevada em diversos tumores, incluindo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sendo considerada um fator importante no processo de tumorigênese e determinante essencial para células resistentes a terapia.

1.6 JUSTIFICATIVA

Levando-se em conta que a disseminação metastática dos tumores de cabeça e pescoço usualmente ocorre via sistema linfático e que estudos

sobre linfangiogênese têm sido realizados em vários tipos de câncer, mas apresentam resultados contraditórios, neste presente estudo foi investigada a expressão de marcadores de linfangiogênese em carcinoma epidermóide oral utilizando-se a técnica de imunoistoquímica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de marcadores de linfangiogênese, por imunoistoquímica, em amostras de carcinoma epidermóide oral e em linfonodos comprometidos por tumor.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 por imunoistoquímica;
- Verificar se existe associação entre a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1;
- Verificar se existe associação entre a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 nas amostras de tumor e linfonodos comprometidos por tumor;
- Verificar se existe associação entre a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 com as características clinicopatológicas dos tumores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS E REVISÃO

Foram selecionados 52 pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide oral, submetidos à cirurgia durante o período de 2000 a 2005 provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Foram selecionados também 30 linfonodos correspondentes a 21 dos pacientes, sendo que alguns pacientes possuíam mais de 01 linfonodo comprometido por tumor.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina de cada caso foram analisadas por um patologista (Silvia Vanessa Lourenço) para checagem das estruturas e seleção do material utilizado na pesquisa. Dados demográficos e clinicopatológicos de cada caso foram estudados nos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico-SAME do Hospital A.C. Camargo (Anexo 1). Foram incluídos pacientes que dispunham de material (bloco de parafina) para a realização da imunoistoquímica e pacientes que não realizaram tratamento neoadjuvante. A avaliação imunoistoquímica foi realizada em material proveniente de peças cirúrgicas e não em biópsias, avaliando a presença dos marcadores na região tumoral e peritumoral de acordo com cada anticorpo.

Após a escolha do fragmento do tumor a ser utilizado na pesquisa, os blocos de parafina foram separados e cortes histológicos desse material,

com 3µm de espessura, foram utilizados para a realização da técnica de imunohistoquímica para detecção de proteínas relacionadas ao processo de linfangiogênese.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Protocolo n ° 1548/11; Anexo 2).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas preparadas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi re-hidratado em etanol e as lâminas lavadas em água.

A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade e foi realizada por tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando-se panela de pressão, microondas ou banho maria 96 °C, de acordo com a padronização de cada anticorpo utilizado (Quadro 1). Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 minutos.

Em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Dako) por 20 minutos. As lâminas foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico (Quadro 1).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados, clonalidade, procedência e padronização

Soro primário	Clone	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
Integrina- β 1	7F10	Neomarkers	1:100	Citrato pH6,0, panela de pressão 15'	Tonsila	Membrana
VEGF-D	Policlonal	Abcam	1:300	EDTA/Tris pH9,0, panela de pressão 15'	Carcinoma de pulmão	Membrana e citoplasma
VEGF-C	Policlonal	Novus biologicals	1:400	Citrato pH6,0, panela de pressão 15'	Carcinoma de cólon	Membrana e citoplasma
VEGFR3/FLT-4	Policlonal	Neomarkers	1:1000	Citrato pH6,0, microondas 20'	Placenta	Membrana e citoplasma
D2-40 (podoplanina)	D2-40	Dako	1:200	Citrato pH6,0, banho-maria 96°C 40'	Seminoma	Membrana

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *Advance* (Dako). A revelação foi feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (*DAB*) e a contracoloração foi feita utilizando-se a hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas de um controle, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado. As reações foram analisadas em microscópio convencional e os dados estudados de forma descritiva e semiquantitativa. Na análise semiquantitativa, para as proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1, a marcação imunoistoquímica foi considerada: negativa, quando até 10% das células marcadas e positiva, quando havia marcação em mais de 10% das células. Na literatura encontramos ponto de corte variando desde 2 até 25%, então foi adotado um valor médio como ponto de corte (WARBURTON et al. 2007; HIROTA et al. 2012; CAI et al. 2012; CIANFARANI et al. 2012).

A análise do marcador D2-40 foi realizada quantitativamente, por meio do sistema automatizado de imagem celular (ACIS III, DAKO) utilizando um algoritmo para medição da densidade de microvasos MVD (do inglês, *microvessel density*). O ACIS III é um sistema composto por um microscópio digital automatizado que faz o “escaneamento” das lâminas e um computador que captura e faz o processamento das imagens. Para cada imagem digitalizada foram selecionadas manualmente 10 áreas na região peritumoral. Feita a seleção de cada área, o programa fornece uma série de valores como número de vasos, área do vaso, etc. A densidade de microvasos linfáticos foi então computada, considerando-se a média dessas 10 áreas, da seguinte maneira:

$$\text{Nº de vasos} = \frac{\text{Contagem de vasos (do inglês, } \textit{Vessels count})}{\text{Área do tecido (do inglês, } \textit{Tissue area})}$$

$$\text{Área relativa} = \frac{\text{Área dos vasos (do inglês, } \textit{Vessel area})}{\text{Área do tecido (do inglês, } \textit{Tissue area})}$$

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre a expressão das proteínas e características clínico patológicas (estadio do tumor (I/II ou III/IV), metástase em linfonodo (sim ou não), invasão vascular (sim ou não), infiltração perineural (sim ou não) e grau histológico (bem diferenciado ou moderadamente/pouco diferenciado)) e associação entre as proteínas foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, utilizando-se a correção de Yates.

A análise da relação da expressão da proteína no tumor e no linfonodo foi realizada utilizando-se o teste de McNemar e coeficiente de Spearman.

As análises de sobrevida câncer específica e livre de doença foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença entre os riscos relativos foi avaliada pelo teste de log-rank.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R versão 2.13 (R Development Core Team 2010)

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados 52 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide oral e 30 linfonodos comprometidos por tumor, correspondentes a 21 desses pacientes. Imagens representativas de alguns pacientes selecionados de carcinoma epidermóide oral podem ser observados na Figura 2.

4.1.1 Dados clínico-patológicos e demográficos

Dos pacientes de carcinoma epidermóide de cavidade oral incluídos no estudo 9 eram mulheres e 43 homens e as idades variaram entre 22 e 90 anos de idade (média das idades = 59,19 anos). O local mais frequentemente acometido foi a língua (18 pacientes) assoalho (05 pacientes) e tumores região retromolar, laringe, gengiva, palato mole, palato duro, fossa nasal, amígdala, região jugal e mandíbula (29 pacientes). O grau histológico bem diferenciado foi prevalente, ocorrendo em 29 pacientes (Tabela 1).

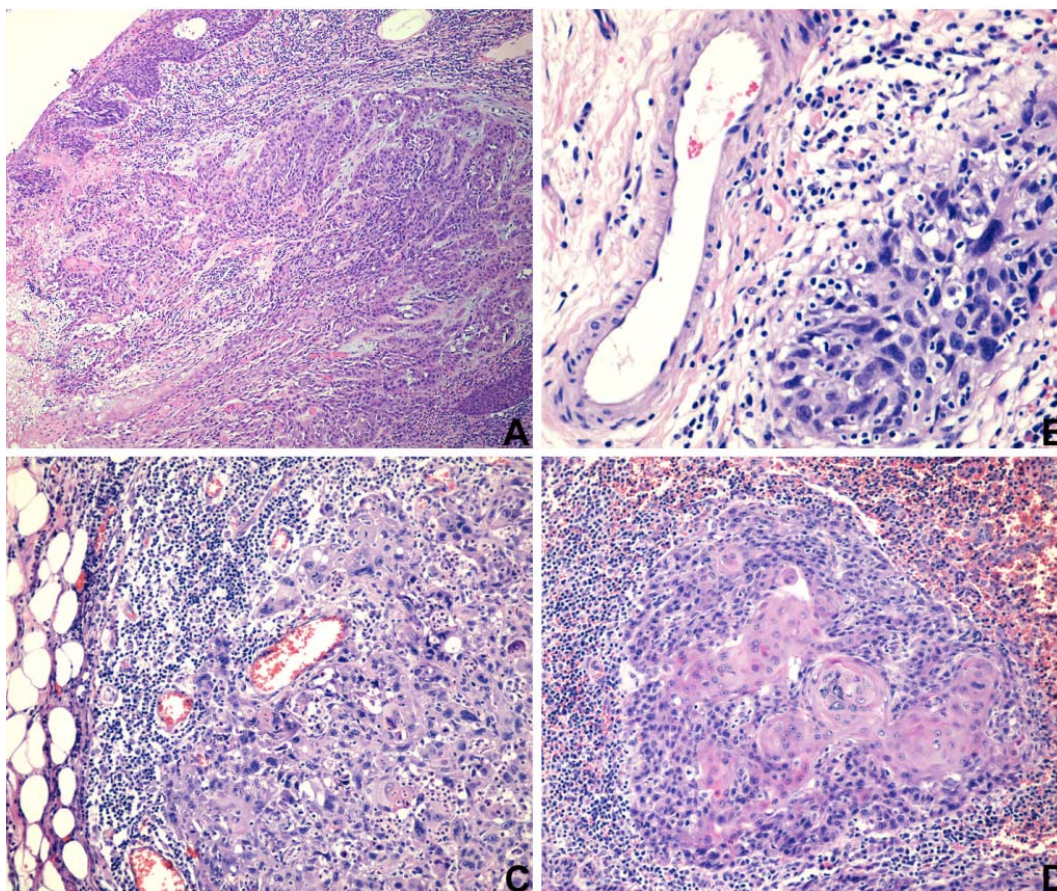


Figura 2 - Imagens representativas de algumas amostras selecionadas de carcinoma epidermóide oral corados com HE. A, carcinoma epidermóide invasivo a partir da superfície da mucosa e ocupando toda lamina própria (aumento original x100); B, ilha de carcinoma epidermóide próximo a vaso sanguíneo (aumento original x400); C, Carcinoma epidermóide infiltrando parênquima linfonodal (aumento original x200); D, infiltração do parênquima linfonodal em maior detalhe, mostrando a ilha de carcinoma epidermóide bem diferenciado (aumento original x200).

Tabela 1 - Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral

Características	Categorias	Número de pacientes (%)
Idade	<=60	29 (55,7%)
	>60	23 (44,3%)
Gênero	Feminino	09 (17,3%)
	Masculino	43 (82,7%)
Estadio clínico	I/II	22 (42,3%)
	III/IV	23 (44,2%)
	N/D*	07 (13,5%)
Estadio patológico (T)	I/II	13 (25,0%)
	III/IV	35 (67,3%)
	N/D*	04 (7,7%)
Local do tumor	Língua	18 (34,6%)
	Assoalho da boca	05 (9,6%)
	Outros	29 (55,7%)
Metástase em linfonodo	Sim	22 (42,3%)
	Não	20 (38,4%)
	N/D*	10 (19,2%)
Invasão perineural	Sim	20 (38,4%)
	Não	29 (55,7%)
	N/D*	03 (5,7%)
Invasão vascular	Sim	08 (15,3%)
	Não	41 (78,8%)
	N/D*	03 (5,7%)
Grau histológico	Bem diferenciado	29 (55,7%)
	Moderadamente diferenciado	02 (3,8%)
	Pouco diferenciado	18 (34,6%)
	N/D*	03 (5,7%)

*, N/D informação não disponível

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Foi realizada a técnica de imunoistoquímica para as proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 nos 52 pacientes de carcinoma epidermóide oral e nos 30 linfonodos comprometidos. Os resultados estão ilustrados na Figura 3 e na Tabela 2.

Tabela 2 - Imunoexpressão dos marcadores de linfangiogênese em amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor

Proteína	Pacientes	Positivo	Negativo	Total de pacientes (número)**
VEGF-C	Tumor	16 (38,8%)	32 (61,2%)	48
	Linfonodo	06 (23,0%)	14 (77,0%)	20
VEGF-D	Tumor	02 (4,0%)	50 (96,0%)	52
	Linfonodo	01 (0,3%)	20 (99,7%)	21
VEGFR3	Tumor	07 (18,8%)	40 (81,2%)	47
	Linfonodo	07 (30,7%)	10 (69,3%)	17
Integrina- β1	Tumor	45 (90,0%)	05 (10,0%)	50
	Linfonodo	13 (65,0%)	07 (35,0%)	20
D2-40*	Tumor (número de vasos)	0,000661291		52
	Linfonodo (número de vasos)	0,000519792		20
	Tumor (área dos vasos)	0,601975065		52
	Linfonodo (área dos vasos)	0,388945956		20

*, valor da média da expressão

**, o valor total de pacientes pode variar de acordo com a disponibilidade de material para a realização da técnica de imunoistoquímica

✓ **VEGF-C**

A proteína VEGF-C foi expressa em um padrão de membrana/citoplasma, com positividade bem estabelecida nos centros das ilhas tumorais. Já nas frentes de invasão ocorreu perda da expressão dessa

proteína (Figura 3). A análise semiquantitativa revelou positividade em 16 dos 48 pacientes (38,8%) e 6 dos 20 linfonodos (23,0%) e ausência de expressão em 32 dos 48 pacientes (61,2%) e 14 dos 20 linfonodos (77,0%).

✓ **VEGF-D**

A proteína VEGF-D, com padrão de membrana/citoplasma, foi predominantemente negativa nas amostras de carcinoma epidermóide oral avaliadas (Figura 3). Cinquenta tumores (96,0%) e 20 linfonodos (99,7%) não expressaram VEGF-D sendo que apenas 2 tumores (4,0%) e 1 linfonodo (0,3%) apresentaram positividade.

✓ **VEGFR3**

A proteína VEGFR3, com padrão de expressão membrana/citoplasma, foi predominantemente expressa no centro das ilhas tumorais, apresentando intensa positividade nos microvasos em áreas de infiltrado inflamatório (Figura 3). A expressão da proteína VEGFR3 foi observada em 7 tumores (18,8%) e em 7 linfonodos (30,7%) e a ausência de expressão dessa proteína foi observada 40 de 47 tumores (81,2%) e 10 de 17 linfonodos (69,3%).

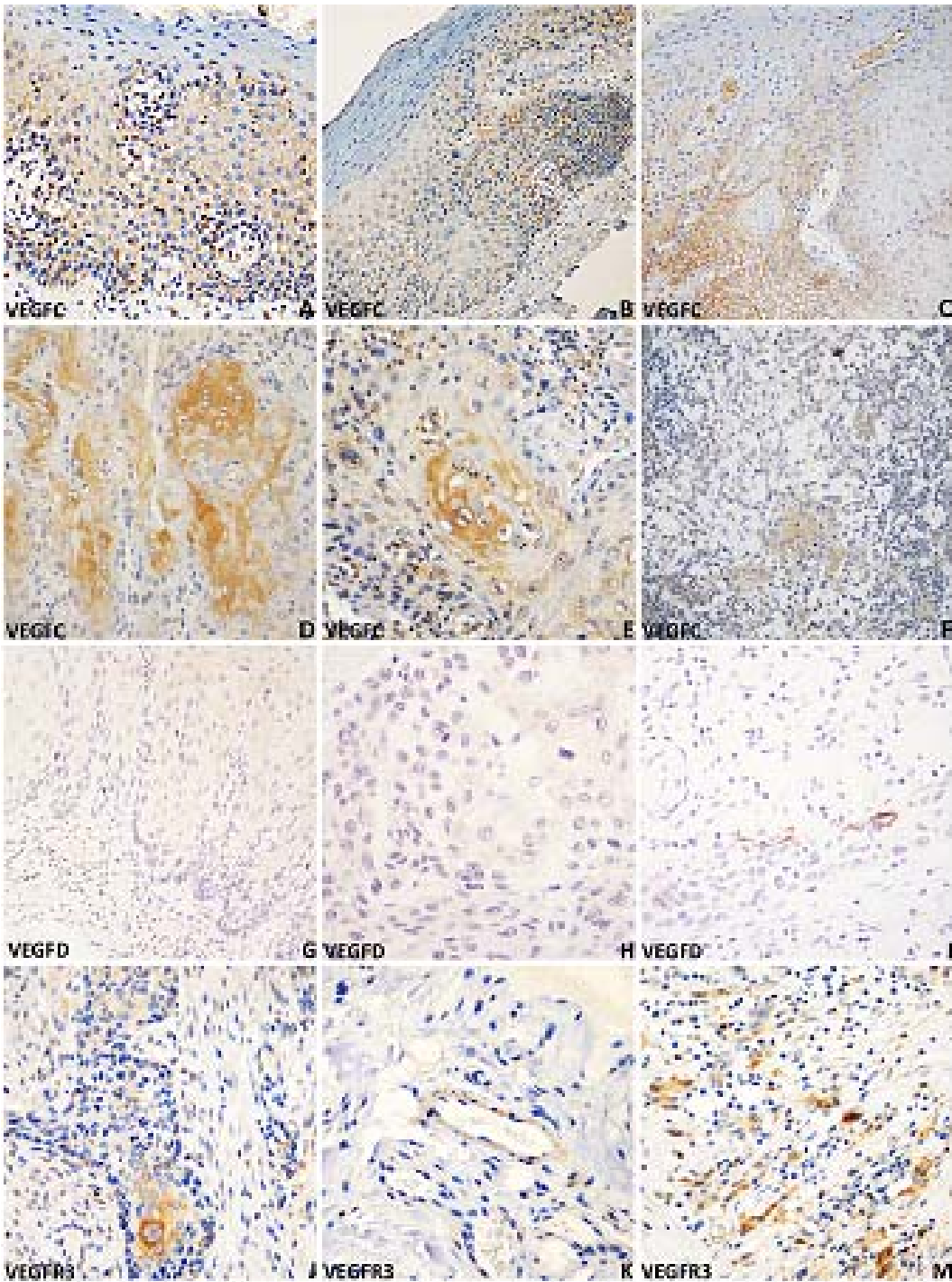


Figura 3 - Resultados representativos das reações de imunoistoquímica em amostras de carcinoma epidermóide oral.

Legenda: A, expressão de VEGF-C na mucosa oral displásica (aumento original x200); B, expressão de VEGF-C no carcinoma superficialmente invasivo (aumento original x100); C, expressão de VEGF-C observada nas ilhas de carcinoma (aumento original x200); D, expressão focal de VEGF-C nos centros das ilhas tumorais (aumento original x200); E, expressão focal de VEGF-C nos centros das ilhas tumorais em maior aumento (aumento original x400); F, fraca expressão de VEGF-C em ilhas tumorais observadas em linfonodos (aumento original x200) ;G, fraca expressão citoplasmática de VEGF-D no epitélio de revestimento da mucosa oral (aumento original x200); H, fraca expressão citoplasmática de VEGF-D em ilhas tumorais (aumento original x400); I, expressão de VEGF-D em áreas focais; raras células neoplásicas apresentam marcação citoplasmática (aumento original x400); J, expressão de VEGFR3 na porção central de ilha tumoral (aumento original x200) K, expressão de VEGFR3 em parede de vaso (aumento original x400); L, expressão de VEGFR3 em células inflamatórias (aumento original x200).

✓ **D2-40**

As lâminas coradas com o anticorpo D2-40 foram digitalizadas no equipamento ACISIII. As regiões peritumorais foram delimitadas manualmente (10 áreas por lâmina) e a contagem foi realizada utilizando-se o algoritmo *MVD*. A média do número de vasos no tumor foi de 0,000661291 e nos linfonodos foi de 0,000519792. A média da área dos vasos no tumor foi de 0,601975065 e no linfonodo foi de 0,388945956 (Figura 4).

✓ **Integrina- β 1**

A proteína integrina- β 1 foi expressa em 45 dos 50 tumores (90,0%) e 13 dos 20 linfonodos (65,0%) e negativo em 5 (10,0%) tumores e 7 linfonodos (35,0%). Foi expressa em um padrão de membrana, de maneira difusa nas ilhas de carcinoma invasivo, principalmente nas áreas menos diferenciadas do tumor. Nas ilhas tumorais bem estabelecidas a região central é negativa e a periférica positiva. As frentes de invasão tumorais são negativas para o marcador (Figura 4).

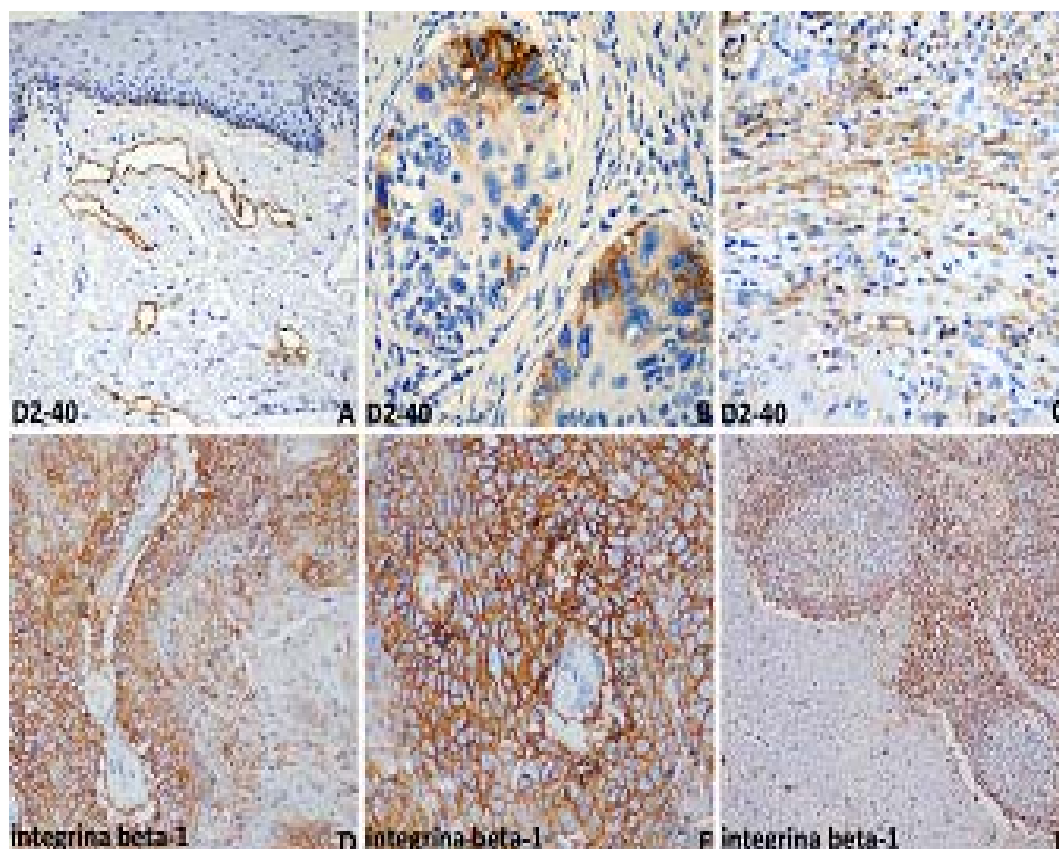


Figura 4 - Resultados representativos das reações de imunoistoquímica em amostras de carcinoma epidermóide oral.

Legenda: A, expressão de D2-40 em parede de vasos na região do estroma próximo à mucosa (aumento original x200); B, expressão de D2-40 na porção periférica de ilha tumoral (aumento original x400); C, expressão difusa de D2-40 em microvasos (aumento original x400); D, expressão de integrina- β 1 em padrão de membrana, difusa nas ilhas de carcinoma epidermóide invasivo, principalmente nas áreas menos diferenciadas do tumor (aumento original x200); E, expressão de integrina β 1 em ilha de carcinoma em maior aumento (aumento original x400); F, expressão de integrina- β 1 em infiltração neoplásica em área periférica de linfonodo (aumento original x100).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.3.1 Análise da associação da expressão das proteínas com características clínico- patológicas

Na análise de associação entre a expressão protéica e características clínico-patológicas do tumor foi observado que a expressão de integrina- β 1 está associada a tumores em estadio avançado ($p=0,04$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação da expressão da proteína integrina- β 1 com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	Integrina- β 1		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	4 (18)	18 (82)	22	0,04
	III+IV	0	22 (100)	22	
Estadio patológico	1+2	3 (23)	10 (77)	13	0,10
	3+4	1 (3)	33 (97)	34	
	assoalho	0	5 (100)	5	
Local do tumor	língua	1 (6)	17 (94)	18	0,44
	outros	4 (15)	23 (85)	50	
	bem diferenciado	2 (7)	28 (93)	30	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	3 (20)	12 (80)	15	0,35
	pouco diferenciado	0	2 (100)	47	
Invasão vascular	não	5 (13)	34 (87)	39	0,66
	sim	0	8 (100)	8	
Invasão perineural	não	5 (18)	23 (82)	28	0,14
	sim	0	19 (100)	19	
Metástase em linfonodos	não	3 (15)	17 (85)	20	0,56
	sim	1 (5)	20 (95)	21	

Considerando-se a expressão dessa proteína no linfonodo não houve associação estatisticamente significativa com nenhuma das características avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Associação da expressão da proteína integrina- β 1 com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos Comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	<i>Integrina-β1</i>			Valor de p
		Negativo	Positivo	total	
Estadio clínico	I+II	4 (50)	4 (50)	8	0,71
	III+IV	3 (30)	7 (70)	10	
Estadio patológico	1+2	1 (33)	2 (67)	3	0,61
	3+4	6 (38)	10 (62)	16	
	assoalho	0	0	0	
Local do tumor	língua	3 (38)	5 (62)	8	0,77
	outros	4 (33)	8 (67)	20	
Grau histológico	bem diferenciado	4 (36)	7 (64)	11	0,38
	moderadamente diferenciado	2 (29)	5 (71)	7	
	pouco diferenciado	1 (100)	0	19	
Invasão vascular	não	5 (36)	9 (64)	14	0,71
	sim	2 (40)	3 (60)	5	
Invasão perineural	não	4 (57)	3 (43)	7	0,36
	sim	3 (25)	9 (75)	12	
Metástase em linfonodos	não	3 (75)	1 (25)	4	0,20
	sim	4 (25)	12 (75)	16	

Também foi observada uma associação marginal entre uma maior área vascular medida pela expressão da proteína D2-40 em linfonodos comprometidos por tumor e estadio avançado do tumor ($p=0,055$). Considerando-se a proteína D2-40 (número de vasos), não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabelas 5-8).

Tabela 5 - Associação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos) com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Estadio clínico	I+II	22	0.66	0.28	0.24	0.66	1.36	0.36
	III+IV	23	0.72	0.19	0.36	0.75	1.14	
Estadio patológico	1+2	13	0.64	0.26	0.31	0.62	1.36	0.23
	3+4	35	0.70	0.23	0.24	0.75	1.14	
Invasão vascular	Não	41	0.67	0.25	0.24	0.69	1.36	0.93
	Sim	8	0.66	0.27	0.27	0.58	1.02	
Invasão perineural	Não	29	0.66	0.27	0.24	0.68	1.36	0.62
	Sim	20	0.68	0.22	0.27	0.72	1.02	
Metástase em linfonodos	Não	20	0.70	0.26	0.28	0.69	1.36	0.74
	Sim	22	0.67	0.26	0.24	0.65	1.14	
Local do tumor	Assoalho+língua	23	0.69	0.26	0.30	0.70	1.36	0.46
	Outros	29	0.64	0.24	0.24	0.61	1.14	
Grau histológico	Bem diferenciado	30	0.65	0.24	0.24	0.71	1.02	0.88
	Pouco+moderadamente	19	0.70	0.28	0.28	0.62	1.36	

Tabela 6 - Associação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos) com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Estadio clínico	I+II	8	0.462	0.163	0.263	0.444	0.796	0.408
	III+IV	10	0.565	0.170	0.328	0.571	0.787	
Estadio patológico	1+2	3	0.566	0.221	0.356	0.545	0.796	0.634
	3+4	16	0.520	0.165	0.263	0.477	0.787	
Local tumor	língua	8	0.440	0.131	0.263	0.436	0.668	0.115
	outros	12	0.573	0.173	0.356	0.575	0.796	
Grau histológico	Bem diferenciado	7	0.609	0.150	0.411	0.643	0.787	0.100
	Pouco+moderadamente	12	0.477	0.168	0.263	0.423	0.796	
Invasão vascular	não	14	0.534	0.176	0.263	0.502	0.796	0.257
	sim	5	0.449	0.143	0.343	0.410	0.700	
Invasão perineural	não	7	0.556	0.153	0.411	0.506	0.796	0.167
	sim	12	0.487	0.178	0.263	0.412	0.787	
Metástase em linfonodos	não	4	0.586	0.241	0.263	0.643	0.796	0.385
	sim	16	0.503	0.150	0.328	0.444	0.787	

Tabela 7 - Associação da expressão da proteína D2-40 (área dos vasos) com características clinicopatológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Estadio clínico	I+II	22	0.66	0.53	0.08	0.59	2.31	0.69
	III+IV	23	0.57	0.46	0.17	0.48	2.27	
Estadio patológico	1+2	13	0.72	0.63	0.14	0.64	2.31	0.85
	3+4	35	0.59	0.42	0.08	0.49	2.27	
Invasão vascular	Não	41	0.59	0.46	0.07	0.48	2.31	0.86
	Sim	08	0.70	0.68	0.10	0.50	2.27	
Invasão perineural	Não	29	0.64	0.51	0.07	0.56	2.31	0.74
	Sim	20	0.57	0.49	0.10	0.44	2.27	
Metástase em linfonodos	Não	20	0.69	0.54	0.07	0.55	2.31	0.39
	Sim	22	0.56	0.47	0.08	0.48	2.27	
Local do tumor	Assoalho+língua	23	0.74	0.60	0.13	0.60	2.31	0.11
	Outros	29	0.49	0.34	0.07	0.48	1.35	
Grau histológico	Bem diferenciado	30	0.61	0.48	0.08	0.49	2.31	0.96
	Pouco+moderadamente	19	0.63	0.53	0.07	0.55	2.27	

Tabela 8 - Associação da expressão da proteína D2-40 (área dos vasos) com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Estadio clínico	I+II	8	0.186	0.080	0.049	0.211	0.279	0.055
	III+IV	10	0.572	0.475	0.136	0.391	1.550	
Estadio patológico	1+2	3	0.178	0.118	0.049	0.207	0.279	0.303
	3+4	16	0.436	0.412	0.105	0.256	1.550	
Local tumor	língua	8	0.382	0.476	0.136	0.244	1.550	0.792
	outros	12	0.394	0.326	0.049	0.264	1.067	
Grau histológico	Bem diferenciado	7	0.539	0.358	0.159	0.487	1.067	0.120
	Pouco+moderadamente	12	0.313	0.398	0.049	0.234	1.550	
Invasão vascular	não	14	0.447	0.446	0.049	0.222	1.550	>0,990
	sim	5	0.244	0.062	0.136	0.260	0.294	
Invasão perineural	não	7	0.323	0.333	0.105	0.216	1.067	0.592
	sim	12	0.435	0.430	0.049	0.268	1.550	
Metástase em linfonodos	não	4	0.425	0.431	0.147	0.243	1.067	0.963
	sim	16	0.380	0.383	0.049	0.256	1.550	

Para as demais proteínas (VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3) não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa com as características clínico-patológicas, considerando-se a expressão tanto no tumor como no linfonodo (Tabelas 9-14).

Tabela 9 - Associação da expressão da proteína VEGF-C com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFC		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	13 (68)	6 (32)	19	0,91
	III+IV	14 (67)	7 (33)	21	
Estadio patológico	1+2	7 (58)	5 (42)	12	0,43
	3+4	22 (71)	9 (29)	31	
Local do tumor	Assoalho	3 (75)	1 (25)	4	0,85
	Língua	10 (62)	6 (38)	16	
	Outros	18 (69)	8 (31)	46	
	bem diferenciado	18 (62)	11 (38)	29	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	8 (67)	4 (33)	12	0,55
	pouco diferenciado	2 (100)	0	43	
	Invasão vascular	24 (65)	13 (35)	37	
Invasão perineural	Não	5 (83)	1 (17)	6	0,67
	Sim	19 (76)	6 (24)	25	
Metástase em linfonodos	Não	10 (56)	8 (44)	18	0,16
	Sim	11 (69)	5 (31)	16	
	Não	13 (62)	8 (38)	21	0,67
	Sim				

Tabela 10 - Associação da expressão da proteína VEGF-C com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFC		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	6 (86)	1 (14)	7	0,71
	III+IV	8 (67)	4 (33)	12	
Estadio patológico	1+2	2 (100)	0	2	0,87
	3+4	12 (67)	6 (33)	18	
Local do tumor	Assoalho	0	0	0	0,74
	Língua	7 (78)	2 (22)	9	
	Outros	8 (62)	5 (38)	22	
	bem diferenciado	8 (80)	2 (20)	10	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	6 (60)	4 (40)	10	0,22
	pouco diferenciado	0	1 (100)	21	
Invasão vascular	Não	12 (80)	3 (20)	15	0,40
	Sim	3 (50)	3 (50)	6	
Invasão perineural	Não	8 (89)	1 (11)	9	0,30
	Sim	7 (58)	5 (42)	12	
Metástase em linfonodos	Não	4 (100)	0	4	0,33
	Sim	10 (59)	7 (41)	17	

Tabela 11 - Associação da expressão da proteína VEGF-D com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFD		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	21 (95)	1 (5)	22	0,49
	III+IV	22 (96)	1 (4)	23	
Estadio patológico	1+2	13 (100)	0	13	0,93
	3+4	32 (94)	2 (6)	34	
	assoalho	5 (100)	0	5	
Local do tumor	língua	17 (94)	1 (6)	18	0,84
	outros	27 (96)	1 (4)	51	
	bem diferenciado	28 (97)	1 (3)	29	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	16 (94)	1 (6)	17	0,88
	pouco diferenciado	2 (100)	0	48	
	Invasão vascular	40 (100)	0	40	
Invasão perineural	não	7 (88)	1 (12)	8	0,37
	sim	28 (100)	0	28	
Metástase em linfonodos	não	19 (95)	1 (5)	20	0,86
	sim	20 (100)	0	20	
	não	21 (95)	1 (5)	22	0,96
	sim				

Tabela 12 - Associação da expressão da proteína VEGF-D com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFD		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	8 (100)	0	8	NA*
	III+IV	11 (100)	0	11	
Estadio patológico	1+2	3 (100)	0	3	NA
	3+4	17 (100)	0	17	
	assoalho	0	0	0	
Local do tumor	língua	8 (100)	0	8	0,80
	outros	12 (92)	1 (8)	21	
	bem diferenciado	10 (91)	1 (9)	11	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	8 (100)	0	8	0,65
	pouco diferenciado	1 (100)	0	20	
Invasão vascular	não	15 (100)	0	15	0,55
	sim	4 (80)	1 (20)	5	
Invasão perineural	não	8 (100)	0	8	0,83
	sim	11 (92)	1 (8)	12	
Metástase em linfonodos	não	4 (100)	0	4	0,42
	sim	16 (94)	1 (6)	17	

*, N/A não avaliável

Tabela 13 - Associação da expressão da proteína VEGFR3 com características clínico-patológicas em amostras de carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFR3		total	P
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	18 (90)	2 (10)	20	0,95
	III+IV	18 (86)	3 (14)	21	
Estadio patológico	1+2	10 (83)	2 (17)	12	0,97
	3+4	26 (84)	5 (16)	31	
	assoalho	4 (80)	1 (20)	5	
Local do tumor	língua	14 (88)	2 (12)	16	0,91
	outros	21 (84)	4 (16)	46	
	bem diferenciado	21 (78)	6 (22)	27	
Grau histológico	moderadamente diferenciado	14 (93)	1 (7)	15	0,38
	pouco diferenciado	1 (100)	0	43	
	Invasão vascular	29 (83)	6 (17)	35	
Invasão perineural	não	8 (100)	0	8	0,49
	sim	21 (91)	2 (9)	23	
Metástase em linfonodos	sim	16 (80)	4 (20)	20	0,53
	não	13 (81)	3 (19)	16	
	sim	18 (82)	4 (18)	22	

Tabela 14 - Associação da expressão da proteína VEGFR3 com características clínico-patológicas em amostras de linfonodos comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Variável	categoria	VEGFR3		total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Estadio clínico	I+II	3 (43)	4 (57)	7	0,46
	III+IV	6 (75)	2 (25)	8	
Estadio patológico	1+2	1 (33)	2 (67)	3	0,62
	3+4	9 (69)	4 (31)	13	
Local do tumor	assoalho	0	0	0	0,12
	língua	5 (100)	0	5	
	outros	6 (46)	7 (54)	18	
Grau histológico	bem diferenciado	4 (50)	4 (50)	8	0,84
	moderadamente diferenciado	6 (67)	3 (33)	9	
	pouco diferenciado	0	0	17	
Invasão vascular	não	9 (60)	6 (40)	15	0,62
	sim	1 (50)	1 (50)	2	
Invasão perineural	não	6 (67)	3 (33)	9	0,84
	sim	4 (50)	4 (50)	8	
Metástase em linfonodos	não	3 (75)	1 (25)	4	0,86
	sim	7 (54)	6 (46)	13	

4.3.2 Análise da associação da expressão das proteínas no tumor e no linfonodo

Na análise de associação da expressão das proteínas no tumor e no linfonodo não foi observada nenhuma relação estatisticamente significativa para todas as proteínas avaliadas (Tabelas 15-18 e Figura 5).

Tabela 15 - Associação da expressão da proteína VEGF-C nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor

VEGF-C	VEGF-C linfonodo		Total	Valor de p
	Negativo	Positivo		
Negativo	11 (78.6)	3 (21.4)	14	0,99
Positivo	3 (50)	3 (50)	6	
Total	14	6	20	

Tabela 16 - Associação da expressão da proteína VEGF-D nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor

VEGF-D	VEGF-D linfonodo		Total	Valor de p
	Negativo	Positivo		
Negativo	20 (95.2)	1 (4.8)	21	0,99
Positivo	0	0	0	
Total	20	1	21	

Tabela 17 - Associação da expressão da proteína VEGFR3 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor

VEGFR3	VEGFR3 linfonodo		Total	Valor de p
	Negativo	Positivo		
Negativo	8 (61.5)	5 (38.5)	13	0,221
Positivo	1 (33.3)	2 (66.7)	3	
Total	9	7	16	

Tabela 18 - Associação da expressão da proteína integrina- β 1 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor

Integrina- β 1	Integrina- β 1 linfonodo		Total	Valor de p
	Negativo	Positivo		
Negativo	1 (50)	1 (50)	2	0,131
Positivo	6 (35.3)	11 (64.7)	17	
Total	7	12	19	

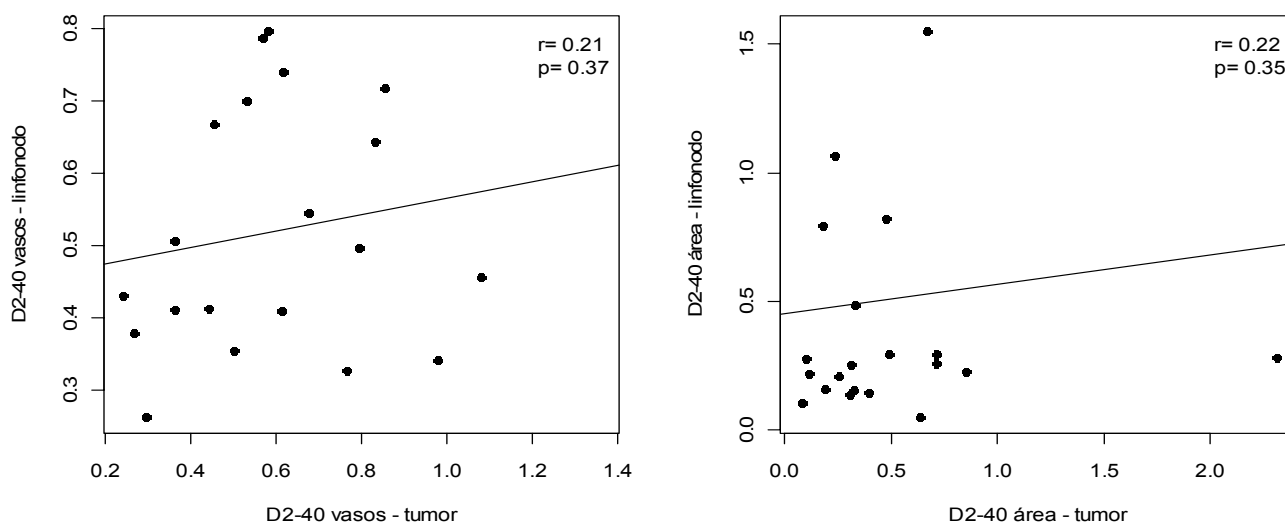


Figura 5 - Análise da correlação da expressão da proteína D2-40 (número de vasos e área dos vasos) em amostras de carcinoma epidermóide oral e linfonodos comprometidos por tumor.

4.3.3 Análise da associação da expressão das proteínas entre si

Na análise de associação da expressão das proteínas entre si, foi observada que expressão de integrina- β 1 no tumor está associada à expressão da proteína D2-40 (área dos vasos) no tumor ($p=0,04$). Também foi observada associação entre a proteína D2-40 (maior número de vasos) no tumor e ausência de expressão de VEGFR3 no linfonodo ($p=0,01$) (Tabelas 19-24).

Tabela 19 - Associação da expressão das proteínas D2-40 (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral

Marcador	Categoria	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina-β1	Negativo	05	0.28	0.27	0.07	0.25	0.74	0.04
	Positivo	45	0.63	0.50	0.08	0.51	2.31	
VEGFR3	Negativo	39	0.57	0.52	0.07	0.39	2.31	0.28
	Positivo	07	0.68	0.39	0.17	0.64	1.28	
VEGFD	Negativo	49	0.57	0.43	0.07	0.48	2.31	0.40
	Positivo	02	1.32	1.34	0.38	1.32	2.27	
VEGFC	Negativo	31	0.50	0.31	0.07	0.48	1.35	0.75
	Positivo	15	0.58	0.59	0.10	0.41	2.31	

Tabela 20 - Associação da expressão das proteínas D2-40 (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidas por carcinoma epidermóide oral

Marcador	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina-β1	Negativo	7	0.312	0.339	0.105	0.207	1.067	0.241
	Positivo	13	0.430	0.409	0.049	0.275	1.550	
VEGFR3	Negativo	9	0.534	0.498	0.147	0.279	1.550	0.252
	Positivo	7	0.304	0.257	0.049	0.216	0.793	
VEGF-D	Negativo	19	0.395	0.391	0.049	0.253	1.550	0.900
	Positivo	1	0.275	NA	0.275	0.275	0.275	
VEGF-C	Negativo	13	0.387	0.432	0.105	0.229	1.550	0.127
	Positivo	6	0.449	0.279	0.216	0.295	0.821	

Tabela 21 - Associação da expressão da proteína D2-40 no tumor (área dos vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Marcador	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina-β1	Negativo	07	0.37	0.25	0.08	0.30	0.85	0.64
	Positivo	13	0.54	0.58	0.10	0.33	2.31	
VEGFR3	Negativo	11	0.72	0.59	0.19	0.67	2.31	0.01
	Positivo	07	0.24	0.20	0.08	0.17	0.64	
VEGFD	Negativo	20	0.52	0.48	0.08	0.36	2.31	0.19
	Positivo	01	0.10	NA	0.10	0.10	0.10	
VEGFC	Negativo	15	0.58	0.55	0.08	0.33	2.31	0.68
	Positivo	07	0.62	0.76	0.10	0.48	2.27	

Tabela 22 - Associação da expressão das proteínas D2-40 (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral

Marcador	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina- β 1	Negativo	5	0.50	0.16	0.28	0.58	0.64	0.13
	Positivo	45	0.67	0.25	0.24	0.69	1.36	
	Positivo	44	0.66	0.26	0.24	0.69	1.36	
VEGFR3	Negativo	39	0.65	0.27	0.24	0.64	1.36	0.42
	Positivo	7	0.72	0.18	0.46	0.75	0.94	
VEGFD	Negativo	49	0.67	0.25	0.24	0.68	1.36	0.94
	Positivo	2	0.65	0.15	0.54	0.65	0.76	
VEGFC	Negativo	31	0.64	0.25	0.24	0.61	1.14	0.93
	Positivo	15	0.63	0.20	0.27	0.68	0.86	

Tabela 23 - Associação da expressão das proteínas D2-40 (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidas por carcinoma epidermóide oral

Marcador no linfonodo	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina- β 1	Negativo	7	0.543	0.201	0.263	0.457	0.796	0.536
	Positivo	13	0.507	0.154	0.328	0.498	0.787	
VEGFR3	Negativo	9	0.523	0.160	0.263	0.498	0.741	0.837
	Positivo	7	0.557	0.186	0.356	0.506	0.796	
VEGFD	Negativo	19	0.527	0.169	0.263	0.498	0.796	0.500
	Positivo	1	0.379	NA	0.379	0.379	0.379	
VEGFC	Negativo	13	0.494	0.176	0.263	0.431	0.796	0.282
	Positivo	6	0.602	0.133	0.379	0.655	0.717	

Tabela 24 - Associação da expressão da proteína D2-40 no tumor (número de vasos) e VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Marcador	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Integrina-β1	Negativo	07	0.54	0.28	0.24	0.53	1.08	0.44
	Positivo	13	0.62	0.22	0.27	0.61	0.98	
VEGFR3	Negativo	11	0.69	0.27	0.30	0.68	1.14	0.09
	Positivo	07	0.48	0.21	0.24	0.50	0.83	
VEGFD	Negativo	20	0.63	0.25	0.24	0.60	1.14	0.19
	Positivo	01	0.27	NA	0.27	0.27	0.27	
VEGFC	Negativo	15	0.66	0.27	0.24	0.62	1.14	0.41
	Positivo	07	0.55	0.22	0.27	0.53	0.86	

Para as demais proteínas não foi observada nenhuma associação, considerando-se tanto a expressão das proteínas nos tumores quanto a expressão nos linfonodos (Tabelas 25-30).

Tabela 25 - Associação da expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VEGFC		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	4 (80.)	1 (20.)	5	0,955
Positivo	27 (67.5)	13 (32.5)	40	
Total	31	14	45	

VEGFR3	VEGF-C		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	24 (70.6)	10 (29.4)	34	0,095
Positivo	2 (28.6)	5 (71.4)	7	
Total	26	15	41	

VEGF-D	VEGF-C		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	30 (68.2)	14 (31.8)	44	0,721
Positivo	0	1 (100)	1	
Total	30	15	45	

Tabela 26 - Associação da expressão das proteínas VEGF-C e VEGF-D, VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VEGF-C		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	6 (85.7)	1 (14.3)	7	0,467
Positivo	7 (58.3)	5 (41.7)	12	
Total	13	6	19	

VERFR3	VEGF-C		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	9 (81.8)	2 (18.2)	11	0,413
Positivo	3 (50.)	3 (50.)	6	
Total	12	5	17	

VEGF-D	VEGF-C		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	14 (73.7)	5 (26.3)	19	0,654
Positivo	0	1 (100)	1	
Total	14	6	20	

Tabela 27 - Associação da expressão das proteínas VEGF-D e VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VEGFD		total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	5 (100)	0	5	0,480
Positivo	42 (95.5)	2 (4.5)	44	
total	47	2	49	

VERFR3	VEGFD		total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	37 (94.9)	2 (5.1)	39	0,694
Positivo	7 (100)	0	7	
total	44	2	46	

Tabela 28 - Associação da expressão das proteínas VEGF-D e VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VEGF-D		Total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	7 (100)	0	7	0,747
Positivo	12 (92.3)	1 (7.7)	13	
Total	19	1	20	

VERFR3	VEGF-D		total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	10 (100)	0	10	0,853
Positivo	6 (85.7)	1 (14.3)	7	
Total	16	1	17	

Tabela 29 - Associação da expressão das proteínas VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VERFR3		total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	5 (100)	0	5	0,716
Positivo	33 (82.5)	7 (17.5)	40	
total	38	7	45	

Tabela 30 - Associação da expressão das proteínas VEGFR3 e integrina- β 1 em amostras de linfonodo comprometidos por carcinoma epidermóide oral

Integrina- β 1	VERFR3		total	p
	Negativo	Positivo		
Negativo	3 (60.)	2 (40.)	5	0,734
Positivo	6 (54.5)	5 (45.5)	11	
total	9	7	16	

4.3.4 Análise de sobrevida

Considerando-se as variáveis clínico-patológicas, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida câncer específica em 5 anos: os pacientes com doença em estadio inicial (clínico e patológico) e com tumores sem invasão perineural apresentaram sobrevida maior ($p=0,003$, $p=0,043$ e $p=0,024$, respectivamente). Pacientes com tumores localizados no assoalho da boca também apresentaram uma sobrevida livre de doença menor quando comparados a pacientes com tumores localizados em outras regiões da cavidade oral ($p=0,051$). Esses dados podem ser observados nas Tabelas 31-34 e nas Figuras 6-9.

Tabela 31 - Taxas de sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	N	SCE(5anos)*	N	SLR(5anos)*
Estadio clínico	I+II	21	85%	21	95%
	III+IV	23	33%	23	68%
Estadio patológico	1+2	13	83%	13	92%
	3+4	34	45%	34	81%
Local do tumor	Assoalho	4	50%	4	75%
	Língua	18	56%	18	85%
	Outros	29	49%	29	87%
	Bem diferenciado	30	56%	30	91%
Grau histológico	Moderadamente diferenciado	16	40%	16	69%
	Pouco diferenciado	2	0%	2	100%
Invasão vascular	Não	40	54%	40	86%
	Sim	8	29%	8	75%
Invasão perineural	Não	28	65%	28	86%
	Sim	20	29%	20	80%
Metástase em linfonodos	Não	19	59%	19	78%
	Sim	22	42%	22	87%

*SCE, sobrevida câncer específica; SLR, sobrevida livre de recidiva

Tabela 32 - Risco relativo para sobrevida câncer específica em pacientes com carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	N	Risco Relativo	IC(95%)		Valor de p
Estadio clínico	I+II	21	1			0,003
	III+IV	23	4.22	1.52	11.71	
Estadio patológico	1+2	13	1			0,043
	3+4	34	3.29	0.97	11.14	
Local do tumor	Assoalho	4	1			0,584
	Língua	18	0.82	0.17	3.93	
	Outros	29	1.29	0.30	5.63	
Grau histológico	Bem diferenciado	30	1			0,356
	Moderadamente diferenciado	16	1.63	0.72	3.67	
	Pouco diferenciado	2	2.78	0.35	21.82	
Invasão vascular	Não	40	1			0,673
	Sim	8	1.24	0.46	3.30	
Invasão perineural	Não	28	1			0,024
	Sim	20	2.43	1.10	5.40	
Metástase em linfonodos	Não	19	1			0,360
	Sim	22	1.50	0.63	3.60	

Tabela 33 - Risco relativo para sobrevida livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral

Variável	Categoria	N	Risco Relativo	IC(95%)		Valor de p
Estadio clínico	I+II	21	1			0,169
	III+IV	23	3.18	0.56	17.98	
Estadio patológico	1+2	13	1			0,787
	3+4	34	0.81	0.18	3.69	
Local do tumor	Assoalho	4	1			0,051
	Língua	18	0.24	0.04	1.51	
	Outros	29	0.12	0.02	0.87	
Grau histológico	Bem diferenciado	30	1			0,512
	Moderadamente diferenciado	16	2.40	0.48	11.98	
	Pouco diferenciado	2	0.00	0.00	Inf	
Invasão vascular	Não	40	1			0,683
	Sim	8	0.63	0.07	5.79	
Invasão perineural	Não	28	1			0,672
	Sim	20	0.70	0.13	3.71	
Metástase em linfonodos	Não	19	1			0,454
	Sim	22	0.51	0.08	3.08	

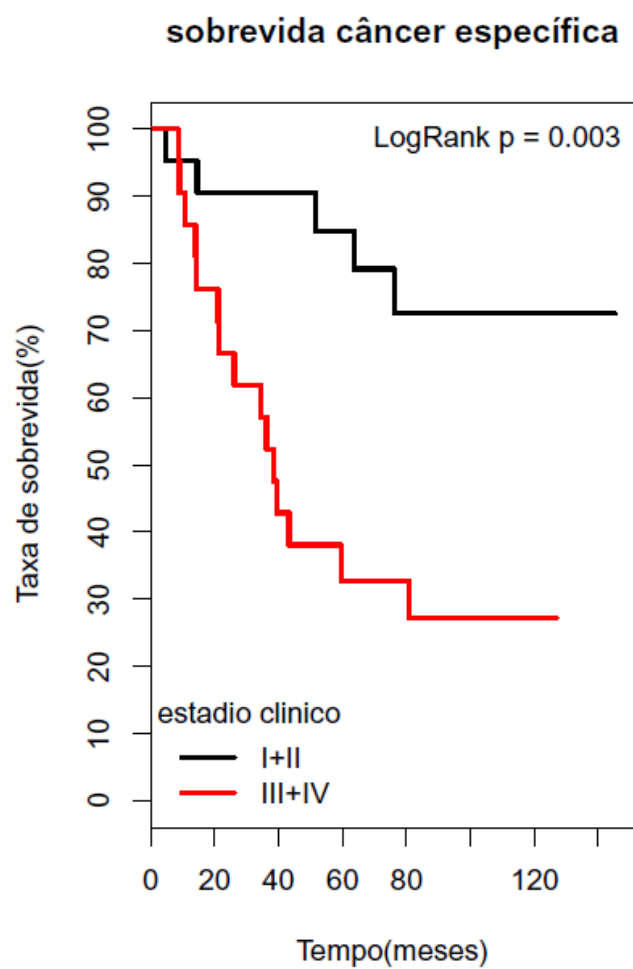


Figura 6 - Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o estadiamento clínico.

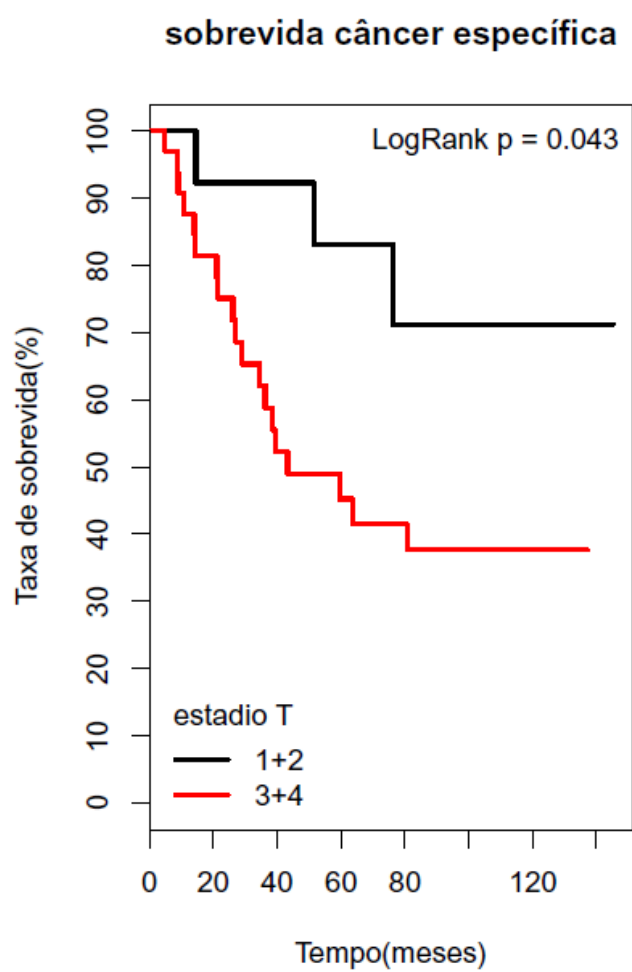


Figura 7 - Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o estadiamento patológico.

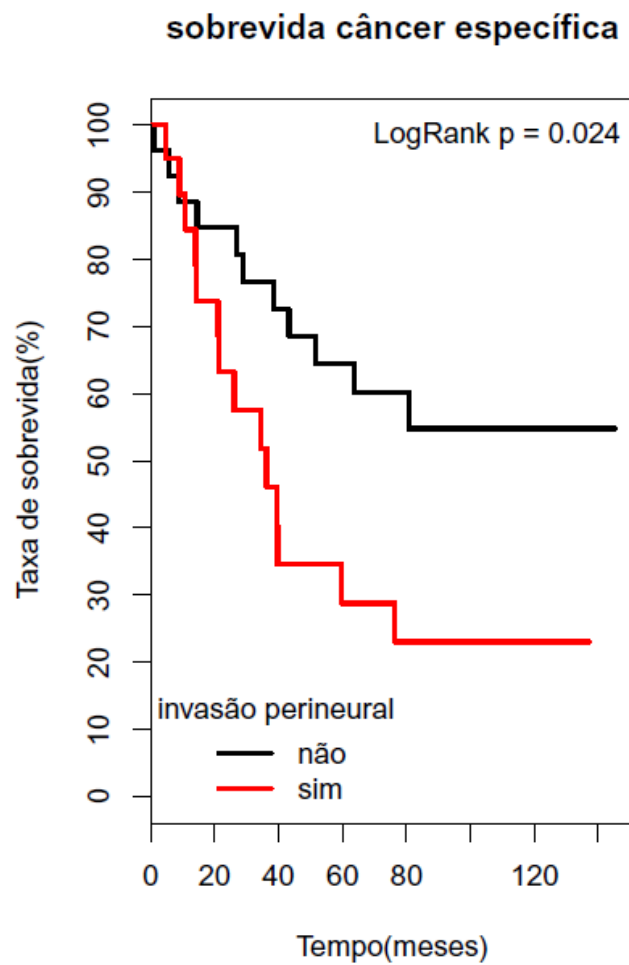


Figura 8 - Sobrevida câncer específica para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se a presença/ausência de invasão perineural.

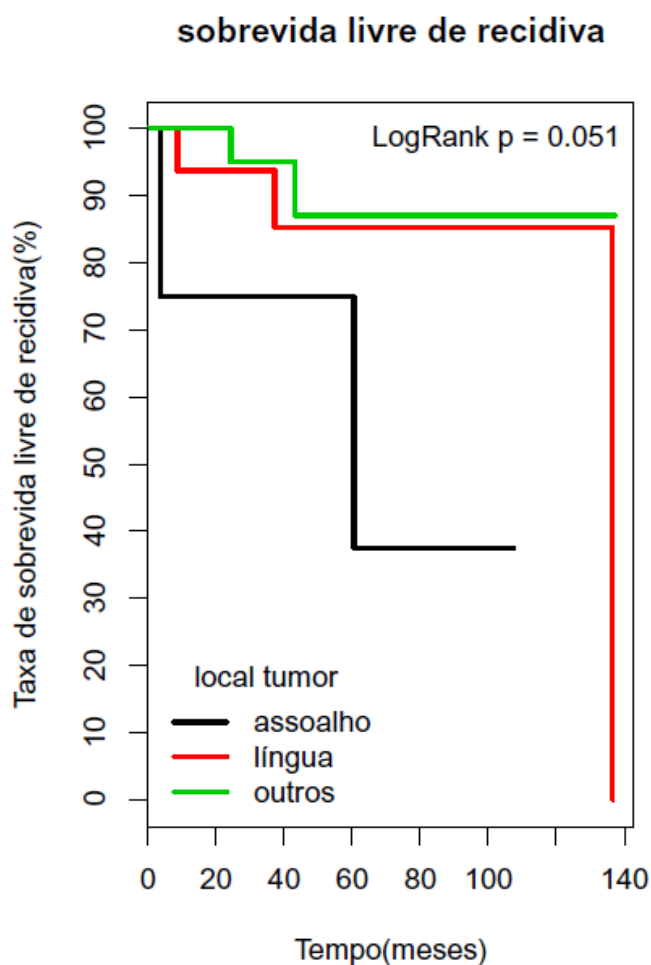


Figura 9 - Sobrevida livre de recidiva para pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral, considerando-se o local do tumor.

Considerando-se a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1, não foi observada nenhuma diferença nas taxas de sobrevidas câncer específica e livre de recidiva entre os pacientes que expressaram ou não essas proteínas. Esses dados podem ser observados nas Tabelas 34-37.

Tabela 34 - Taxas de sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3

Proteína	Categoria	n	SCE(5anos)*	n	SLR(5anos)*
Integrina-β1	Negativo	5	80%	5	100%
	Positivo	44	52%	44	87%
VEGFR3	Negativo	38	53%	38	86%
	Positivo	7	57%	7	100%
VEGF-D-	Negativo	48	53%	48	85%
	Positivo	2	50%	2	100%
VEGF-C	Negativo	31	55%	31	85%
	Positivo	15	57%	15	91%

*SCE, sobrevida câncer específica; SLR, sobrevida livre de recidiva

Tabela 35 - Risco relativo para sobrevida câncer específica em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3

Proteína	Categoria	n	Risco Relativo	IC(95%)	Valor de p
Integrina-β1	Negativo	5	1		0,329
	Positivo	44	2.62	0.35 19.42	
VEGFR3	Negativo	38	1		0,737
	Positivo	7	1.20	0.41 3.58	
VEGF-D	Negativo	48	1		0,868
	Positivo	2	0.84	0.11 6.26	
VEGF-C	Negativo	31	1		0,982
	Positivo	15	1.01	0.41 2.50	

Tabela 36 - Risco relativo para sobrevida livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão das proteínas integrina- β 1, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3

Proteína	Categoria	n	Risco Relativo	IC(95%)		Valor de p
Integrina-β1	Negativo	5	1	0.00	infinito	0,425
	Positivo	44	80181330.00			
VEGFR3	Negativo	38	1	0.07	6.41	0,736
	Positivo	7	0.68			
VEGF-D	Negativo	48	1	0.00	infinito	0,590
	Positivo	2	0.00			
VEGF-C	Negativo	31	1	0.05	4.21	0,490
	Positivo	15	0.47			

Tabela 37 - Risco relativo para sobrevidas câncer específica e livre de recidiva em pacientes com carcinoma epidermóide oral, considerando-se a expressão da proteína D2-40

	Marcador	n	Risco Relativo	IC(95%)		Valor de p
SCE	D2-40 área	51	0.963	0.436	2.127	0.926
	D2-40 vasos	51	0.922	0.178	4.766	0.923
SLR	D2-40 área	51	0.823	0.147	4.617	0.820
	D2-40 vasos	51	7.099	0.213	236.253	0.267

*SCE, sobrevida câncer específica; SLR, sobrevida livre de recidiva

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de marcadores de linfangiogênese utilizando-se da técnica de imunoistoquímica em pacientes portadores de carcinoma epidermóide (CEC) de cavidade oral.

A disseminação metastática do CEC de cavidade oral usualmente ocorre via sistema linfático, sendo a presença de metástase linfonodal o fator prognóstico mais importante e que reduz significativamente a sobrevida de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço (LEEMANS et al. 1994; DIAS et al. 2001; LIM et al. 2004; FERLITO et al. 2006; ZHANG et al. 2010).

A linfangiogênese é o crescimento de novos vasos linfáticos por um processo de múltiplos passos similar ao processo da angiogênese: migração de células endoteliais, proliferação e rearranjo, associado à degradação, reconstrução e produção de matriz extracelular. Ocorre, com exceção da fase embrionária, em processos de cicatrização, inflamação e neoplasias, desempenhando um papel significativo na progressão do tumor, metástase e disseminação de células cancerígenas, sendo apontada como um potencial parâmetro para diagnóstico em tumores de cabeça e pescoço (WALSH et al. 2007; ZHANG et al. 2010; KUMAR et al. 2011; HIROTA et al. 2012; KARATZANIS et al. 2012).

O mecanismo inicial de indução de linfangiogênese não está estabelecido. No entanto estudos revelam que fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs, do inglês *vascular endothelial growth factor*)

dentro dos tumores poderiam estimular células endoteliais a crescer e gerar novos vasos linfáticos (AL-RAWI et al. 2005; ZHANG et al. 2010).

A proteína VEGF-C apresenta uma função fundamental no processo de linfangiogênese, sendo que diversos estudos têm demonstrado uma associação entre a expressão de VEGF-C e metástase linfonodal em CEC da cavidade oral (KUMAR et al. 2011). Neste mesmo estudo foi demonstrada expressão elevada de VEGF-C (RNA mensageiro e proteína) em CEC de cavidade oral, sendo a expressão de VEGF-C associada com o crescimento do número de vasos linfáticos e invasão linfática.

MATSUURA et al. (2009), utilizaram diferentes técnicas em diversos tipos tumorais, avaliaram a expressão de marcadores de linfangiogênese e demonstraram uma associação entre VEGF-C e FLT-4 (VEGFR3) que ajudaria no desenvolvimento da neovascularização contribuindo para a progressão tumoral.

Nosso estudo demonstrou positividade para VEGF-C em cerca de um terço dos pacientes avaliados. Contudo, não houve associação da expressão de VEGF-C com nenhuma característica clínico-patológica.

A proteína VEGF-D foi pouco expressa nas amostras de CEC de cavidade oral avaliadas neste estudo. BECKER (2010) também não obteve positividade para o marcador VEGF-D em CEC de cavidade oral. Já KARATZANIS et al. (2012) observaram uma positividade do marcador em metástase linfonodal para pacientes portadores de CEC de cavidade oral. Contudo, VEGF-C demonstrou-se mais significativamente associado à ocorrência de metástase linfonodal.

HIROTA et al. (2012) observaram uma positividade para o marcador

VEGF-D em amostras de CEC de língua associada com a expressão de VEGF-C. O aumento dessas duas proteínas estava associado a uma maior contagem de vasos linfáticos e também a uma menor sobrevida livre de recorrência, sugerindo que a avaliação da expressão da linfangiogênese em CEC língua possa ajudar na previsão de que pacientes terão metástase linfonodal. Apontam ainda uma potencial aplicação terapêutica com o bloqueio dos fatores linfangiogênicos VEGF-C e D, que poderia ser útil na supressão da disseminação linfática do CEC de língua.

Os fatores VEGF-C e VEGF-D estimulam a linfangiogênese pela ativação do seu receptor VEGFR3. Diversos estudos têm demonstrado associação da expressão de VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 com metástase em linfonodo, invasão linfática e pior prognóstico em diferentes tipos de tumores (HIROTA et al. 2012).

A ativação do complexo VEGF-C/VEGFR3 pode participar da progressão tumoral regulando diferentes funções como invasão e proliferação celular. Essa regulação diferencial depende de diferentes vias de sinalização intracelular estimuladas pelo complexo VEGF-C/VEGFR3 (SU et al. 2006, 2007). Estudos também têm sugerido que VEGF-C também possa estimular a angiogênese em adição à linfangiogênese, sendo capaz de ativar o receptor VEGFR2, quando a proteína sofre maturação completa (KUMAR et al. 2011).

Nosso estudo demonstrou expressão de VEGFR3 em cerca de 20% dos tumores avaliados. Contudo, não houve associação da expressão de VEGFR3 com nenhuma característica clínico-patológica.

A pouca expressão das moléculas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3

descrita neste estudo, aliada ao fato de não haver nenhuma associação dessas moléculas com características clínico-patológicas, está em desacordo com o demonstrado em alguns outros estudos em cabeça e pescoço. Esses resultados controversos podem ser devidos à utilização de diferentes métodos de avaliação (manual ou automatizado) e também podem refletir a subjetividade da avaliação manual. As proteínas VEGF-C e VEGFR3 apresentaram um padrão de expressão diferenciado, com a marcação positiva nos centros das ilhas tumorais e negativo nas frentes de invasão e o VEGFR3 quando negativo no tumor apresentou positividade nos vasos na área peritumoral. Dessa forma, a avaliação do padrão de expressão nas diferentes áreas do tumor, possa revelar associação com as características do tumor.

Alguns estudos também têm sugerido a ativação da linfangiogênese independentemente da via VEGF-C/D e VEGFR3, através de estimulação pelos fatores IGF1 e IGF2, o que induziria a proliferação e migração de células endoteliais linfáticas (BJÖRND AHL et al. 2005). Outra via que também tem sido apontada como relacionada à linfangiogênese é a da angiopoietina: estudos em camundongos têm demonstrado que a angiopoietina-1 seria capaz de induzir a expressão de VEGFR3, tornando as células mais responsivas ao VEGF-C e VEGF-D (KARATZANIS et al. 2012). Em carcinoma epidermóide oral foi demonstrado o aumento da expressão de angiopoietina-1 e angiopoietina-2 associado a um pior prognóstico (CHIEN et al. 2008).

A podoplanina é uma glicoproteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40, que é considerado o marcador para vasos linfáticos mais

fidedigno, associado com alta especificidade e sensibilidade: é um marcador seletivo para o endotélio linfático enquanto células endoteliais dos vasos sanguíneos não são reconhecidas (OHNO et al. 2007; MIYAHARA et al. 2007; ZHAO et al. 2008; VOLKER et al. 2009; FUNAYAMA et al. 2011; GOES et al. 2012; KARATZANIS et al. 2012).

ZHAO et al. (2008) avaliaram a expressão do marcador D2-40 em CEC de cavidade oral e demonstraram uma proliferação de vasos linfáticos intratumorais e peritumorais e sugerem que a disseminação de células metastáticas também possa ocorrer via vasos intratumorais. JIN et al. (2012) discutiram que a região intratumoral não contém vasos linfáticos funcionais e que os vasos linfáticos na margem do tumor facilitariam a disseminação das células tumorais.

Neste estudo, na avaliação da marcação do anticorpo D2-40 foi considerada somente marcação em estruturas vasculares na região peritumoral. Não foi avaliada a presença de marcação intratumoral, pois foi observada marcação em células epiteliais neoplásicas. De fato, já foi descrita a expressão de podoplanina em diversos tecidos humanos normais como células osteoblásticas, queratinócitos basais, células mioepiteliais entre outros (RAICA et al. 2008). VAN DER AUWERA et al. (2006) também descrevem a marcação de D2-40 nas camadas basais de células epiteliais na epiderme e consideram controverso o papel dos vasos intratumorais e peritumorais nos processos de desenvolvimento e progressão tumoral.

Recentes estudos têm demonstrado o uso da marcação intratumoral de D2-40 na distinção entre tricoepiteliomas e carcinoma de células basais (PLAZA et al. 2010; TEBCHERANI et al. 2012). Contudo, apesar de D2-40

ser difusamente expresso nos tricoepiteliomas, o carcinoma de células basais também pode apresentar uma expressão focal desse marcador.

CUENI et al. (2010) citaram a importância de usar a expressão da podoplanina como um marcador para metástase linfonodal e metástase à distância em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. OHNO et al. (2007) e ZHAO et al. (2008) também ressaltam a importância da marcação imunoistoquímica de D2-40 em CEC de cavidade oral.

Neste estudo, todos os pacientes avaliados apresentaram expressão peritumoral de D2-40. Foi observada uma associação entre maior densidade de vasos linfáticos e ausência de expressão de VEGFR3 em amostras de linfonodos comprometidos por tumor. Também foi observada uma associação marginalmente significativa entre a expressão de D2-40 (maior área dos vasos) no linfonodo comprometido por tumor e tumores em estadios mais avançados.

ALI et al. (2008) também avaliaram a marcação de D2-40 na região peritumoral em carcinoma epidermóide oral e descreveram uma maior densidade linfovascular em tumores quando comparado à mucosa normal, mas não encontraram nenhuma associação com grau histológico, o que também foi observado por FRANCHI et al. (2004) e MIYAHARA et al. (2007).

FUNAYAMA et al. (2011) avaliaram a expressão de podoplanina em amostras de mucosa oral normal e hiperplásica, displasias e também em amostras de carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide oral, sugerindo que a expressão de D2-40 possa estar associada à severidade das lesões orais. Também descrevem expressão de D2-40 na periferia das ilhas tumorais, assim como também observado neste estudo

A integrina- β 1 promove fundamentalmente migração e progressão celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência e é indispensável para o desenvolvimento e homeostase (MEVES et al. 2011).

OHARA et al. (2009) observaram uma associação significativa entre a expressão de integrinas e metástase linfonodal em amostras de carcinoma epidermóide oral: a positividade para integrinas alfa3, alfa6A e β 1 decrescem à medida que aumenta a taxa de metástase regional e à distância. Dessa forma, a avaliação da expressão dessas integrinas poderia representar um fator útil para determinar o prognóstico e decidir a estratégia de tratamento.

Em nosso estudo a integrina- β 1 foi expressa na maioria dos tumores e sua expressão foi associada à tumores em estadiamento avançado. Contudo, esse dado deve ser avaliado com cautela devido ao reduzido número de pacientes negativos para integrina- β 1.

Alguns de nossos resultados estão em desacordo com a literatura. Contudo deve-se levar em consideração o uso de diferentes clones de anticorpos, diferentes formas de avaliação da reação imunoistoquímica e também a padronização dos anticorpos para o uso.

Em resumo, as proteínas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 foram predominantemente negativas; a proteína integrina- β 1 foi predominantemente positiva e a proteína D2-40 foi expressa em todas as amostras de carcinoma epidermóide.

Não foram observadas associações entre a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 e características clínico-patológicas. Parece haver uma associação entre a expressão das proteínas integrina- β 1 no

tumor, D2-40 (área dos vasos) nos linfonodos e tumores em estadio avançado. Contudo, esses resultados precisam ser confirmados em um maior número de pacientes.

Neste estudo também foi comparada a expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 nos tumores e linfonodos comprometido por tumor, na tentativa de se determinar se há um padrão de expressão durante a progressão tumoral. Contudo, não houve associação entre a expressão dessas proteínas nos tumores e nos linfonodos comprometidos por tumor. Apenas podemos ressaltar que há uma tendência da expressão no tumor e no linfonodo serem equivalentes.

Com relação à análise de sobrevida, não foi observada associação da expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 e as taxas de sobrevida câncer específica e livre de doença. Considerando-se as variáveis clínico-patológicas, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevida câncer específica entre os pacientes com estadiamento clínico/patológico diferente e também pacientes portadores de tumores com e sem invasão perineural, fatores que já são avaliados na determinação do prognóstico dos pacientes.

6 CONCLUSÕES

As proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 foram expressas nas amostras de carcinoma epidermóide oral e de linfonodos comprometidos por tumor

As proteínas VEGF-C, VEGF-D e VEGFR3 foram predominantemente negativas; a proteína integrina- β 1 foi predominantemente positiva e a proteína D2-40 foi expressa em todas as amostras de carcinoma epidermóide e de linfonodos comprometidos por tumor

Existe uma associação entre a expressão das proteínas D2-40 e integrina- β 1 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e uma associação entre a expressão da proteína D2-40 e ausência da expressão da proteína VEGFR3 nas amostras de linfonodo comprometidas por tumor

Não existe associação da expressão das proteínas VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3, D2-40 e integrina- β 1 nas amostras de carcinoma epidermóide oral e de linfonodos comprometidos por tumor

Parece existir uma associação entre a expressão das proteínas integrina- β 1 no tumor, D2-40 (área dos vasos) nos linfonodos e tumores em estadio avançado, ou seja, pacientes com tumores em estadio mais avançado apresentar maior expressão da proteína integrina- β 1 nas amostras de tumor e maior densidade de vasos nos linfonodos comprometidos por tumor

Com relação aos dados clínico-patológicos existem associações estatisticamente significativas entre estágio clínico e patológico, local do tumor e invasão perineural, dados já bem estabelecidos na literatura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. **Eur J Surg Oncol** 2005; 31:117-21.

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

Becker J, Pavlakovic H, Ludewig F, et al. Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1431-41.

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

Cai X, Ma S, Gu M, Zu C, Qu W, Zheng X. Survivin regulates the expression of VEGF-C in lymphatic metastasis of breast cancer. **Diagn Pathol** 2012; 7:52.

Chien CY, Su CY, Chuang HC, et al. Angiopoietin-1 and -2 expression in recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J Surg Oncol** 2008; 97:273-7.

Cianfarani F, Mastroeni S, Odorisio T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in primary cutaneous melanoma predicts sentinel lymph node positivity. **J Cutan Pathol** 2012; 39:826-34.

Cortesina G, Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Acta Otorhinolaryngol Ital** 2006; 26:317-25.

Cueni LN, Hegyi I, Shin JW, et al. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. **Am J Pathol** 2010; 177:1004-16.

De Aguiar AF Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral Oncol** 2007; 43:593-601.

Dias FL, Kligerman J, Matos de Sá G, et al. Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; 125:23-9.

Dong Z, Wei F, Zhou C, et al. Silencing Id-1 inhibits lymphangiogenesis through down-regulation of VEGF-C in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2011; 47:27-32.

Duff SE, Li C, Jeziorska M, et al. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. **Br J Cancer** 2003; 89:426-30.

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

Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, et al. Neck dissection: then and now. **Auris Nasus Larynx** 2006; 33:365-74.

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

Funayama A, Cheng J, Maruyama S, et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. **Pathobiology** 2011; 78:171-80.

Goes RS, Carvalho JP, Almeida BG, et al. Intratumoral lymphatic vessel density in vulvar squamous cell carcinomas: a possible association with favorable prognosis. **Int J Gynecol Pathol** 2012; 31:8-14.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2003; 260:502-8.

Hirota K, Wakisaka N, Sawada-Kitamura S, et al. Lymphangiogenesis in regional lymph nodes predicts nodal recurrence in pathological N0 squamous cell carcinoma of the tongue. **Histopathology** 2012 Jun 6. [Epub ahead of print].

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:106-30.

Jin S, Zhu W, Shi Q, Zhang Z, Guo R. Clinicopathological significance of lymphatic vessel density marked by D2-40 and E-cadherin expression in non-small-cell lung cancer. **Med Oncol** 2012 Apr 18 [Epub ahead of print].

Karatzanis AD, Koudounarakis E, Papadakis I, Velegrakis G. Molecular pathways of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2012; 269:731-7.

Kilvaer TK, Valkov A, Sorbye S, et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. **PLoS One** 2010; 5:e15368.

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

Kumar B, Chile SA, Ray KB, et al. VEGF-C differentially regulates VEGF-A expression in ocular and cancer cells; promotes angiogenesis via RhoA mediated pathway. **Angiogenesis** 2011; 14:371-80.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. **Cancer** 1994; 73:187-90.

Lim SC, Zhang S, Ishii G, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Clin Cancer Res** 2004; 10:166-72.

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

Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, et al. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. **Am J Pathol** 2009; 175:1709-21.

Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, et al. Postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Med Res** 2006; 4:200-8.

Meves A, Geiger T, Zanivan S, DiGiovanni J, Mann M, Fässler R. Beta1 integrin cytoplasmic tyrosines promote skin tumorigenesis independent of their phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108:15213-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

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

Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A, et al. Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2009; 15:429-36.

Ohno F, Nakanishi H, Abe A, et al. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:281-9.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Reboiras-López MD, Gándara Rey JM, García-García A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). **Oncol Rep** 2009; 22:1277-82.

Plaza JA, Ortega PF, Bengana C, Stockman DL, Suster S. Immunolabeling pattern of podoplanin (d2-40) may distinguish basal cell carcinomas from trichoepitheliomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 cases. **Am J Dermatopathol** 2010; 32:683-7.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010.

Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. **Anticancer Res** 2008; 28:2997-3006.

Rodrigo JP, Ferlito A, Suárez C, et al. New molecular diagnostic methods in head and neck cancer. **Head Neck** 2005; 27:995-1003.

Sotiriou C, Lothaire P, Dequanter D, Cardoso F, Awada A. Molecular profiling of head and neck tumors. **Curr Opin Oncol** 2004; 16:211-4.

Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. **Cancer Cell** 2006; 9:209-23.

Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. **Br J Cancer** 2007; 96:541-5.

Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, et al. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. **Int J Oncol** 2009; 34:673-80.

Tebcherani AJ, de Andrade HF Jr, Sotto MN. Diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing trichoepithelioma and basal cell carcinoma: evaluation using tissue microarray samples. **Mod Pathol** 2012; 25:1345-53.

Tampouris AI, Kandiloros D, Giotakis I, Gakiopoulou H, Lazaris AC. The role of the VEGF-C/-D/flt-4 autocrine loop in the pathogenesis of salivary neoplasms. **Pathol Res Pract** 2012; 208:151-6.

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.

Volker HU, Scheich M, Nowack I, et al. Lymphangiosis carcinomatosa in squamous cell carcinomas of larynx and hypopharynx--value of conventional evaluation and additional immunohistochemical staining of D2-40. **World J Surg Oncol** 2009; 7:25.

Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol** 2007; 8:227-38.

Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, et al. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg** 2007; 65:475-84.

Zhang Z, Helman JI, Li LJ. Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer--a review of mechanisms. **Int J Oral Sci** 2010; 2:5-14.

Zhang Z, Pan J, Li L, Wang Z, Xiao W, Li N. Survey of risk factors contributed to lymphatic metastasis in patients with oral tongue cancer by immunohistochemistry. **J Oral Pathol Med** 2011; 40:127-34.

Zhao D, Pan J, Li XQ, Wang XY, Tang C, Xuan M. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. **J Oral Pathol Med** 2008; 37:616-25.

Anexo 1 - Ficha de coleta de dados dos pacientes

Dados do paciente

Paciente (iniciais): _____ Sexo: _____

RGH _____ Raça _____

Idade ao diagnóstico: _____

Data do 1º diagnóstico _____

Tabagista: (0) não (1) sim (9) ign

Etilista: (0) não (1) sim (9) ign

Dados do tumor

Nº AP peça _____

Diagnóstico: _____

Tipo histológico: _____

Grau histológico: (1) bem diferenciado (2) moderadamente diferenciado (3) pouco diferenciado (4) indiferenciado

Estadio clínico: _____

Localização: _____

Tamanho da lesão: _____

Status margem: (0) livre (1) comprometida

Embolia vascular: (0) não (1) sim (9) ign

Invasão perineural: (0) não (1) sim (9) ign

Linfonodos comprometidos: (0) não (1) sim (9) ign

TNM: _____

Tratamento:

Data da cirurgia: _____

Quimioterapia neoadjuvante: (0) não (1) sim

Radioterapia neoadjuvante: (0) não (1) sim

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim

Segundo tumor primário: (0) não (1) sim

Localização: _____

Evolução:

1) Recidivas locais: (0) não (1) sim

data: _____

AP _____

Cirurgia: data _____

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim _____

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim _____

1) Metástases: (0) não (1) sim _____

data: _____

Local: _____

Cirurgia: (0) não (1) sim

data _____

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim _____

Radioterapia adjuvante: (0) não (1) sim _____

Status atual

Data da última informação _____

(1) vivo com doença (2) vivo sem doença (3) morto por doença (4) morto
outras causas

Anexo 2 - Protocolo do comitê de ética

São Paulo, 18 de Julho de 2011.

À
Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

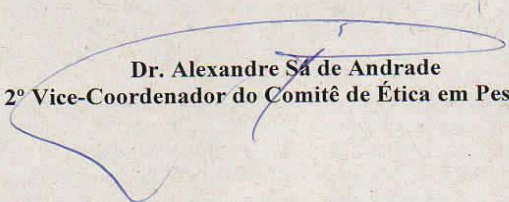
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1548/11
“Linfangiogênese em carcinoma epidermóide oral e associação com características clínicopatológicas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 12/07/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 14/06/2011, aprovaram a realização do estudo em referência, datado de 27 de Junho de 2011 (Versão 2) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia.

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

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 3 - Dados clínicopatológicos dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cavidade oral.

Paciente	Idade	Gênero	Raça	Data do 1º diagnóstico	Estadio clínico	TNM	Local tumor	Grau histológico	Margens	Invasão vascular	Invasão perineural	Linfonodos
1	56	M	B	02/03/00	II	T2N0M0	Faringe (região	bem diferenciado	livre	não	sim	1 de 19
2	56	M	B	14/02/00	IV	T3N1M0	Laringe(loja	moderadamente	livre	não	sim	9 de 37
3	59	M	B	23/03/00		T3N0M0	amigdalina direita)	diferenciado	livre	não	não	2 de 75
4	52	M	B	20/04/00	II	T2N0M0	Laringe(loja	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 82
5	56	M	B	17/05/00	III	T3N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	sim	0 de 65
6	41	M	B	07/08/00	II	T2N0M0	Orofaringe	moderadamente	livre	não	não	0 de 41
7	43	M	B	14/08/00	II	T3N3M0	Loja amigdaliana	diferenciado	livre	sim	sim	2 de 70
8	52	M	B	26/03/01	IV	T4N1M0	Amígdala esquerda	bem diferenciado	livre	sim	sim	1 de 64
9	77	F	B	07/04/01	I	T1N0M0	Amígdala	bem diferenciado	livre	não	não	
10	56	M	B	29/03/01	IV	T4N2M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	não	1 de 86
11	60	M		24/05/01			Orofaringe	moderadamente	livre	não	não	37 de 142
12	67	F	B	23/05/01	III	T3N0M0	Amígdalas	diferenciado	livre	sim	sim	
13	44	M	B	12/06/01	II	T2N1M0	Gengiva inferior	diferenciado	livre	não	SIM	0 de 77
14	75	F	B	09/05/01			esquerda	bem diferenciado	livre			
15	66	M	B	08/08/01	III	T3N2M0	Palato mole	moderadamente	comprometida	não	não	
16	30	M	NB	01/02/01	III	T3N3M0	Fossa nasal	diferenciado	livre	sim	sim	6 de 144
17	58	M	NB		I	T1N0M0	Amígdalas	moderadamente	livre	não	não	2 de 57
18	62	M	B	26/04/02	IV	T4N2M0	Cavidade oral e	diferenciado	livre	não	não	5 de 55
19	55	M	B	25/04/02	II	T1N0M0	faringe	bem diferenciado	livre	não	não	
20	88	F	B	06/03/02	I	T1N0M0	Assoalho bucal à	moderadamente	comprometida	não	sim	
21	32	F	B	09/05/02	II	T2N1M0	Loja amigdaliana	diferenciado	livre	não	não	1 de 24
22	63	M		25/04/02	IV	T1N1M0	direita	bem diferenciado	livre	sim	sim	1 de 67
23	90	M	B	02/07/02	III	T3N0M0	Língua (borda direita)	moderadamente	livre	não	sim	
24	59	M	B	22/05/02		T-N0M0	Região jugal direita	diferenciado	livre	não	não	0 de 63
25	41	F	B	06/09/02		T-N0M0	Gengiva	bem diferenciado	livre	não	não	
26	74	F	B	24/10/02	IV	T4N0M0	Orofaringe	moderadamente	livre	não	não	0 de 97
27	56	M	B		I	T1N3M0	palato	diferenciado	livre	não	não	0 de 31
28	79	M	B	19/11/02		T4N0M0	Assoalho bucal	bem diferenciado	livre	não	não	
29	61	M	B	06/02/03	IV	T4N0M0	Rebordo gengival e	moderadamente	livre	não	não	0 de 77
30	64	M		14/04/03		TxpN1M0	Gengiva	diferenciado	livre			1 de 35
							Língua	bem diferenciado	livre			

Paciente	Idade	Gênero	Raça	Data do 1º diagnóstico	Estadio clínico	TNM	Local tumor	Grau histológico	Margens	Invasão vascular	Invasão perineural	Linfonodos
31	66	M	B	16/01/03	I	T3N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 98
32	75	M	B	18/04/02	II	T3N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	sim	0 de 21
33	70	M	B	07/04/03	IV	T4N2M0	Língua, Laringe	moderadamente diferenciado	livre	sim	sim	2 de 128
34	84	M	B	15/05/03	IV	T4N0M0	Rebordo gengival	moderadamente diferenciado	livre	não	não	0 de 41
35	40	F	B	01/07/03	III	T2N3M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	sim	3 de 74
36	43	M	B	28/05/03	IV	T4N2M0	Retromolar	moderadamente diferenciado	livre	não	sim	12 de 67
37	71	M	B	05/03/03	II	T2N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 19
38	48	M	B		II	T2N0M0	Língua	moderadamente diferenciado	livre	não	não	0 de 28
39	76	F	NB	25/08/03	II	T2N0M0	Cavidade oral	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 17
40	63	M			III	T3N0M0	Palato mole, duro, assoalho da	moderadamente diferenciado	livre	não	não	0 de 58
41	66	M	B	29/09/03	IV	T4N0M0	Assoalho da boca	bem diferenciado	comprometida	não	sim	0 de 83
42	43	M	B	09/10/03	I	T1N0M0	Cavidade oral	bem diferenciado	livre	não	não	
43	54	M	B	26/09/03	IV	T3N2M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	sim	2 de 79
44	49	M	B	23/10/03	III	T3N0M0	Loja amigdaliana	Pouco diferenciado	livre	não	não	0 de 52
45	71	M	B	11/11/03	II	T2N1M0	Língua	moderadamente diferenciado	livre	não	não	1 de 37
46	60	M	B	11/11/03	III	T3N2M0	Loja amigdaliana	bem diferenciado	livre	não	não	2 de 69
47	55	M	B	24/11/03	IV	T3N2M0	Língua	moderadamente diferenciado	livre	sim	sim	1 de 86
48	66	M	B	14/08/04	II	T2N1M0	Gengiva	bem diferenciado	livre	não	não	1 de 135
49	52	M	B	25/11/04	I	T1N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 31
50	75	M	B	16/02/05	II	T2N0M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	não	0 de 24
51	57	M	NB	26/01/05	II	T2N1M0	Língua	bem diferenciado	livre	sim	sim	1 de 33
52	22	M	B	21/02/05	III	T2N2M0	Língua	bem diferenciado	livre	não	sim	1 de 79

Paciente	Tabagismo	Etilismo	Data da cirurgia	Quimio neo	Radio neo	Quimio adjuvante	Radio adjuvante	2o tumor primario	Recidiva	Metástase	status	Data última atualização
1	SIM	SIM	20/01/00	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NAO	NÃO	NÃO	Morto por doença	30/05/06
2	SIM	SIM	15/02/00	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	12/01/01
3	SIM	SIM	06/04/00	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	07/09/02
4	NAO	NAO	20/04/00	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	SIM	NAO	Vivo com doença	24/05/12
5	SIM	SIM	01/02/01	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	31/08/11
6	SIM	SIM	11/08/00	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	29/08/11
7		SIM	22/08/00	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	23/01/12
8	SIM	SIM	04/04/01	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	02/01/02
9	NAO	NAO	07/04/01	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	12/06/07
10	SIM	SIM	09/05/01	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	14/12/04
11	SIM	SIM	30/05/01	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	19/09/04
12	SIM	NÃO	08/08/01	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por outras causas	25/03/02
13	SIM	SIM	12/06/01	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	22/02/12
14	NÃO	NÃO	19/06/01	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	15/12/01
15	NAO	NAO	18/08/01	NAO	NAO	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO	Vivo com doença	14/02/12
16	SIM	SIM	21/12/01	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por outras causas	01/05/06
17			04/10/06	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	Vivo com doença	28/05/12
18	SIM	SIM	24/04/02	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Morto por doença	01/08/05
19	SIM	SIM	30/04/02	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	13/10/11
20	SIM	NAO	15/10/02	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo	23/10/04
21	SIM		00/04/05	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	06/02/12
22	SIM	NÃO	27/07/02	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	10/06/05
23	SIM	SIM	31/07/02	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	14/05/04
24	SIM	SIM	31/07/02	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	09/09/02
25	NAO	NAO	09/09/02	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo	11/09/02
26	NÃO	NÃO	02/11/02	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Morto	12/01/06
27	SIM			NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	08/12/11
28	SIM	SIM	27/11/02	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	27/02/05
29	SIM	SIM	19/03/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Morto por doença	06/12/09
30	SIM	NÃO	14/04/02	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Vivo com doença	17/01/06

Paciente	Tabagismo	Etilismo	Data da cirurgia	Quimio neo	Radio neo	Quimio adjuvante	Radio adjuvante	2o tumor primario	Recidiva	Metástase	status	Data última atualização
31			16/04/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo com doença	16/11/10
32	SIM	SIM	31/05/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	25/10/03
33	SIM	SIM	11/06/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	18/06/06
34	NÃO	NÃO	20/06/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Morto por doença	09/03/04
35	SIM	NÃO	23/07/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	11/06/12
36	SIM	SIM	25/07/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	Morto por doença	25/09/05
37			14/03/03	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	01/07/07
38	SIM	NÃO	10/08/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	Morto por doença	26/10/04
39	NÃO	NÃO	12/09/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	01/11/05
40	SIM	SIM	24/09/03	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	05/09/12
41	SIM	SIM	21/10/03	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	NAO	Morto por doença	22/07/05
42	NÃO	SIM	22/10/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	04/06/12
43	SIM	SIM	30/10/03	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	Morto por doença	04/01/05
44	NÃO	NÃO	05/03/11	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	04/08/11
45	SIM	SIM	24/11/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	26/03/12
46	SIM	SIM	19/11/03	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	13/01/12
47	SIM	SIM	16/12/03	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	Morto por doença	29/11/08
48	NÃO	NÃO	22/09/04	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Morto por doença	06/01/10
49	NÃO	SIM	01/12/04	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	Vivo sem doença	09/01/12
50	SIM	SIM	19/02/05	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	Vivo sem doença	10/10/11
51	SIM	SIM	01/03/05	NAO	NAO	NAO	SIM	NAO	NAO	SIM	Vivo sem doença	29/01/07
52	SIM	SIM	22/03/05	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	Morto por doença	23/05/06