

**STUDIUL ANGIOGENEZEI SI LIMFANGIOGENEZEI IN CARCINOAMELE  
SCUAMOASE ORALE (Cod CNC SIS:155)**

**Raport- ETAPA FINALĂ-2008**

**Director proiect: Conf. dr. Claudiu Mărgăritescu**

**Membrii echipei de cercetare: Prof. Mogoanta Laurentiu, Prof. Simionescu  
Cristiana Eugenia, Asist. Bunget Adina Magdalena, Asist. Ciurea Raluca**

An	Etapa	Obiective	Activități
2008	Unică	1. Studiu preliminar clinic si histopatologic al carcinoamelor scuamoase orale	1.1 Studiu prospectiv privind identificarea de noi cazurii clinice si inregistrarea lor in baze de date.
			1.2.Recoltarea, prelucrarea histopatologica si stocarea probelor biologice (tesuturi)
			1.3.Prelucrarea statistica a datelor clinice si histopatologice obtinute
			1.4. Identificarea cazurile de interes ce vor fi prelucrate imunohistochemic si morfometric.
			1.5. Workshop al grupului de studiu in scopul omogenizarii cunostintelor si stabilirea urmatoarelor etape ale cercetarii
		2. Studiu preliminar imunohistochemic si morfometric al neoangiogenezei in CSO	2.1. Identificare imunohistochemica a principalelor tipuri de neovase sanguine in CSO
			2.2. Stabilirea gradului de maturitate al neovase sanguine din CSO
			2.3. Evaluarea microdensitatii vaselor de neofomatie (MDV) intra- si peritumoral in CSO
			2.4. Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-angiogeni in CSO
			2.5. Prelucrarea statistica a rezultatelor obtinute
	Finală an	3. Studiu preliminar imunohistochemic si morfometric al limfangiogenezei in CSO	3.1. Identificare imunohistochemica a neovaselor limfatice in CSO
			3.2. Cuantificarea gradului de proliferare a al celulelor endoteliale limfatice in CSO
			3.3. Evaluarea microdensitatii vaselor de limfatice de novo sau preexistente (MDL) intra- si peritumoral/ superficial si in profunzime in CSO
			3.4. Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-limfangiogeni in CSO
3.5. Prelucrarea statistica a rezultatelor obtinute			
4. Obținerea de rezultate parțiale ale cercetării și diseminarea lor		4.1. Workshop al grupului de studiu in vederea elaborării lucrărilor ce vor fi publicate	
		4.2. Actualizarea site-ului	

## **Introducere.**

Cancerale orale reprezintă o problemă majoră de sănătate în lume atât datorită incidenței crescute și a ratei reduse de supraviețuire, cât și prin defectele funcționale și cosmetice ce însoțesc boala și tratamentul ei. Carcinogeneza orală constituie un model unic pentru studierea naturii multistadiale a cancerului prin prezența subsecventă la același individ a leziunilor precanceroase și a celor maligne invazive, reflectând progresia alterărilor fenotipice și genotipice asociate bolii [1,2].

Așa cum s-a demonstrat experimental unul din evenimentele importante ale tumorigenezei este achiziționarea unei rețele sanguine de nutriție –angiogeneza. Angiogeneza, care presupune formarea de noi vase sanguine din cele preexistente, constituie unul din fenotipurile esențiale ale dezvoltării neoplazice, fenomen implicat și în procesele fiziologice normale [3-4].

În procesul de angiogeneza sunt implicate o mare varietate de factori cu rol proangiogen (factorul de creștere al endoteliului vascular-VEGF, factorul de creștere fibroblastic bazic-FGFb, factorul de creștere epidermal derivat din plachete- PDEGF, interleukina 8, angiogenina și metaloproteinazele) [5] sau cu rol inhibitor (trombospondina-1, factorul plachetar-4, fragmente de plasminogen, de prolactina, interferonul- $\alpha$ , inhibitorul tisular al matrix metaloproteinazei-1) [6]. Studii privind angiogeneza în canceralele capului și gâtului au dovedit implicarea unei mari varietăți de factori proangiogeni (IL-8 și VEGF), produși atât de cheratinocitele normale cât și de celulele neoplazice [7, 8].

Este știută tendința carcinoamelor orale de a metastaza încă din stadiile incipiente în limfoganglionii laterocervicali, ca urmare a particularităților anatomice ale cavității orale [9]. În mare parte această caracteristică fenotipică a CSO se datorează limfangiogenezei, ce presupune formarea de noi vase limfatice din cele preexistente. Unii autori au demonstrat o corelație directă între nivelul expresiei VEGF-C în celulele tumorale și rata metastazării limfoganglionare în CSO [10,11]. Ohno și colab. [12] au arătat că limfangiogeneza intratumorală din CSO prezintă variații topografice, neexistând în zonele profunde ale tumorii, la marginea frontului de invazie, cel mai probabil datorită scăderii expresiei VEGF-C în celulele tumorale de la acest nivel.

Toate aceste studii au dus la conturarea unei terapii antitumorale relativ nouă, terapia antiangiogenică a cărei țintă directă o constituie celulele endoteliale care formează microvascularizația tumorii, controlând creșterea acesteia. O serie de experimente animale au demonstrat eficiența unora din agenții antiangiogeni în blocarea creșterii carcinoamelor scuamoase de la nivelul capului și gâtului [13,14], motiv pentru care unele sunt folosite în practica chimioterapeutică curentă a CSO sau fac obiectul de studiu al unor trialuri clinice în curs de desfășurare [15,16].

## MATERIAL ȘI METODE

Prezentul studiu a fost realizat în parte retrospectiv, în parte prin selectarea cazurilor actuale. Cazurile investigate au fost selecționate pe parcursul ultimilor 4 ani ianuarie 2005-septembrie 2008.

Datele clinice ale cazurilor selectate retrospectiv au fost extrase din foile de observație aflate în arhiva Clinicii de Chirurgie Oro-Maxilo-Faciala, din registrele Policlinicii Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, precum și din registrele Laboratorului de Anatomie Patologică al aceluiași spital. Principalele date investigate au fost cele epidemiologice (vârsta pacienților, sexul și identificarea unora dintre factorii de risc asociați cu carcinogeneza orală, cum ar fi asocierea unor leziuni premaligne sau existența în antecedente de cazuri familiale de cancer oral), date legate de topografia lezională (oferite de examenul local și explorări paraclinice) și unele caracteristici macroscopice ale pieselor operatorii (mărimea, gradul extensiei tumorale, invazia în structurile adiacente, prezența focarelor necrotice sau hemoragice și a metastazelor loco-regionale).

Materialul histopatologic utilizat a fost reprezentat de blocuri de parafină corespondente cazurilor selectate existente în histoteca Laboratorului de Anatomie Patologică iar pentru cazurile noi selectate de piesele de exereză chirurgicală furnizate de Clinica de Chirurgie Oro-Maxilo-Faciala. Acestea din urmă au fost prelucrate prin tehnica uzuală de includere la parafina, după fixarea în prealabil în formol 10% tamponat, săplare (24H în apă curgătoare), deshidratare (în alcooluri etilice de concentrație crescândă: 50°, 70°, 90° și 100°) și clarificare (în benzen). Blocurile de parafină atât cele vechi cât și cele noi obținute au fost secționare la microtom, iar secțiunile seriare rezultate au fost colorate cu colorația uzuală Hematoxilina-Eozina.

Evaluarea histopatologică a leziunilor a vizat următorii parametri: varietatea carcinomului scuamos, gradul de diferențiere, stadiul progresiei tumorale, aspectul metastazelor, prezența celulelor maligne reziduale la nivelul marginilor de siguranță, asocierea cu leziuni displazice sau cu alte modificări. Pe baza acestora au fost selectate un număr de 40 de cazuri ce au fost supuse investigațiilor imunohistochimice și de imunofluorescență.

Tehnicile de imunohistochimie și imunofluorescență au constat din (tehnicile descrise în amănunt în cele 2 articole publicate)[17,18]:

- reacții simple prin care în principiu au fost testați anticorpii folosiți, urmărindu-se expresia acestora în CSO, fie la nivelul celulelor tumorale, fie la nivelul vaselor de angiogeneza (Tabel 1);
- reacții duble prin care s-a urmărit morfologia vaselor sanguine și limfatice, precum și expresia unora din factorii proangiogeni și prolimfangiogeni în CSO (Tabel 2).

Tabel 1. Anticorpi folositi in studiu- testarea lor pe cel tumorale si vase

Nr crt.	Anticorp	Clona	Firma producatoare	Dilutia	Tip de demascare
1.	mouse monoclonal Ki-67	MIB-1	Dako	1:25	Tris EDTA pH9
2.	mouse monoclonal CD68	KP-1	Dako	1:50	Tris EDTA pH 9
3.	mouse monoclonal Triptaza mastocitara	AA1	Dako	1:150	Tris EDTA pH 9
4.	mouse monoclonal CD31	JC70A	Dako	Ready to use	
5.	mouse monoclonal Factor Von Willebrand	F8/F6	Dako	1:25	Citrat pH6
6.	mouse monoclonal CD105	SN6h	Dako	1:2000/ 1:1000	Proteoliza cu proteinaza K
7.	mouse monoclonal CD105	SN6h	Dako	1:2000/ 1:1000	Fara demascare/Proteoliza cu proteinaza K
8.	mouse monoclonal CD105	4G11	Abcam	1:50	Proteoliza cu proteinaza K
9.	mouse monoclonal D2-40	D2-40	Dako	1:100	Citrat pH6
10	Rabbit policlonal-podoplanina	-	Novus Biologicals	1:200	Citrat pH6
11	Rabbit policlonal Laminina	-	Abcam	1:25	Pepsina
12	mouse monoclonal-collagen IV	CIV22	Dako	1:25	Citrat pH6
13	mouse monoclonal SMA $\alpha$	- E-184	Abcam	1:500	Citrat pH6
14	Rabbit policlonal-VEGF	<b>Ab-1</b>	NeoMarkers	1:50	EDTA pH8
15	mouse monoclonal-VEGF	VG-1	Abcam	1:100	Citrat pH6
16	Rabbit policlonal-VEGF-C	-	InVitrogen	1:50	Citrat pH6
17	Rabbit policlonal VEGFR1 (Flt1)	-	Abcam	1:50	Citrat pH6
18	Rabbit policlonal VEGFR2	-	Abcam	1:50	Citrat pH6
19	Rabbit policlonal -Tie-2 (H-176)	-	SantaCruz	1:100	Citrat pH6
20	Rabbit policlonal Plasminogen (H-90)	-	SantaCruz	1:100	Citrat pH6

Tabel 2. reactiile duble folosite in investigarea morfologiei vaselor sanguine si limfatice, precum si a expresiei unora din factorii proangiogeni si prolimfangiogeni in CSO

Nr crt.	Anticorpi	Tip de reactie dubla	Ce s-a urmarit
1.	CD105+Ki-67	IF	Cuantificarea vaselor sanguine active (in proliferare)
2.	D2-40+Ki-67	IF	Cuantificarea vaselor limfatice active (in proliferare)
3.	CD105+SMA CD105+F VIII	IHC	Maturarea vaselor
4.	CD105+colagen IV CD105+laminina	IF	Morfologia vaselor sanguine
5.	D2-40+colagen IV D2-40+laminina	IF	Morfologia vaselor limfatice
6.	CD105+VEGF	IF	Cuantificarea vaselor sanguine VEGF+
7.	CD105+VEGFR1 CD105+ VEGFR2	IF	Cuantificarea vaselor sanguine active- implicate in angiogeneza
8.	CD105+ CD68	IHC	Evaluare densitatii macrofagelor si corelarea cu densitatea vaselor
9.	CD105+ mastocitara	Triptaza IHC	Evaluare densitatii mastocitelor si corelarea cu densitatea vaselor
10.	CD105+ mastocitara	CD68+Triptaza	Corelare intre densitatea vaselor si cea a macrofagelor si mastocitelor in CSO

IF=imunoflorescenta; IHC=imunohistochimie

Toate datele colectate (clinico-epidemiologice și histopatologice) au fost stocate computerizat cu ajutorul programului Microsoft Excel (versiunea 2002). O parte a acestor rezultate a fost înscrisă și pe o pagină web (<http://www.grants.umfcv.ro/pniiidpce20071/Prezentare.html>).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

**Activitățile specifice 2.1, 2.2 și 2.3 reliefate prin cele 2 articole publicate în etenso (referențele bibliografice 17 și 18, articolele anexate raportului).**

Investigind sensibilitatea marcajului celulelor endoteliale ale vaselor sanguine din CSO la markerii: CD105, CD31 și FVIII am constatat o sensibilitate, dar mai ales o specificitate mult mai bună a vaselor de neoangiogeneza pentru markerul CD105 [17]. În literatura sunt citate mai multe studii ce și-au propus să evalueze sensibilitatea și specificitatea marcajului endoteliului vaselor de neoangiogeneza prin utilizarea a numeroși markeri panendoteliali (CD34, CD31, și factorul von Willebrand), rezultate fiind controversate [19-23]. Alți autori au arătat că endoglină (CD105) pare să reacționeze specific cu celula endotelială angiogenică, fapt ce ia făcut să afirmăm că există o puternică legătură între microdensitatea vasculară (MVD) apreciată cu ajutorul acestui marker și prognosticul rezervat în diferite neoplazii umane [24-29].

Studiile efectuate de noi au arătat că marcajul la endoglină în CSO are maximum de intensitate la nivelul frontului de invazie, mai ales în zonele cu reacție inflamatorie [17,18].

Acest fapt vine sa confirme afirmatia potrivit careia marcajul la CD105 tinde sa descreasca pe masura ce ne departam de frontul de invazie tumoral [30].

Analizele statistice din studiile noastre nu au aratat existenta unor asociatii semnificative ale MVD calculat pentru expresia endoglinei cu virsta, sexul, topografia primara a tumorii, stadiul clinic si gradul de diferentiere [17,18]. Totusi, studiile de acest gen cu acest marker, desi putine arata ca ar exista o asociere semnificativ statistic intre un MVD inalt si prognosticul prost al unor astfel de carcinoame scuamoase ale capului si gitului [30-33].

Toate aceste rezultate pot sta la baza dezvoltarii unei terapii antiangiogenice pe baza de anticorpi monoclonali anti-endoglina. Astfel de studii exista, unul dintre acesti anticorpi dovedindu-se un bun inhibitor al angiogenezei, cresterii tumorale si metastazarii la soarece in functie de doza administrata [34]. In acelasi scop, Shiozaki et al [35] a obtinut un anticorp chimeric (proteina de fuziune) anti-CD105 cu proprietati antiangiogenice pe care l-a testat cu succes pe primat neumane.

Cazurile investigate de noi au scos in evidenta existenta unei arhitectonice vasculare tumorale haotice in CSO. Vasele tumorale au prezentat de regula o morfologie aberanta, fiind tortuoase, cu lumen rareori vizibil si numeroase ramificari. Ca si dimensiuni ele au fost variabile, dar in tumora au predominat cele de calibru mic (sub 15 $\mu$ m in diametru) si celulele endoteliale izolate [17, 18]. Vasele cele mai largi au fost evidentiate de noi la frontul de invazie si ele au avut un traiect neregulat si alungit in sectiuni transverse. Uneori arhitectura vasculara a fost mult mai complexa, fiind reprezentata de retele vasculare cu numeroase ramificatii si cu un traiect extrem de sinuos. Cele de la nivelul frontului de invazie au avut frecvent o distributie circumferentiala, formind deseori o manta in jurul insulelor carcinomatoase. Acelasi model arhitectural a fost intilnit si in profunzimea CSO bine diferite. Ramuri ale acestei retele in manta deseori s-au insinuat printre proliferarile carcinomatoase in interiorul acestor insule tumorale [17, 18].

Datele din literatura scot in evidenta diferentele existente atat din punct de vedere structural cit si functional intre vascularizatia tumorilor si cea din testurile normale de origine ale acestor tumori [36]. In general se crede ca patternul angiogenezei si tipurile de vase induse de diferitele tumori umane difera de la un tip de tumora la altul. Astfel inca din anii 1979 Warren [36] a consemnat faptul ca morfologia vasculara a unei anumite tumori este in general caracteristica acelei tumori, dar ea nu este unica pentru acea tumora.

Prima incercare de caracterizare morfologica a vaselor de neoangiogeneza tumorala a apartinut lui Warren [36] si ea are o valoare doar istorica.

Cea mai recenta clasificare este cea elaborata de catre Gee et al [37] care au grupat neovasele tumorale in functie de marime, gradul lor de perfuzie si prezenta sau absenta pericitelor in trei categorii principale:

- tipul imatur constand din muguri endoteliali neperfuzati, cu o intensa rata de proliferare, lipsite de pericite ce iau nastere din vase functionale;
- tipul intemediar constand din vase de calibru mic, perfuzate, dar inca neacoperite de pericite;

- tipul matur reprezentat prin vase de calibru mare, perfuzate si acoperite in cea mai mare parte de pericite.

Luand in considerare aceasta clasificare in studiile intreprinse de noi am observat predominanta vaselor de tip imatur si intermediar in CSO [17,18]. Astfel profund in tumora au predominat celulele endoteliale izolate, CD105 pozitive, SMA si colagen IV negative, si cu o reactivitate variabila pentru FVIII. Acestea sunt cele mai imature vase, nefiind acoperite de pericite, fara membrana bazala si adesea le lipsesc corpii Weibel-Palade. Aceste vase au avut cel mai index de proliferare dintre toate celelate tipuri de vase de neoangiogeneza a CSO. Cel mai frecvent tip de vase intilnit de noi in angiogeneza din CSO a fost cel de tip intermediar. Acestea au avut urmatorul profil imunohistochimic: CD105 si colagen IV pozitive, SMA negative si o reactivitate variabila pentru FVIII. Morfologic aceste vase nu au prezentat pericite, dar au avut o membrana bazala de grosime variabila si adesea cu discontinuitati. Tipul matur de vase in cazuistica noastra a fost cel mai putin intilnit, iar imunohistochimic acestea au fost pozitive la toti cei 4 markeri investigati. Acestea au avut membrana bazala, adesea continua, au fost acoperite de pericite si au prezentat corpi Weibel-Palade.

Aceasta caracterizare a populatiei de vase din carcinoamele scuamoase orale facuta de noi este un element de noutate pe plan international. Importanta acestei caracterizari rezida in posibilitatea ca fiecare din elementele structurale componente ale acestor vase de angiogeneza sa devina tinta terapeutica. Astfel tintirea membranei bazale s-a dovedit ca duce la apoptoza celulelor endoteliale si regresia tumorii [38-41]. Ceva mai recent Lu et al. [42] au aratat ca tintirea farmacologica a celulelor endoteliale (cu inhibitorul receptorului VEGF- AEE788) si a pericitelor (cu inhibitorul receptorului PDGF- STI571) au indus in modelul ortotopic de cancer ovarian la soarece regresia tumorii, partial prin distrugerea pericitelor si cresterea consecutiva a sensibilitatii acestor vase la agentii chimioterapici.

**Activitatea specifice 2.4. Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-angiogeni in CSO [vezi referintele bibliografice 43,44].**

Investigand expresia VEGF in CSO am consemnat o variabilitate a reactivitatii acestor tumori intre 44-55% [43,44]. Expresia acestui factor de crestere pe cazuistica de CSO studiata de noi in corelatie cu alti parametri clinico-morfologici a dat rezultate contradictorii. Astfel pe un studiu initial de 11 de cazuri am consemnat corelarea expresiei VEGF cu MVD, gradul de diferentiere tumorala si prezenta invaziei [43]. Ulterior schimband anticorpul si pe un numar mai mare de cazuri 25 am consemnat nu am putut gasii o corelatie semnificativ statistica intre expresia lui VEGF si MVD nici cu gradul de diferentiere histologic, nici cu stadiul clinic sau fumatul [44]. Este bine stiut faptul ca in procesul de angiogeneza sunt implicate o mare varietate de factori cu rol proangiogen (factorul de crestere al endoteliului vascular-VEGF, factorul de crestere fibroblastic bazic-FGFb, factorul de crestere epidermal derivat din plachete- PDEGF, interleukina 8, angiogenina si metaloproteinazele) [5] sau cu rol inhibitor (trombospondina-1, factorul plachetar-4, fragmente de plasminogen, de prolactina, interferonul- $\alpha$ , inhibitorul tisular al matrix metaloproteinazei-1) [6]. Studii privind angiogeneza in cancerule capului si gatului au dovedit implicarea unei mari varietati de factori proangiogeni (IL-8 si VEGF), produși

atat de cheratinocitele normale cat si de celulele neoplazice [7, 8]. Aceiasi variabilitate a expresiei VEGF-ului in CSO a fost remarcat de numerosi autori, iar cele mai multe din rapoarte indica faptul ca n-ar exista o corelatie semnificativa intre valorile MVD si nivelul expresiei VEGF in astfel de tumori si nici intre acestea si topografia lezionala sau gradul de diferentiere tumoral [45]. Este insa unanim acceptat faptul ca nivelul expresiei VEGF poate fi considerat ca un factor de prognostic independent al pacientilor cu CSO, acesta fiind cu atat mai mare cu cit stadiul clinic al pacientilor este mai avansat [31, 45-47].

In ceea ce priveste expresia receptorilor (VEGFR1 si VEGFR2) acestui factor de crestere studiile noastre au demonstrat existenta expresiei ambilor markeri atat in tumori cit si la nivelul vaselor de sange tumorale, dar cu intensitati diferite [rezultate inca nepublicate]. Cea mai mare expresie ati tumoral cit si la nivelul vaselor a fost obtinuta pt VEGFR1 comparativ cu VEGFR2. Existenta celor 2 receptori la nivelul endoteliului vascular a fost pusa evidenta inca din 1999 [48]. In celulele nonendoteliale prezenta celor doi receptori a fost descrisa in diferite tipuri de celule tumorale [49], inclusiv in celule carcinomatoase din CSO ale capului si gitului [50].

### **Activitatile specifice 3.1, 3.2 si 3.3 [vezi referinta bibliografice 51].**

Utilizand ca marcar al celulei endoteliale limfatice podoplanina am constatat ca vasele limfatice in CSO sunt distribuite neuniform [51]. Totusi, evaluarea densitatii vaselor limfatice (LVD) a evidentiat faptul ca acestea sunt mult mai numeroase la periferia tumorilor (intr-o arie de 1mm fata de interfata tumora-tesut gazda). Referitor la vasele limfatice intratumorale am consemnat ca acestea sunt mai numeroase in ariile superficiale, densitatea lor scazand in zonele profunde ale tumorilor [51]. Este stiuta tendinta carcinoamelor orale de a metastaza inca din stadiile incipiente in limfoganglionii laterocervicali, ca urmare a particularitatilor anatomice ale cavitatii orale [9]. Se estimeaza o rata a incidentei metastazelor oculate limfoganglionare in CSO variind intre 27-40% [52,53]. De asemenea 20%-40% din pacientii cu CSO prezinta postoperator recidive limfoganglionare laterocervicale [54]. In mare parte aceste caracteristici fenotipice ale CSO se datoreaza limfangiogenezei, ce presupune formarea de noi vase limfatice din cele preexistente. Identificarea markerilor relativi specifici ai endoteliului limfatic s-a facut abia in ultimii 10 ani: podoplanina [55], Prox-1 [56], LYVE-1 [57] si VEGFR-3 [58, 59]; primul factor cu certa actiune prolimfoangiogena, respectiv VEGF-C a fost descoperit in 1996 [10]. Similar rezultatelor noastre, Ohno et al. [12] a evidentiat faptul ca LVD este mai mare in ariile superficiale ale tumorii decit in ariile de mucoasa orala normala, iar in ariile profunde tumorale numarul acestora a scazut dramatic comparativ cu ariile peritumorale. Acest lucru pare sa sugereze faptul ca limfangiogeneza intratumorală in ariile profunde, adiacente frontului de invazie este mai degraba inhibata decit indusa [12]. Franchi et al. [60] au consemnat si ei o scadere semnificativa a vaselor limfatice intratumorale din CSO comparativ cu tesutul peritumoral. Padera et al. [61] au raportat absenta vaselor limfatice functionale intratumorale intr-un model tumoral de rozatoare.

Sub raportul gradului de proliferare a celulelor endoteliale limfatice am constatat ca indexul proliferativ este inferior celui al celulelor endoteliale ale vaselor sanguine tumorale [rezultate inca nepublicate]. De asemenea cele mai numeroase vase limfatice active (in

proliferare) le-am consemnat la periferia tumorii si in ariile superficiale). Ohno et al. [12] a evidentiat prezenta de vase limfatice in proliferare numai in ariile superficiale ale tumorii, acestea luand nastere din hiperplazia sau inmugurirea vaslor limfatice preexistente ale mucoasei orale normale.

Dintre factorii prolimfangiogeni cunoscuti am cuantificat doar expresia factorului de crestere VEGF-C [rezultate inca nepublicate]. Expresia acestui factor de crestere este heterogena la nivelul populatiei celulare tumorale din CSO studiate. Intensitatea reactiei pare sa fie mai mare spre ariile de suprfaata fata de cele profunde. In plus am consemnat o reactie mai intensa indeosebi in ariile adiacente stromei inflamatorii. Sedivy et al. [62] a consemnat faptul ca densitatea vaselor limfatice este semnificativ mai mare in tumorile VEGF-C pozitive comparativ cu cele VEGF-C negative, lucru de altfel confirmat si de catre Ohno et al. [12]. Aceste rezultate confirma faptul ca VEGF-C este un mitogen potent responsabil de proliferarea celulelor endoteliale limfatice in CSO. In plus, Ohno et al. [12] au consemnat faptul ca expresia lui VEGF-C a fost scazuta in tesutul intratumoral, in special in ariile vecine frontului de invazie. Ali [2008] a evidentiat rolul prolimfangiogen in CSO si a altor factori de crestere: factorul de crestere derivat plachetar, factorul bazic de crestere fibroblastic, factorul I de crestere similar insulinei si factorul de crestere hepatocitar, sugerind ca acestia se pot constitui in potentiale tinte terapeutice antilimfangiogenice in CSO.

## **Parteneri celulari macrofage, mastocite**

### **Bibliografie:**

1. Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 2006;43(2):60-6.
2. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, et al. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis*. 2007;13(2):126-33.
3. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 1991;52:407-22.
4. Torry RJ, Rongish BJ. Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis. *Am J Reprod Immunol* 1992;27:171-9.
5. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*. 2005;128(3):303-9.

6. Sato Y. Update on endogenous inhibitors of angiogenesis. *Endothelium*. 2006;13(2):147-55.
7. Nakazato T, Shingaki S, Kitamura N, et al. Expression level of vascular endothelial growth factor-C and -A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates respectively with lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity. *Oncol Rep*. 2006;15(4):825-30.
8. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J et al. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32(3):176-81.
9. Houck JR, Medina JE. Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck. *Semin Surg Oncol* 1995; 11: 228–39.
10. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, et al: Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:391.
11. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA: Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001;92:556.
12. 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 May;36(5):281-9.
13. Myoung H, Hong SD, Kim YY, et al. Evaluation of the anti-tumor and anti-angiogenic effect of paclitaxel and thalidomide on the xenotransplanted oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2001;163:191-200.
14. Myoung H, Hong SP, Yun PY, et al. Anti-cancer effect of genistein in oral squamous cell carcinoma with respect to angiogenesis and in vitro invasion. *Cancer Sci*. 2003;94(2):215-20.
15. Shin DM, Khuri FR, Glisson BS, et al. Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2001;91(7):1316-23.
16. Worden FP, Moon J, Samlowski W, et al.; Southwest Oncology Group, Head and Neck Working Group. A phase II evaluation of a 3-hour infusion of paclitaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: Southwest Oncology Group study 0007. *Cancer*. 2006;107(2):319-27.
17. Mărgăritescu C, Simionescu C, Mogoantă L et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(3):321-6. PMID: 18758636.
18. Margaritescu C, Simionescu C, Pirici D, et al. Immunohistochemical characterization of tumoral vessels in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(4) in press.
19. Aebersold DM, Beer KT, Laissue J, et al. Intratumoral microvessel density predicts local treatment failure of radically irradiated squamous cell cancer of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48:17–25.
20. Gallo O, Masini E, Bianchi B, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2002; 33:708–714.
21. Kyzas PA, Cunha IW, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1434–1440.
22. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, et al. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol* 1997; 183:39–43
23. Salven P, Heikkilä P, Anttonen A, et al. Vascular endothelial growth factor in squamous cell head and neck carcinoma: expression and prognostic significance. *Mod Pathol* 1997; 10:1128–1133.
24. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, et al. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2000;96:224–228.
25. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol* 2004; 35:176–183
26. Li C, Gardy R, Seon BK, et al. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 88:1424–1431
27. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:5917.
28. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, et al. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22:248–253.
29. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, et al. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003;10:220–227.
30. Schimming R, Marme D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002; 24:151–156.

31. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2006;448(6):768-75.
32. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, et al. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2006 Jun;126(6):633-9.
33. Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol.* 2005 Feb;41(2):147-55.
34. TAKAHASHI N, HABA A, MATSUNO F, et al. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Research* 2001;61:7846-54.
35. Shiozaki K, Harada N, Greco WR, et al. Antiangiogenic chimeric anti-endoglin (CD105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Feb;55(2):140-50.
36. WARREN B.A. The vascular morphology of tumors. Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental human tumors. Florida: CRC Press, 1979:1-47.
37. GEE MS, PROCOPIO WN, MAKONNEN S, et al.. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *American Journal of Pathology* 2003;162:183-93.
38. BROOKS PC, MONTGOMERY AM, ROSENFELD M, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157-64.
39. INGBER DE, MADRI JA, FOLKMAN J. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 1986;119:1768-75.
40. LIU W, AHMAD SA, REINMUTH N, et al. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis.* 2000;5:323-8.
41. NERI D, CARNEMOLLA B, NISSIM A, et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nature Biotechnology* 1997;15:1271-5.
42. LU C, KAMAT AA, LIN YG, et al. Dual targeting of endothelial cells and pericytes in antivascular therapy for ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2007;13:4209-17.
43. C Mărgăritescu, Cristiana Simionescu, L Mogoantă, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral squamous cell carcinoma. La 17-eme Session des Journées Medicales Balkaniques, 12-14 sept Craiova, Roumanie, 2007: 8-9
44. I Stoicescu, C. Simionescu, C. Margaritescu. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in squamous cell carcinomas correlation with clinicopathological characteristics and prognosis. 21 st World Congress of Dermatology, 30 sept-5oct, Argentina, Buenos Aires, 2007: 567.
45. Li C, Shintani S, Terakado N, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul;34(5):559-65.
46. Tse GM, Chan AW, Yu KH, et al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2007 Dec;14(12):3558-65.
47. Wong YK, Liu CJ, Kwan PC, et al. Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Nov;61(11):1257-62.
48. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.
49. Masood R, Cai J, Zheng T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood.* 2001;98:1904-1913.
50. Lalla RV, Boisoineau DS, Spiro JD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Aug;129(8):882-8.
51. C Mărgăritescu, Cristiana Simionescu, L Mogoantă, et al. Lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma evaluated by immunohistochemistry using podoplanin antibody. La 17-eme Session des Journées Medicales Balkaniques, 12-14 sept Craiova, Roumanie, 2007: 9.

52. Khafif RA, Gelbfish GA, Tepper P, et al: Elective radical neck dissection in epidermoid cancer of the head and neck. A retrospective analysis of 853 cases of mouth, pharynx, and larynx cancer. *Cancer* 1991;67:67.
53. van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, et al: The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope* 1996;106: 987.
54. 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.
55. Breiteneder-Geleff S., Soleiman A., Kowalski H. et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am. J. Pathol.*, 1999;154: 385–394.
56. Wigle J. T. and Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 1999;98: 769–778.
57. Banerji S., Ni J., Wang S. X. et al. G. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.*, 144: 789–801, 1999.
58. Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A. et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 1996;15: 290–298.
59. Kukk E., Lymboussaki A., Taira S. et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development (Camb.)*, 1996;122: 3829–3837.
60. 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.
61. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883–6.
62. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 455–60.
63. Ali MA. Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract.* 2008;17(6):486-92.