

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

Raport- ETAPA FINALĂ-2009

Director proiect: Conf. dr. Claudiu Mărgăritescu

**Membrii echipei de cercetare: Prof. Mogoanta Laurentiu, Prof. Simionescu
Cristiana Eugenia, Asist. Ciurea Raluca, Drd. Alina Stinga**

An	Etapa	Obiective	Activități	Categoriile de buget ¹	Necesare resurse financiare (Valoare lei)	Termen de decontare ²	Rezultate livrate pe etapă
2009	Unica Finală an	1. Continuarea studiului imunohistochimic si morfometric al neoangiogenezei in CSO	1.1. Evaluarea microdensitatii vaselor de neoformatie (MDV) intra- si peritumoral in CSO	-Cheltuieli de personal - Cheltuieli logistică (reactivi imunohistochimie) -Regie	- 3510,327 - 48.062,57 - 1152,075	15.09.2009	Actualizare baze de date
			1.2 Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-angiogeni in CSO	-Cheltuieli de personal -Regie	3510,327 1152,075		
		2. Continuarea studiului imunohistochimic si morfometric al limfangiogenezei in CSO	2.1. Evaluarea microdensitatii vaselor de limfatice de novo sau preexistente (MDL) intra- si peritumoral/ superficial si in profunzime in CSO	-Cheltuieli de personal -Regie	3510,327 - 1152,075		
			2.2. Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti- limfangiogeni in CSO	-Cheltuieli de personal -Regie	3510,327 - 1152,075		

		3. Obținerea de rezultate parțiale ale cercetării și diseminarea lor	3.1. Workshop al grupului de studiu în vederea elaborării lucrărilor ce vor fi publicate	-Cheltuieli de personal -Regie	3510,327 - 1152,075			
			3.2. Actualizarea site-ului	-Cheltuieli de personal -Regie	3510,295 - 1152,075			Publicare 2 articole Actualizare site Raport științific
			Total etapă					76.036,95

Introducere.

Cancerle 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- α , inhibitorul tisular al matrix metaloproteinazei-1) [6]. Studii privind angiogeneza în cancerle 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 fronutului de invazie, cel mai probabil datorita scaderi expresiei VEGF-C in celulele tumorale de la acest nivel.

Toate aceste studii au dus la conturarea unei terapii antitumorale relativ noua, terapia antiangiogenica a carei tinta directa o constituie celulele endoteliale care formeaza microvascularizatia tumorii, controland cresterea acesteia. O serie de experimente animale au demonstrat eficienta unora din agentii antiangiogeni in blocarea cresterii carcinoamelor scuamoase de la nivelul capului si gatului [13,14], motiv pentru care unele sunt folosite in practica chimioterapeutica curenta a CSO sau fac obiectul de studiu al unor trialuri clinice in curs de desfasurare [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 5 ani ianuarie 2005-iunie 2009.

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 orala, 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 alcoluri 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 secționate la microtom, iar secțiunile seriate rezultate au fost colorate cu colorația uzuală Hematoxilina-Eozina.

Evaluarea histopatologica 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 numar de 50 de cazuri ce au fost supuse investigatiilor imunohistochimice si de imunofluorescenta.

Tehnicile de imunohistochimie si imunofluorescenta au constat din (tehnici descrise in amanunt in cele 2 articole publicate)[17,18]:

• reactii simple prin care in principiu au fost testati anticorpii folositi, urmarindu-se expresia acestora in CSO, fie la nivelul celulelor tumorale, fie la nivelul vaselor de angiogeneza (Tabel 1);

• reactii duble prin care s-a urmarit morfologia vaselor sanguine si limfatice, precum si expresia unora din factorii proangiogeni si prolimfangiogeni in 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	Fara demascare/Proteoliza cu proteinaza K
7.	mouse monoclonal CD105	4G11	Abcam	1:50	Proteoliza cu proteinaza K
8.	mouse monoclonal D2-40	D2-40	Dako	1:100	Citrat pH6
9.	Rabbit policlonal-podoplanina		Novus Biologicals	1:200	Citrat pH6
10	Rabbit policlonal Laminina	-	Abcam	1:25	Pepsina
11	mouse monoclonal-coloagen IV	CIV22	Dako	1:25	Citrat pH6
12	mouse monoclonal SMA α	- E-184	Abcam	1:500	Citrat pH6
13	Rabbit policlonal-VEGF	Ab-1	NeoMarkers	1:50	EDTA pH8
14	mouse monoclonal-VEGF	VG-1	Abcam	1:100	Citrat pH6
15	Rabbit policlonal-VEGF-C		InVitrogen	1:50	Citrat pH6
16	Rabbit policlonal VEGFR1 (Flt1)	-	Abcam	1:50	Citrat pH6
17	Rabbit policlonal VEGFR2	-	Abcam	1:50	Citrat pH6
18	mouse monoclonal IL8		R&D System	1:500	

19	mouse monoclonal	IL8 receptor	R&D System	1:20	
20	Rabbit	Polyclonal	Abbiotec	1:250	
21	mouse monoclonal	FGF2 Receptor	Sigma-Aldrich	5µg/ml	
22	mouse monoclonal	EGF F5	Thermoscientific	1:20	
23	mouse monoclonal	EGFR	DakoCytomation	1:50	Tris-EDTA pH 9
24	Rabbit policlonal	-Tie-2 (H-176)	SantaCruz	1:100	Citrat pH6
25	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	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.	VEGFR1+VEGFR2	IF	Cuantificare receptori ai VEGF implicati in angiogeneza
9.	D2-40+VEGFR3		Cuantificarea vaselor limfatice active- implicate in limfangiogeneza
10.	CD105+ CD68	IHC	Evaluare densitatii macrofagelor si corelarea cu densitatea vaselor
11.	CD105+ mastocitara	Triptaza IHC	Evaluare densitatii mastocitelor si corelarea cu densitatea vaselor

IF=imunofluorescenta; 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/pniidpce20071/Prezentare.html>).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitățile specifice 1.1, 1.2, 2.1 și 2.2 reliefate prin cele 2 articole publicate în extenso (referențele bibliografice 19 și 20, articolele anexate raportului).

Activitatea specifică 1.1. Evaluarea microdensității vaselor de neoformare (MDV) intra- și peritumoral în CSO

Asa cum am arătat anterior [17] cel mai sensibil marker al vaselor sanguine tumorale este CD105. Astfel, am dovedit că marcajul la endoglinea în CSO are maximum de intensitate la nivelul frontului de invazie, mai ales în zonele cu reacție inflamatorie [17,18]. Acest fapt vine să confirme afirmația potrivit căreia marcajul la CD105 tinde să descrească pe măsura ce ne departăm de frontul de invazie tumoral [30].

Analizele statistice din studiile noastre nu au arătat existența unor asociații semnificative ale MVD calculat pentru expresia endoglinei cu vîrsta, sexul, topografia primară a tumorii, stadiul clinic și gradul de diferențiere [17,18]. Totuși, studiile de acest gen cu acest marker, deși puțin arată că ar exista o asocieră semnificativ statistic între un MVD înalt și prognosticul prost al unor astfel de carcinoame scuamoase ale capului și gîtului [30-33].

Toate aceste rezultate pot sta la baza dezvoltării unei terapii antiangiogenice pe baza de anticorpi monoclonali anti-endoglinea. Astfel de studii există, unul dintre acești anticorpi dovedindu-se un bun inhibitor al angiogenezei, creșterii tumorale și metastazării la soarece în funcție de doza administrată [34]. În același scop, Shiozaki et al [35] a obținut un anticorp chimeric (proteina de fuziune) anti-CD105 cu proprietăți antiangiogenice pe care l-a testat cu succes pe primat neuman.

Sub raport arhitectural rezultatele obținute de noi au arătat că vasele de neoangiogeneza din CSO au de regulă o morfologie aberantă, fiind tortuoase, cu lumen rareori vizibil și numeroase ramificații. Ca și dimensiuni ele au fost variabile, dar în tumora au predominat cele de calibr mic (sub 15 μm în diametru) și celulele endoteliale izolate [17, 18]. Uneori arhitectura vasculară a fost mult mai complexă, fiind reprezentată de rețele vasculare cu numeroase ramificații și cu un traiect extrem de sinuos. Cele de la nivelul frontului de invazie au avut frecvent o distribuție circumferențială, formînd deseori o manta în jurul insulelor carcinomatoase, trimitînd prelungiri în interiorul acestora.

Datele din literatură scot în evidență diferențele existente atît din punct de vedere structural cît și funcțional între vascularizația tumorilor și cea din testurile normale de origine ale acestor tumori [36]. În general se crede că patternul angiogenezei și tipurile de vase induse de diferitele tumori umane difere de la un tip de tumora la altul. În raport cu clasificarea lui Gee et al [37] noi am observat predominanța vaselor de tip imatur și intermediar în CSO [17,18]. Importanța acestei caracterizări rezidă în posibilitatea ca fiecare din elementele structurale componente ale acestor vase de angiogeneza să devină țintă terapeutică.

Activitatea specifica 1.2 Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-angiogeni in CSO

Cel mai investigat factor proangiogen de catre noi a fost VEGF, respectiv VEGFA. In afara datelor anterioare [38,39] efectuand un studiu amplu pe 54 de cazuri de CSO [19,40] cu diferite localizari la nivelul cavitatii orale si cu diferite grade de diferentiere si folosindu-ne de reactii duble imunohistochimice si de imunofluorescenta am constatat:

- Prezenta expresiei VEGF pe zonele de mucoasa orala normala din marginile de resectie ale pieselor tumorale, exprimata predominant in stratul, dupa descreste spre straturile superficiale;
- In leziunile preneoplazice asociate proceselor canceroase expresia VEGF a fost mai crescuta in stratul parabal
- In tesutul tumoral propriu-zis expresia VEGF a fost mult mai ridicata fata de noraml sau leziunile preneoplazice, dar intensitatea expresiei a fost extrem de heterogena la nivelul intregii tumori.
- S-a realizat in premiera mondiala o cuantificare mult mai exacta si mai usor reproductibila a expresiei VEGF folosindu-ne de o metoda de morfometrie digitala care a permis evaluarea IOD a acestui semnal. Este vorba de Densitatea Optica Integrata= aria regiunii de interes X intensitatea medie per pixel a semnalului.
- Rata de pozitivitate a tumorilor investigate in ceea ce priveste expresia VEGF a fost de 87%
- Exista o tendinta de supraexpresie a VEGF la nivelul frontului de invazie si de asemenea o scadere a ratei de expresie a VEGF in formele slab diferentiate de CSO
- Dintre parametrii clinico-patologici singurii cu care am reusit sa facem corelatii cu nivelul expresiei VEGF au fost marimea tumorii si prezenta metastazelor limfatice

In plus am mai consemnat faptul ca o sursa importanta de VEGF in carcinoamele scuamoase orale sunt si celulele inflamatorii, indeosebi macrofagele si mastocitele. Pe acestea din urma le-am cuantificat atat histochemic (coloratia cu albastru alcian safranina) cat si imunohistochemic (tryptaza) in raport cu densitatea vaselor sanguine si topografia tumorii. Rezultatele au fost comunicate [41], dar inca nepublicate. In concluzie am stabilit ca mastocitele sunt o prezenta constanta in CSO, densitatea lor cea mai mare fiind la nivelul frontului de invazie in raport intim cu vasele sanguine tumorale de la acest nivel. Rezultatele obtinute sunt in concordanta cu cele din literatura de specialitate, care scot in evidenta rolul mastocitelor in angiogeneza tumorală de la nivelul capului si gatului [43-45].

Datele din literatura in ceea ce priveste rata de expresie a VEGF in carcinoamele orale sunt contradictorii [45-56], procentul nr. de cazuri pozitive pentru VEGF variind intre 24-100% cu o valoare mediana de 77%.

De asemenea, în acord cu datele prezentate de noi Kyzas et al. [51] și Shintani et al. [54] au demonstrat o creștere a expresiei VEGF la nivelul frontului de invazie al CSO.

Marea majoritate a studiilor din literatura au demonstrat o corelație semnificativă statistic între nivelul expresiei VEGF și gradul de diferențiere al CSO [48,51-54,55,57], așa cum am arătat și noi, dar au existat și studii care au demonstrat contrariul [46,54,59].

În ceea ce privește gradul de corelare al expresiei VEGF și mărimea tumorii, respectiv statusul clinic rezultatele obținute de noi se alătură celor obținute de alți cercetători [56,59,60], deși unele studii au arătat contrariul [52,54,57].

Referitor la asocierea expresiei VEGF și statusul limfatic marea majoritate a datelor din literatura [49,50,54,57,61-64], printre care și noi indică existența unei astfel de corelații.

În ceea ce privește expresia receptorilor (VEGFR1 și VEGFR2) acestui factor de creștere studiile noastre au demonstrat existența expresiei ambilor markeri atât în tumori cit și la nivelul vaselor de sânge tumorale, dar cu intensități diferite [rezultate încă nepublicate]. Cea mai mare expresie atât tumoral cit și la nivelul vaselor a fost obținută pt VEGFR1 comparativ cu VEGFR2, de asemenea expresia ambilor receptori a fost mult mai intensă la nivelul celulelor tumorale comparativ cu endoteliul vaselor sanguine tumorale. În următoarea perioadă de timp vom încerca să stabilim eventualele corelații semnificative între nivelul expresiei VEGF în tumora și gradul expresiei receptorilor săi în vasele tumorale, precum între nivelele expresiei acestora și alți parametri clinico-morfologici ai CSO. Existența celor 2 receptori la nivelul endoteliului vascular a fost pusă evidentă încă din 1999 [65]. În celulele nonendoteliale prezenta celor doi receptori a fost descrisă în diferite tipuri de celule tumorale [66], inclusiv în celulele carcinoatoase din CSO ale capului și gâtului [67]. Ceva mai recent Kyzas et al [68] au găsit o corelație puternică între VEGF și VEGFR2 în celulele canceroase ale carcinoamelor scuamoase ale capului și gâtului. În plus ambele proteine au fost înalt exprimate mai ales în tumorile cu un grad mare de proliferare și totodată ele s-au corelat și cu o rată de supraviețuire mică. S-a sugerat prin prisma acestor rezultate că VEGF ar acționa de o manieră autocrină prin intermediul VEGFR2 asupra carcinoamelor scuamoase de la nivelul capului și gâtului și prin urmare astfel de pacienți pot beneficia de tratamentul cu inhibitori ai VEGFR2.

Alți factori proangiogeni investigați de noi au fost IL-8 și receptorul său omolog, FGF2 și receptorul FGF2 beta, EGF și receptorul său complementar. Deocamdată suntem în faza de testări pe martori și țesut tumoral, urmând ca în scurt timp să obținem câteva rezultate. În literatura de specialitate se știe foarte puțin despre expresia unor astfel de markeri la nivelul mucoasei orale și a CSO [8, 70-77].

Activitatea specifică 2.1. Evaluarea microdensității vaselor de limfatice de novo sau preexistente (MDL) intra- și peritumoral/ superficial și în profunzime în CSO

Au fost testați mai mulți markeri ai celulelor endoteliale limfatice: VEGFC, LIVE1 și D2-40. Cel mai sensibil în identificarea celulelor endoteliale limfatice s-a dovedit a fi D2-40 [78-82]. Studiul expresiei markerului D2-40 la nivelul marginilor de rezecție a CSO a demonstrat utilizând în premiera mondială analiza fractală o creștere a complexității

vaselor limfatice in progresia carcinogeneza orala [79]. 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 [78, 79].

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 intratumorala in ariile profunde, adiacente frontului de invazie este mai degraba inhibata decit indusa [12]. Franchi et al. [64] au consemnat si ei o scadere semnificativa a vaselor limfatice intratumorale din CSO comparativ cu tesutul peritumoral. Padera et al. [65] 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 [79]. 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.

Activitatea specifica 2.2. Evaluarea gradului de implicare a factorilor pro- si anti-limfangiogeni in CSO

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 suprfata fata de cele profunde. In plus am consemnat o reactie mai intensa indeosebi in ariile adiacente stromei inflamatorii. Sedivy et al. [85] 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.

Alt factor prolimfangiogen aflat in faza de testare este FGF, urmand sa obtinem in scurt timp rezultate in ceea ce priveste gradul expresiei sale la nivelul tesutului tumoral in corelatie cu nivelul expresiei D2-40. In literatura de speialitate, Ali [86] 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.

Mentionam faptul ca suntem in faza de testare a VEGFR3 pe martori si tesut tumoral, urmand sa investigam gradul de expresie al acestui receptor la nivelul celulelor tumorale si apoi la nivelul vaselor limfatice. De asemenea vom incerca sa stabilim corelatii intre gradul expresiei sale si alti parametrii clinico-patologici. In acest sens Neuchrist et al [87] si Tanigaki et al [88] au demonstrat rolul important jucat de VEGFR3 in limfangiogeneza, progresia si metastazarea in cancrelor de la nivelul capului si gatului.

Obiectivul 3. Obținerea de rezultate parțiale ale cercetării și diseminarea

Acest obiectiv a fost atins prin publicare a doua articole in extenso in reviste cotate in baze de date internationale tintite pe obiectivele proiectului si a inca unuia in revista J Histochem Cytochem, cotate ISI in care am abordat conex si angiogeneza orala, avand chiar imagini demonstrative pe aceasta topica. Obiectivul a fost indeplinit prin publicare acestora in revista cotate ISI- Romanian Journal of Morphology and Embryology, la care s-au mai adaugat și alte articole și comunicări, participări la conferințe naționale și internaționale. Conducatorul și membrii echipei au publicat:

Articole:

1) C. Margaritescu, M. Raica, D. Pirici, C Simionescu, L Mogoanta, A. Stinga, A. Stinga, D. Ribatti Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. J Morphol Embryol. 2009;50(4) in press.

2) C. Margaritescu, D. Pirici, A. Stinga, C Simionescu, L Mogoanta, A. Stinga, A. Stepan. VEGF expression and their correlation with angiogenesis in oral squamous cell carcinomas (OSCC): an immunohistochemical and morphometrical study. J Morphol Embryol. 2009;50(4) in press.

3) Pirici D, Mogoanta L, Kumar-Singh S, Pirici I, Margaritescu C, Simionescu C, Stanescu R. Antibody elution method for multiple immunohistochemistry on primary antibodies raised in the same species and of the same subtype. J Histochem Cytochem. 2009 Jun;57(6):567-75. Epub 2009 Feb 16.

Cursuri-lector

1) Lector si chairman la simpozionul international- ANGIOGENESIS: PRESENT AND FUTURE Romania, Timisoara, March, 26 - 28, 2009

2) Lector la Curs- in presimpozion la Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009 cu topica: Aspecte ale angiogenezei in carcinoamele scuamoase orale. Curs- in presimpozion: Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009.

Rezumate la conferinte

1) Cl Margaritescu, C Simionescu, R. Ciurea, D. Pirici, A. Stepan. Morfologia vaselor sanguine din carcinoamele scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009.pp95

2) R. Ciurea, C. Margaritescu, C. Simionescu, A. Stepan, D. Pirici. Rolul mastocitelor in angiogeneza carcinoamelor scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp20

3) A. Stinga, C. Margaritescu, A. Stinga, C. Simionescu, D. Pirici, A. Stepan. Eprezia VEGF in carcinoamele scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp32

4) A. Stinga, C. Margaritescu, A. Stinga, C. Simionescu, D. Pirici, A. Stepan. Eprezia D2-40 in carcinoamele scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp33

5) Margaritescu Claudiu, Simionescu Cristiana, Pirici Daniel, Mogoanta Laurentiu, Stepan Alex, Ciurea Raluca (Craiova, Romania) - Morphology of tumor vessels in oral squamous cell carcinoma. Immunohistochemical and immunofluorescence study. Angiogenesis: present and future. Timisoara, March 26-28, 2009. pp43

6) Margaritescu Claudiu, Marius Raica, Alina Stinga, Cristiana Simionescu, Laurentiu Mogoanta, Alin Stinga, Daniel Pirici, Ciurea Raluca, Stepan Alex, (Craiova, Romania). Podoplanin expression in oral structures: immunohistochemical and immunofluorescence study. Angiogenesis: present and future. Timisoara, March 26-28, 2009. pp55

7) Cl. Margaritescu, Alina Stinga, Cristiana Simionescu, L.Mogoanta, A. Stinga, D. Pirici, Raluca Ciurea, A. Stepan Expresia podoplaninei la nivelul structurilor mucoasei orale: studiu imunohistochimic și imunofluorescent UMF Craiova. Congresul National Zilele Medicinii Dentare Craiovene, CRAIOVA, 25-28 MARTIE 2009. pp86-88

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. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2008, 49(4):447-458.
19. **C. Margaritescu**, D. Pirici, A. Stinga, C Simionescu, L Mogoanta, A. Stinga, A. Stepan. VEGF expression and their correlation with angiogenesis in oral squamous cell carcinomas (OSCC): an immunohistochemical and morphometrical study. *J Morphol Embryol.* 2009;50(4) in press.
20. **C. Margaritescu**, M. Raica, D. Pirici, C Simionescu, L Mogoanta, A. Stinga, A. Stinga, D. Ribatti Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an imunohistochemical and fractal analysis study. *J Morphol Embryol.* 2009;50(4) in press.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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
25. Salven P, Heikkila 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.
26. 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.
27. 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
28. 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
29. 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.
30. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, et al. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22:248-253.
31. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, et al. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2003;10:220-227.
32. Schimming R, Marme D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002; 24:151-156.
33. 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.
34. 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.
35. 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.

36. 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.
37. 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.
38. 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 Journees Medicales Balkaniques, 12-14 sept Craiova, Roumanie, 2007: 8-9
39. 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.
40. A. Stinga, **C. Margaritescu**, A. Stinga, C. Simionescu, D. Pirici, A. Stepan. Epresia VEGF in carcinoamele scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp32
41. R. Ciurea, C. Margaritescu, C. Simionescu, A. Stepan, D. Pirici. Rolul mastocitelor in angiogeneza carcinoamelor scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp20
42. Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Júnior AP, Alencar Rde C, Bittar GO, Silva TA, Batista AC. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol*. 2009 Apr;24(4):457-65.
43. Iamaroon A, Pongsiriwet S, Jittidecharaks S, Pattanaporn K, Prapayasatok S, Wanachantararak S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2003 Apr;32(4):195-9
44. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, Leles CR, Mendonça FE, Batista AC. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol*. 2007 May;43(5):484-90.
45. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007;36(3):263-6.
46. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med*. 2001;30(8):449-57.
47. Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(6):2272-84.
48. Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1175-9.
49. Joo YH, Jung CK, Kim MS, Sun DI. Relationship between vascular endothelial growth factor and Notch1 expression and lymphatic metastasis in tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140(4):512-8
50. Kim SH, Cho NH, Kim K, Lee JS, Koo BS, Kim JH, Chang JH, Choi EC. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol*. 2006;93(4):330-7.
51. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol*. 2004;40(9):941-7.
52. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, Fuchihata H. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol*. 1998;51(10):771-5.
53. Shang ZJ, Li JR. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. *J Oral Pathol Med* 2005;34:134-9.
54. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:13-20.
55. Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18:2046-52.

56. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S, Inokuchi T. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004;40(3):321-5.
57. Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Shin DM. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2821-8.
58. Li C, Shintani S, Terakado N, Klosek SK, Ishikawa T, Nakashiro K, Hamakawa H. 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;34(5):559-65
59. Shao Z, Zhang WF, Chen XM, Shang ZJ. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral Oncol.* 2008;44(12):1110-7.
60. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis LM. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech.* 2003;60:199-207.
61. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997;33(5):369-74.
62. Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM, Huang CC. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol.* 2006;94(5):413-7.
63. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2002;33(7):708-14.
64. Mineta H, Miura K, Ogino T, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Suzuki I, Dictor M, Borg A, Wennerberg J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2000;83(6):775-81.
65. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.
66. 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.
67. Lalla RV, Boisoeneau 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.
68. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol.* 2005;18(4):485-94.
69. Chiang YY, Tsai MH, Lin TY, Chiang IP. Expression profile of metastasis-related genes in invasive oral cancers. *Histol Histopathol.* 2008 Oct;23(10):1213-22.
70. Dellacono FR, Spiro J, Eisma R, Kreutzer D. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors by head and neck squamous carcinoma tumor and vascular endothelial cells. *Am J Surg.* 1997;174(5):540-4.
71. Hasina R, Whipple ME, Martin LE, Kuo WP, Ohno-Machado L, Lingen MW. Angiogenic heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma: biological and therapeutic implications. *Lab Invest.* 2008;88(4):342-53.
72. Hofman P, Butori C, Havet K, Hofman V, Selva E, Guevara N, Santini J, Van Obberghen-Schilling E.
73. Janot F, el-Naggar AK, Morrison RS, Liu TJ, Taylor DL, Clayman GL. Expression of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with degree of histologic differentiation. *Int J Cancer.* 1995;64(2):117-23.
74. Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM, Gutkind JS. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res.* 2008;68(12):4525-30.
75. Prognostic significance of cortactin levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status. *Br J Cancer.* 2008;98(5):956-64.
76. Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer.* 2007;96(3):408-16
77. Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol.* 2006;1:11.

78. 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 Journees Medicales Balkaniques, 12-14 sept Craiova, Roumanie, 2007: 9.
79. C. Margaritescu, M. Raica, D. Pirici, C Simionescu, L Mogoanta, A. Stinga, A. Stinga, D. Ribatti Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an imunohistochemical and fractal analysis study. *J Morphol Embryol.* 2009;50(4) in press.
80. A. Stinga, C. Margaritescu, A. Stinga, C. Simionescu, D. Pirici, A. Stepan. Epresia D2-40 in carcinoamele scuamoase orale. Cel de al VIII-lea Simpozion National al Societatii Romane de Morfologie, Craiova, 26-30 Mai 2009. pp33
81. Margaritescu Claudiu, Marius Raica, Alina Stinga, Cristiana Simionescu, Laurentiu Mogoanta, Alin Stinga, Daniel Pirici, Ciurea Raluca, Stepan Alex, (Craiova, Romania). Podoplanin expression in oral structures: immunohistochemical and immunofluorescence study. *Angiogenesis: present and future.* Timisoara, March 26-28, 2009. pp55
82. Cl. Margaritescu, Alina Stinga, Cristiana Simionescu, L.Mogoanta, A. Stinga, D. Pirici, Raluca Ciurea, A. Stepan Expresia podoplaninei la nivelul structurilor mucoasei orale: studiu imunohistochimic și imunofluorescent UMF Craiova. *Congresul National Zilele Medicinii Dentare Craiovene, CRAIOVA, 25-28 MARTIE 2009.* pp86-88
83. 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.
84. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883–6.
85. 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.
86. Ali MA. Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract.* 2008;17(6):486-92.
87. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck.* 2003 Jun;25(6):464-74.
88. Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 2004 Sep;14(3):389-95.