



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DENSIDADE DE MASTÓCITOS E MICRODENSIDADE VASCULAR
EM DISPLASIAS EPITELIAIS E CARCINOMAS ORAIS**

RENATA OLIVEIRA DE SOUZA

Salvador-Bahia-Brasil

2012



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DENSIDADE DE MASTÓCITOS E MICRODENSIDADE VASCULAR
EM DISPLASIAS EPITELIAIS CARCINOMAS ORAIS**

RENATA OLIVEIRA DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-graduação em Patologia
Humana, como pré-requisito obrigatório para
obtenção do grau de Mestre.

Salvador-Bahia-Brasil

2012

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

S719d Souza, Renata Oliveira de
Densidade de mastócitos e microdensidade vascular em displasias epiteliais e carcinomas orais [manuscrito]. / Renata Oliveira de Souza. - 2012.
84 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2012.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos. Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. Angiogênese. 2. Mastócitos. 3. Neoplasias Bucais.
4. Imunohistoquímica.

I. Título.

CDU 616.31-006

“DENSIDADE DE MASTÓCITOS E MICRODENSIDADE VASCULAR EM DISPLASIAS
EPITELIAIS E CARCINOMAS ORAIS.”

RENATA OLIVEIRA DE SOUZA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Leonardo de Souza Kruschewsky
Médico
Hospital Aristides Maltez



Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor Associado
UFBA



Dr. Eduardo Antônio G. Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dedicatória

Aos meus pais, por sempre me apoiarem, incentivarem os meus sonhos, por mais complexos e sem sentido que eles pareçam, e por me fazerem feliz. Vocês são meus maiores exemplos e alicerces. Amo vocês!

A minha querida tia Edilza, pela dedicação, carinho e por acreditar em mim. O que seria de mim sem você? Amo-te incondicionalmente!

À Lory, pelo incentivo e conselhos, os quais me fazem crescer muito. Tenho muito orgulho em ser sua irmã!

As minhas avós, pelo exemplo de força e dedicação.

Ao meu orientador, aprendi a ser mais generosa, humana e, acima de tudo, a querer buscar sempre o conhecimento. Admiro-o muito pelo grandioso profissional e pelo belo ser humano que é. Sou muito grata por tudo que me ensinou e pela paciência que teve comigo. Obrigada!

À Clarissa Gurgel, antes de tudo, uma grande amiga. Esteve ao meu lado desde o início da minha vida científica e virou para mim um exemplo a ser seguido. Obrigada pelos sábios conselhos e por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu não sabia que ele existia.

Agradecimentos Especiais

À **Caroline Schlaepfer**, minha grande amiga e colega de mestrado, juntas desde a graduação. O que seria não só deste trabalho, mas da minha carreira científica sem você? Um completo desespero. Muito obrigada por tudo que me ensinou e por me ajudar nos momentos mais difíceis.

Ao querido professor Dr. Jean Nunes dos Santos, pela oportunidade de iniciar meus passos na patologia e por me ajudar a ingressar na FIOCRUZ, sem falar nos incontáveis momentos agradáveis. Sou muito grata a você!

Ao Dr. Fernando Soares, obrigada por permitir o grande aprendizado e prazerosa execução dos meus experimentos no Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer AC Camargo.

À **querida Dra. Marcilei Buim**, pela dedicação e contribuição à pesquisa científica neste país. Por ter tornado os momentos de angústia em emocionante e prazerosa execução dos meus experimentos no Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer AC Camargo. Minha eterna gratidão!

Agradecimentos

Aos meus familiares, pelo apoio, confiança e carinho. Vocês foram e são importantes na minha construção.

Aos meus maravilhosos amigos, especialmente Alineide, Carol Almeida, Carol Schlaepfer, Carolzinha, Déa, Diba, Fabi, Iane, Iris, Kiko, Lari, Lila, Ló, Mari, Paula, Poli, Saminha, Thay e Tami pelos sorrisos, lágrimas e inesquecíveis momentos de felicidade. Compartilhar cada momento da minha vida com vocês me torna a pessoa mais feliz desse mundo. Obrigada por compreenderem a minha ausência em muitos momentos. Amo cada um de vocês!

Aos colegas de mestrado, ter conhecido vocês foi o maior presente deste curso, sem dúvidas. Os meus dias foram muito mais felizes com vocês ao meu lado. Obrigada por todos os momentos alegres compartilhados!

À Ana Carvalho, pela enriquecedora contribuição científica nos momentos de dificuldade da rotina laboratorial e pelos momentos de descontração.

À Cristina Mota, pelo auxílio nos momentos de dúvidas acerca das técnicas executadas.

Ao Serviço de Histotecnologia, especialmente Cláudia Lutz, pela imensa colaboração com o preparo, coloração e leitura das lâminas utilizadas neste trabalho.

À Luana Palma, pela imensa ajuda com a análise de parte dos resultados.

À Tanira Bastos, pela paciência e grande auxílio durante os experimentos da disciplina de Patologia.

À Mariana Barrêto pela ajuda nos inúmeros momentos de dificuldade e falta de tempo.

Aos Professores da Pós-Graduação em Patologia Humana, pela belíssima dedicação ao curso.

Ao LPBM, por me permitir fazer parte deste laboratório.

A todos do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer AC Camargo, Obrigada pelo acolhimento no período em que estive no laboratório.

À toda equipe da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da UFBA, em especial ao Prof. Roberto Azevedo e Dr. Bráulio Carneiro pela imensa contribuição na obtenção das mucosas normais que fariam parte deste trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da UFBA, por contribuírem imensamente na minha formação profissional.

A todas as bolsistas de Iniciação Científica, Nanda, Lai, Lud, Manu e Bárbara pelo aprendizado e pelos bons momentos que passamos juntas.

À Coordenação de Ensino, em especial Tauar e Flávia, por facilitarem a minha vida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização do mestrado.

À FAPESB, pelo financiamento deste projeto.

Ao CPqGM, por contribuir para o avanço científico do nosso país e do mundo.

Introdução/Objetivo: Os tumores malignos orais representam 5% de todos os cânceres humanos e o carcinoma escamocelular oral (CECO) corresponde a 90% destes casos. Sabe-se que as pessoas acometidas por displasia epitelial oral (DEO) apresentam um maior risco de desenvolver CECO. A angiogênese está associada à iniciação e progressão neoplásica, sendo o início da neovascularização em DEOs um pré-requisito para a formação do tumor. Na angiogênese, destacam-se os mastócitos, responsáveis por estimular e manter a formação da rede vascular em determinadas doenças, inclusive displasias e neoplasias. Estas células liberam fatores que estimulam a angiogênese, como o VEGF. Assim, este estudo se propôs a avaliar o papel dos mastócitos na angiogênese de DEO e CECO, considerando parâmetros clínicos e morfológicos, comparando-os entre si. **Metodologia:** Quatorze DEOs e 56 CECOs, dispostos em lâminas convencionais e de *tissue microarray* (TMA), respectivamente, provenientes do Hospital AC Camargo, foram imunomarcadas para os anticorpos anti-CD34, anti-VEGF-A e anti-*Mast cell tryptase*, os três primeiros através do sistema EnVision Advance™ (Dako Corporation, Carpinteria, USA) e o último através do sistema Histofine (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan). A microdensidade vascular (MDV - vasos/mm²) foi estabelecida através da determinação do número de vasos marcados para CD34 em cinco áreas de *hot spot*; a expressão de VEGF-A foi determinada pelo escore imuno-histoquímico (EI) estabelecido por Sinicrope et al. (1995); finalmente, a densidade da mastócitos (DM – células/ mm²) foi determinada através do número de células contadas em cinco áreas de *hot spot*. **Resultados/Conclusões:** A DM não apresentou relação com parâmetros clínicos e morfológicos em DEOs e CECOs, não existindo diferença na atividade exercida por Ms granulados e degranulados (p=0,18 e p= 0,1439, respectivamente; Teste de Mann-Whitney). A DM foi significativamente maior entre os casos de DEO quando comparadas aos carcinomas (p=0,01; Teste de Mann-Whitney), o que parece envolver a ação das células neoplásicas infiltrantes na regulação negativa do número de Ms nestes tumores. A MDV, nos casos de DEO e CECOs, não esteve associada aos parâmetros clínicos e morfológicos das mesmas, possivelmente sugerindo que a densidade de vasos não contribui de maneira independente para a progressão e comportamento biológico destas lesões. Os casos de DEO apresentaram MDV significativamente maior em relação aos CECOs (p= 0,0003, Teste de Mann-Whitney), sugerindo-se como possível causa uma subanálise dos vasos nas lâminas de TMA. A expressão de VEGF, no epitélio e lâmina própria, não esteve relacionada aos parâmetros clínicos e histológicos em DEOs e CECOs, tampouco à progressão de DEO para CECO, uma vez que os maiores EI foram encontrados em CECO bem diferenciado, seguido de DEO moderada, CECO moderadamente diferenciado e DEO discreta. A DM (granulados e degranulados) não estava correlacionada à MDV, o que provavelmente aponta para a atuação destas células, de maneira mais expressiva, em outros cânceres. Também não existiu correlação significativa entre a DM, granulado e degranulado, e expressão de VEGF nestas duas lesões, o que provavelmente demonstra que não há participação expressiva dos Ms na produção desta citocina. Por fim, existiu associação entre a expressão de VEGF por células tumorais e MDV (r= 0,39, p= 0,0299, Teste de Spearman), o que parece demonstrar uma maior propensão das células tumorais infiltrantes para exercerem atividade sobre o desenvolvimento da MDV em CECOs.

Abstract

Introduction/Objective: Malignant tumors located in oral cavity represent 5% of all human cancers and oral squamous cell carcinomas (OSCC) correspond to 90% of these cases. One knows that people suffering from oral epithelial dysplasia (OED) have an increased risk to develop OSCC. Angiogenesis is associated with neoplastic initiation and progression, and neovascularization in dysplastic lesions is a pre-requisite to tumor formation. The mast cells (Ms) are well know for stimulating and maintaining the vascular network formation in certain diseases, including dysplasias and neoplasms. These cells release factors that stimulate angiogenesis such as VEGF. Thus, this study objective was to evaluate the role of mast cell in OED and OSCC angiogenesis, taking into account clinical and morphological parameters, and compared with each other. **Methods:** After approval by the REC (229/10), 14 OED and 56 OSCC, from the AC Carmargo Hospital, were immunostaining for anti-CD34, anti-VEGF-A and anti-mast cell tryptase, the first three using ENVISION ADVANCE™ SYSTEM (Dako Corporation, Carpinteria, USA) and last one through thae Histofine system (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan). The vascular microdensity (VMD – vessel/mm²) was established by determining the number of vessels stained for anti-CD34 score in five hot spots areas; the expression of anti-VEGF-A was found according to the established by Sinicrope et al. (1995), immunohistochemical score (IS); and finally the mast cells density (MD – cell/mm²) was determined by counting the number of cells in five hot spot areas. **Results/Conclusions:** The MD was not associated with clinical and morphological parameters in OED e OSCC, with no difference in the activity carried on by granulated and degranulated Ms (p= 0.18 and p= 0.1439, respectively, Mann-Whitney test). The MD was significantly higher among cases of OED (p= 0.01, Mann-whitney test), which seems to involve the action of the infiltrating neoplastic cells in regulating the number of Ms in these tumors. VMD was not associated with clinical and morphological parameters of OED and OSCC, showing that blood vessels density does not contribute independently to the progression and biological behavior of this lesions. The cases of OED had VMD higher compared to the OSCC (p= 0.0003, Mann-Whitney test), which may be associated with a subanalysis of vessels in the TMA slides. The expression of VEGF, in the epithelium and lamina propria, was not related to clinical and histological parameters in OED e OSCC, nor the progress of OED to OSCC, since the highest immunohistochemical score (IE) were found in well-differentiated OSCC, followed by moderate OED, moderately differentiated OSCC and discrete OED. The MD (granulated and degranulated) was not correlated with DMV, which shows the presence of these cells being more important in other cancers. Also, there was no significant correlation between MD, granulated and degranulated, and VEGF expression in these two lesions, which probably shows that there is no significant participation of Ms in the production this cytokine. Finally, there were association between expression of VEGF by tumoral cells and VMD in OSCC (r= 0.39, p=0.0299, Spearman test), which seems to show a greater propensity of infiltrative tumor cells to exert its activity on the development of MDV in OSCC.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Unidade de valor percentual
µm	Unidade de medida de tamanho micrômetro
°C	Unidade de medida de temperatura graus Celsius
AA1	Clone do anticorpo anti-mast cell triptase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CECO	Carcinoma escamocelular oral
CECOs	Carcinomas escamocelulares orais
CD34	Refere-se ao antígeno CD34 ou anticorpo de mesmo nome
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DEO	Displasia epitelial oral
DEOs	Displasias epiteliais orais
DNA	Do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucléico
DM	Densidade de mastócitos
DP	Desvio padrão
et al.	Colaboradores
EI	Escore imuno-histoquímico
Epcm	Escore do percentual de células marcadas
Eim	Escore da intensidade da marcação
Flt-1	Refere-se ao receptor da citocina VEGF-A (<i>c-fms-like tyrosine kinase</i>)
Flk-1	Refere-se ao receptor da citocina VEGF-A (<i>Fetal liver kinase-1</i>)
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
HPV	Vírus do papiloma humano
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-3	Interleucina 3
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-8	Interleucina 8
IFN- γ	Interferon gama
Inc	<i>Incorporation</i>
IS	Do inglês, <i>Immunohistochemical score</i>
LSAB	<i>Labelled Streptoavidin Biotin</i>
MT	Mastócitos que possuem apenas a proteína triptase em seu interior
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MVD	Microdensidade vascular
<i>Mast cell tryptase</i>	Antígeno ou anticorpo para mastócitos triptase
mm ²	Unidade de medida de tamanho milímetro quadrado
NO	Óxido nítrico
n	Número de indivíduos
NGF	Fator de crescimento neural
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Do inglês “ <i>Phosphated buffered solution</i> ”, traduzido como solução salina fosfatada
p	Refere-se a propabilidade ou variabilidade amostral
QBEnd 10	Clone do anticorpo anti-CD34
r	Coefficiente de correlação
TMA	Refere-se às lâminas de <i>tissue microarray</i> (microarranjos de tecido)
TNM	Do inglês <i>Tumor lymphonodes metastasis</i>
TGF- β	Fator de crescimento transformante β

Tris/EDTA	Solução de Tris-hidroximetil-aminometano e Ácido etileno diaminotetracético
USA	Do inglês “ <i>United States of America</i> ”, traduzido como Estados Unidos da América
VEGF ₁₂₁	Refere-se à isoforma de VEGF originada de splicing alternativo com 121 aminoácidos
VEGF ₁₆₅	Refere-se à isoforma de VEGF originada de splicing alternativo com 165 aminoácidos
VEGF ₁₈₉	Refere-se à isoforma de VEGF originada de splicing alternativo com 189 aminoácidos
VEGF ₂₀₆	Refere-se à isoforma de VEGF originada de splicing alternativo com 206 aminoácidos
VG1	Clone do anticorpo anti-VEGF A
X	Sinal matemático de multiplicação

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Representação esquemática da angiogênese tumoral. (A) Latência (B) Destaque de células perivasculares e dilatação vascular (C) Formação dos brotos angiogênicos (D) Formação de novos vasos e maturação: recrutamento de células perivasculares (E) Rede vascular tumoral. Fonte: Adaptado de Bergers; Benjamin (2003).	24
Figura 2. Representação esquemática do provável papel do aumento do número de mastócitos no estroma tumoral. (A) Secreção seletiva de moléculas benéficas ao tumor (B) Degranulação e liberação de moléculas anti-tumorais. Fonte: Theoharides; Conti (2004).	27
Figura 3. Percentual de células que expressam VEGF-A e EI no epitélio e lâmina própria em DEO	45
Figura 4. Imuno-histoquímica em DEO (100µm). (A), (B) e (C) Presença e <i>status</i> de células mastocitárias em DEO discreta, moderada e intensa, respectivamente. (D) e (F) EI 0 para a proteína VEGF em DEO discreta e intensa, respectivamente; (E) Imunomarcagem de VEGF no citoplasma de células endoteliais em DEO moderada (Seta). (G), (H) e (I) CD34. Presença de vasos imunomarcados por CD34 em DEO discreta, moderada e intensa, respectivamente (Seta).	47
Figura 5. Comparação da densidade de mastócitos granulados em lesões de CECO com e sem invasão vascular	49
Figura 6. Percentual de células que expressam VEGF-A e EI no parênquima e estroma de CECO	53
Figura 7. Imuno-histoquímica em CECO (100µm). (A), (B) e (C) Mastócitos. Presença de células mastocitárias predominantemente granuladas em CECO bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. (D) e (E) Imunomarcagem citoplasmática e granular de VEGF em CECO bem diferenciado e moderadamente diferenciado, respectivamente; (F) EI 0 para a proteína VEGF em CECO pouco diferenciado. (G) e (H) e (I) CD34. Presença de vasos imunomarcados para CD34 em CECO bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, respectivamente (Seta).	56
Figura 8. Comparação da microdensidade vascular entre DEO e CECO	57

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Critérios utilizados para a classificação de DEOs	32
Tabela 2. Especificidade, clone, diluição, forma de recuperação antigênica, marca comercial dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas	34
Tabela 3. Aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de pacientes com DEOs	38
Tabela 4. Características clínico-patológicas dos pacientes com CECO primário	40
Tabela 5. Densidade total de mastócitos em DEO.	42
Tabela 6. Densidade de mastócitos em DEO com predomínio de células granuladas e degranuladas	43
Tabela 7. Microdensidade vascular em DEO	44
Tabela 8. Expressão da citocina VEGF-A em DEO	46
Tabela 9. Densidade total de mastócitos em CECO	50
Tabela 10. Microdensidade vascular em CECO	52
Tabela 11. Expressão de VEGF-A em CECO	54

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Displasia epitelial oral (DEO)	18
2.2 Carcinoma escamocelular oral (CECO)	20
2.3 Angiogênese: fisiológica e patológica	22
3 OBJETIVOS E METAS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos específicos/metasp	30
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Considerações Éticas	31
4.2 Casuística	31
4.3 Revisão dos Casos	31
4.3.1 Estudo Imuno-histoquímico	33
4.4 Análise dos Dados	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Aspectos Clínicos e Morfológicos	38
5.2 Resultados Imuno-histoquímicos	41
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas configuram-se como um problema de saúde pública no mundo (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA, 2003), representando a segunda causa de morte na população brasileira (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA, 2009). As neoplasias malignas que acometem os tecidos bucais representam 5% de todos os cânceres humanos (JOHNSON et al., 2005), sendo que o carcinoma escamocelular oral (CECO) corresponde a mais de 90% dos casos diagnosticados em boca (JEMAL et al., 2011) e representa o sexto tumor mais freqüente na população mundial (KASHIWAZAKI et al., 2008). Particularmente no Brasil, o câncer de boca apresenta uma das maiores taxas mundiais de incidência. Para 2012, foram estimados 14.170 novos casos de câncer de boca, sendo 9.990 para o sexo masculino e 4.180 para o sexo feminino (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA, 2011).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento destas doenças, os impactos na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes ainda não são satisfatórios e muitas vezes são descritos perda da fala, distúrbios na mastigação e deglutição, dores, deformidades físicas e problemas psicológicos (MENDEZ, 2002; CHEN et al., 2008). Estima-se que o CECO está associado a 405.000 novos casos e 211.000 mortes anualmente em todo o mundo (CHEN et al., 2008). Segundo os últimos dados do INCA, este tumor é o quarto mais freqüente em homens e o oitavo entre as mulheres da região nordeste (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA, 2011).

O desenvolvimento do CECO pode estar associado à presença de lesões pré-malignas clinicamente denominadas leucoplasias e eritroplasias (NEVILLE; DAY, 2002; GALE et al., 2005; SPEIGHT, 2007; WANG et al., 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (GALE et al, 2005) define leucoplasias e eritroplasias orais, respectivamente, como placas brancas e vermelhas que não podem ser caracterizadas como qualquer outra doença que acomete os tecidos bucais. Estas lesões são geralmente caracterizadas histologicamente por displasia, principalmente de alto grau de malignidade. Para alguns autores, o risco de desenvolver CECO é de oito a dez vezes maior em pessoas que apresentam displasia epitelial oral (DEO) (LEE et al., 2000). Entretanto, existem poucos estudos que demonstrem as alterações moleculares envolvidas na progressão de lesões pré-malignas para neoplasias malignas (WANG et al., 2009).

As DEOs, de acordo com a OMS, são caracterizadas histologicamente por alterações citológicas e arquiteturais, que podem acometer o terço inferior, médio ou todas as camadas do epitélio, e que, por sua vez, irão determinar a gradação histológica da lesão em discreta, moderada e intensa (GALE et al., 2005).

A angiogênese tem sido relacionada à transformação, iniciação neoplásicas (HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN, 2002; MENAKURU et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG; 2011) e progressão tumoral (SWELAM et al. 2005; RAICA; CIMPEAN; RIBATTI, 2009; BUTLER; KOBAYASHI; RAFII, 2010; LI et al., 2012), sendo descrita antes mesmo da identificação macroscópica de tumores malignos em modelos experimentais, sugerindo que os eventos angiogênicos são essenciais para a expansão clonal de neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A formação e estabilização da rede vascular tumoral vêm sendo relacionada com a liberação de fatores de crescimento por células mastocitárias (Ms) e determinadas citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BENJAMIN; KESHET, 1997; VALKOVIĆ et al., 2002; DUSE et al., 2011; HANAHAN; WEINBERG; 2011).

Alguns estudos tem tentado elucidar os fatores que possam estar envolvidos na patogênese das DEO e CECO, especialmente aqueles que possam estar relacionados a transformação maligna de uma lesão displásica para tumor “in situ” e invasivo e, desta forma, permitir identificar novos marcadores para o diagnóstico, prognóstico, envolvidos em angiogênese e que possam servir de alvos terapêuticos (WANG et al. 2009).

Os mastócitos tem se destacado como células importantes relacionadas à angiogênese em neoplasias malignas em diferentes regiões do corpo (CHAN et al. 2005) e possivelmente contribuindo para a progressão neoplásica e metástase (MALTBY; KHAZAIE; MCNAGNY, 2009). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a densidade de mastócitos e angiogênese em DEO e CECO, comparando com parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Displasia epitelial oral (DEO)

As displasias caracterizam-se por alterações na citodiferenciação, assim como um desarranjo arquitetural tecidual (GALE et al., 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005), sendo encontradas em lesões descritas clinicamente como pré-malignas, como a eritroplasia, leucoplasia (REIBEL, 2003; GALE et al., 2005; BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006) e sua variante leucoplasia verrucosa proliferativa (EL NAGGAR; REICHART, 2005; BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006), bem como adjacentes aos carcinomas invasivos (WEIJERS et al., 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Outras doenças também podem predispor um indivíduo a desenvolver CECO, como líquen plano oral, fibrose submucosa oral, xeroderma pigmentoso e lúpus eritematoso (EL NAGGAR; REICHART, 2005). Em mais de 75% dos casos, as DEOs têm origem a partir de alterações genéticas promovidas pelo tabaco e álcool (JOHNSON et al., 2005; GALE et al., 2005; KAWAKITA et al., 2011), estando algumas associadas a mutações no gene p53 (BOYLE et al., 1993; HELAL et al., 2011). Ao mesmo tempo, estudos já demonstram a presença do HPV (Vírus do papiloma humano) em lesões orais pré-malignas (MILLER; JOHNSTONE, 2001), levantando a suspeita da possível participação deste vírus no desenvolvimento destas doenças.

Histologicamente, o epitélio de lesões pré-malignas é em geral espesso, porém, clinicamente, a lesão pode apresentar-se atrófica. Quando há displasia, são observadas alterações arquiteturais que são caracterizadas por estratificação epitelial irregular, aumento do número de células no ciclo celular e mitoses atípicas, além de alterações na diferenciação celular, como variação do tamanho nuclear e celular, pleomorfismo celular, presença nucleolar exacerbada, cromatina grosseira e aumento da relação núcleo-citoplasma. De acordo com a distribuição destas alterações no epitélio, as displasias podem ser classificadas em discreta, moderada e intensa. Quando as alterações arquiteturais e citológicas encontram-se no terço inferior, tem-se a displasia discreta. A displasia moderada se caracteriza por apresentar alterações arquiteturais e de diferenciação celular se estendendo ao terço médio do epitélio. Por fim, a displasia intensa ocorre quando alterações histológicas e arquiteturais estão presentes em mais de dois terços do epitélio (GALE et al., 2005), já sendo encontradas

alterações moleculares relacionadas a mutações no gene p53 (BOYLE et al., 1993), responsável pelo reparo do DNA lesado ou indução da apoptose celular (SHAH et al., 2000).

Lesões clínicas denominadas leucoplasias e eritroplasias são as mais fortemente associadas com o desenvolvimento de lesões malignas orais (GALE et al., 2005) e metade dos casos de leucoplasias são caracterizados histologicamente pela presença de displasia epitelial (SPEIGHT, 2007; WANG et al., 2009), aumentando significativamente o risco de transformação maligna nestes casos (WEIJERS et al., 2002). As lesões pré-malignas frequentemente não estão associadas a qualquer sintomatologia (NEVILLE; DAY, 2002), sendo o potencial de malignização da leucoplasia oral evidenciado através da identificação histológica de metaplasia, DEO e, finalmente, carcinoma *in situ* e invasivo (SARANATH, 2000). Os locais preferencialmente acometidos pela leucoplasia são mucosa jugal, língua, gengiva inferior, palato mole, palato duro, assoalho de boca e gengiva superior (LEE et al., 2006).

Apesar de ser a leucoplasia a lesão pré-maligna que mais acomete os tecidos bucais (SILVEIRA et al., 2009), as eritroplasias podem estar associadas à leucoplasia (NEVILLE; DAY, 2002; BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006), determinando uma lesão clinicamente denominada eritroleucoplasia. Esta possui alterações da mucosa de cor branca e vermelha, merecendo esta última mais atenção que as regiões brancas, uma vez que a porção vermelha apresenta, mais frequentemente, alterações displásicas quando comparada às porções brancas (NEVILLE; DAY, 2002), estando associado a um maior risco de progressão para neoplasia maligna (TSANTOULIS et al., 2007; VILLA; VILLA; ABATI, 2011; AMAGASA; YAMASHIRO; UZAWA, 2011). A localização preferencial para os casos de eritroplasia são mucosa lateral e ventral da língua, assoalho de boca, palato mole (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006) e região retromolar (NEVILLE; DAY, 2002). Oitenta por cento das lesões presentes no assoalho de boca de pacientes fumantes e etilistas podem conter áreas focais de carcinoma invasivo no momento da primeira biópsia (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006).

Apesar de se discutir a probabilidade de uma lesão displásica se transformar em maligna, a depender dos seus subtipos (discreta, moderada e intensa), acredita-se que as displasias intensas devem ter início como discretas e uma parcela das displasias moderadas provavelmente progrediram para um estágio mais grave (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING,

2006). Verifica-se que há transformação maligna em 5% das displasias epiteliais associadas à fibrose submucosa em um período de três anos, diminuindo o tempo para dois anos quando a displasia está associada à hiperqueratose ou hiperplasia epitelial (HSUE et al., 2007). Ao mesmo tempo, acredita-se que a localização de uma lesão displásica possui significativa correlação com a sua evolução para neoplasias malignas (NEVILLE; DAY, 2002; LEE et al., 2006), sendo aquelas localizadas em assoalho de boca e borda ventrolateral da língua as de maior risco para o desenvolvimento de CECO (ZHANG et al., 2001; REIBEL et al., 2003), já que estes locais são tidos como os mais permeáveis aos carcinógenos (LESCH et al., 1989; REIBEL et al., 2003). Sabe-se também que tumores cujas margens apresentam displasia discreta ou moderada possuem 50% de chances de recidivar após cinco anos da ressecção cirúrgica (WEIJERS et al., 2002).

Vale ressaltar, entretanto, que nem todas as lesões displásicas irão evoluir para um carcinoma, podendo algumas delas regredir com a remoção do fator etiológico (WEIJERS et al., 2002; REIBEL, 2003).

2.2 Carcinoma escamocelular oral (CECO)

O CECO é uma neoplasia epitelial invasiva com diferentes graus de diferenciação escamosa e propensão para metástases em linfonodos, ocorrendo mais frequentemente em indivíduos etilistas e fumantes (JOHNSON et al., 2005; http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324) entre a quinta e sexta décadas de vida (COWAN et al., 2001; JOHNSON et al., 2005; LEE et al., 2006). Entretanto, vem crescendo a quantidade de estudos que apontam uma forte associação entre infecção pelos subtipos de alto risco dos papilomas virais humanos, principalmente os tipos 16 e 18, e o desenvolvimento de CECO (MILLER; JOHNSTONE, 2001; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). Apenas alguns subtipos de HPV possuem a capacidade de infectar células epiteliais orais e aqueles considerados de baixo risco são capazes de causar somente lesões benignas (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). Estimativas indicam que o HPV é 2 a 3 vezes mais detectado em mucosa oral com lesões pré-malignas e 4,7 vezes mais detectado em CECO quando comparados à mucosa normal (MILLER; JOHNSTONE, 2001). Mesmo assim, a presença do vírus não determina, de maneira obrigatória, o desenvolvimento de lesões malignas, sendo a maioria das infecções por HPV mais transitória que persistente (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). Vale ressaltar que existe efeito sinérgico entre

HPV de alto risco e consumo de álcool, porém este não é potencializado pelo uso concomitante com o tabaco (PANNONE et al., 2011).

Devido ao fato do CECO poder ser precedido por alterações pré-malignas da mucosa oral (NEVILLE; DAY, 2002), acredita-se que estes tumores são precedidos por um estágio de alterações epiteliais displásicas (LEE et al., 2006). Clinicamente, no estágio inicial do seu desenvolvimento, pode apresentar-se apenas como uma úlcera, entretanto sua progressão poderá ocasionar sangramento, perda dentária e até disfagia. (NEVILLE; DAY, 2002). As principais localizações de acometimento na cavidade bucal são língua, mucosa jugal e assoalho de boca (COWAN et al., 2001; WEIJERS et al., 2002; LEE et al., 2006), podendo acometer também outros sítios, como, gengiva e palato duro (JOHNSON et al., 2005).

Histologicamente, o CECO é uma neoplasia maligna epitelial com diferenciação escamosa, frequentemente associada a uma queratinização com variável formação de pérola córnea e/ou tonofilamentos, e crescimento invasivo. A invasão ocorre por ruptura da membrana basal e extensão da lesão ao tecido subjacente, sendo a infiltração angiolinfática e perineural sinais adicionais de malignidade. De acordo com as suas características histológicas, os tumores são classificados como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os primeiros apresentam menor número de células atípicas e freqüente formação de pérola córnea e/ou tonofilamento. As neoplasias moderadamente diferenciadas possuem atipias celulares, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica mais intensa que os CECOs bem diferenciados, incluindo mitoses anormais, bem como menor queratinização. Por outro lado, os CECOs pouco diferenciados apresentam predomínio de células imaturas e atípicas, numerosas mitoses, típicas e atípicas, e mínima queratinização (JOHNSON et al., 2005).

Entre as alterações moleculares que podem ser encontradas em CECOs, pode-se citar as mutações no gene p53 e a perda de heterozigosidade, fortemente associadas ao uso do tabaco, de maneira isolada ou associado ao álcool (BOYLE et al., 1993; NAWROZ et al., 1994; BRENNAN et al., 1995), facilitando o acúmulo de eventos genéticos neste tipo de carcinoma (NAWROZ et al., 1994). Apesar das mutações no gene p53 estarem presentes também em tumores não associados ao uso de tabaco (HELAL et al., 2011), o hábito de fumar aumenta três vezes mais o risco de mutações neste gene naqueles pacientes fumantes e etilistas quando comparados àqueles que não possuem estes hábitos (BRENNAN et al.,

1995). Em relação às alterações cromossômicas presente nestes tumores, estudos demonstraram perda de heterozigotidade em um ou mais loci dos cromossomos 3p, 9p, 11q, 13q e 17p, principalmente (ISHWAD et al., 1996; NAWROZ et al., 1994), estando estas anomalias relacionadas à tumorigênese dos CECOs (ISHWAD et al., 1996).

Apesar de inúmeros estudos envolvendo CECO, o tratamento para esta doença ainda traz diminuição da qualidade de vida dos pacientes pelo surgimento de problemas associados à dificuldade de alimentação, xerostomia, mucosite, disfagia e alteração da voz (NEVILLE; DAY, 2002), sendo os CECOs não associados ao HPV menos responsivos a drogas anti-neoplásicas. Entretanto, pacientes portadores de CECO associados ao HPV possuem uma maior sobrevida e menores taxas de recorrência, sendo o tratamento de escolha a remoção cirúrgica associada à radio-quimioterapia ou apenas radio-quimioterapia (PANNONE et al., 2011).

2.3 Angiogênese: fisiológica e patológica

Os vasos sanguíneos formam-se através de dois processos: vasculogênese, a qual se dá pelo estabelecimento de uma rede vascular primitiva durante o desenvolvimento embrionário a partir de células precursoras endoteliais, denominadas angioblastos; e angiogênese ou neovascularização, em que vasos sanguíneos preexistentes emitem botões capilares, produzindo novos vasos (SHIMA et al. 1995; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2002). Desta forma, o desenvolvimento de vasos sanguíneos é um fenômeno complexo resultante de uma seqüência de eventos envolvendo a dissolução da membrana basal, migração de células endoteliais, proliferação, formação luminal e anastomoses com outros vasos (SHIMA et al. 1995).

Geralmente, os vasos são quiescentes em tecidos adultos e, dessa forma, a angiogênese é relativamente rara, ocorrendo predominantemente em processos cicatriciais, durante o ciclo menstrual feminino e na gravidez (BERGERS; BENJAMIN, 2003; BERGERS; SONG, 2005). Entretanto, a angiogênese patológica pode ocorrer e está relacionada a condições de crescimento tumoral, retinopatia diabética (BERGERS; SONG, 2005), artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais, endometriose, entre outras (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003).

A diferença entre angiogênese fisiológica e patológica reside na regulação de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (VALKOVIĆ et al., 2002; BERGERS; SONG, 2005) que podem sofrer influências de determinados oncogenes (BERGERS; BENJAMIN, 2003). Na angiogênese fisiológica, os vasos neoformados rapidamente se tornam maduros, estáveis e cessam a proliferação; já em condições patológicas, o balanço entre reguladores positivos e negativos é perdido. Assim, os vasos formados em condições patológicas encontram-se em constante reconstrução (BERGERS; SONG, 2005), gerando um sistema vascular aberrante (Figura 1) (ABRAMSSON et al. 2002; BERGERS; BENJAMIN, 2003; BERGERS; SONG, 2005). Características importantes encontradas nestes vasos são ainda: fluxo sanguíneo alterado, aumento da permeabilidade e atraso na maturação. Enquanto a densidade dos vasos normais é dada pelas necessidades metabólicas de nutrientes e oxigênio, a anormalidade funcional e estrutural dos vasos tumorais é dada pela natureza patológica da sua indução (BERGERS; BENJAMIN, 2003), sendo que a expansão tumoral pode estar associada a uma contínua formação e remodelamento de novos vasos (BENJAMIN; KESHET, 1997).

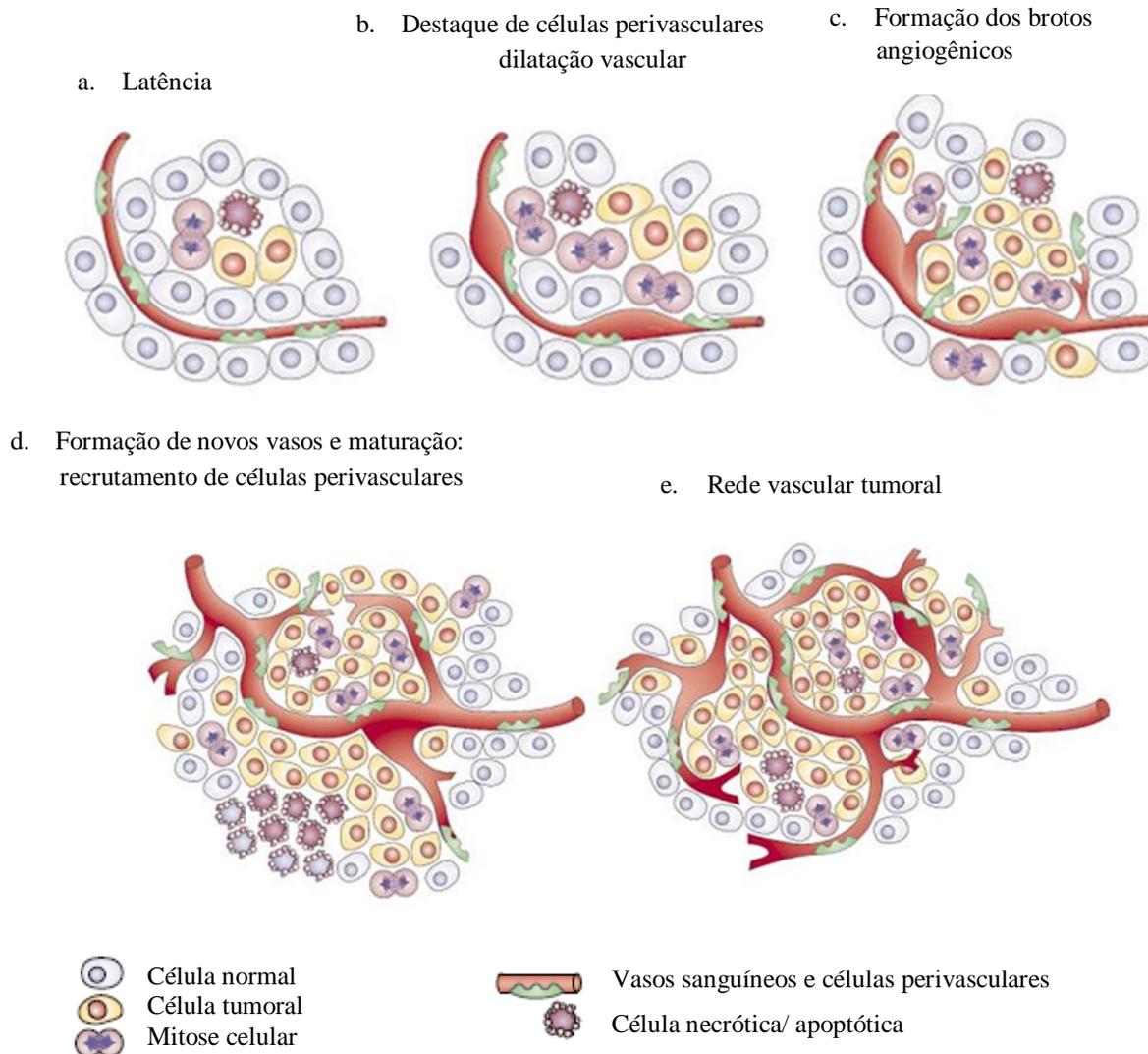


Figura 1. Angiogênese tumoral. Alguns tumores desenvolvem-se como nódulos avasculares (latentes) (a) até atingirem um estado de equilíbrio entre proliferação e morte celular. A angiogênese tumoral começa com o destaque das células perivasculares e dilatação vascular (b), seguida da formação de brotos vasculares (c), formação de novos vasos e maturação, e o recrutamento de células perivasculares (d). A formação dos vasos sanguíneos irá ocorrer com o crescimento do tumor, principalmente em resposta à hipóxia e áreas necróticas tumorais no intuito de oferecer nutrientes e oxigênio (e). Fonte: BERGERS; BENJAMIN (2003).

Através da rede vascular, o oxigênio e nutrientes são disponibilizados para as células neoplásicas (VAUPEL; KALLINOWSKI; OKUNIEFF, 1989; DENCKAM, 1993; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005), sendo assim, a formação de vasos sanguíneos é um processo fundamental na manutenção, progressão e metástase tumoral (DENCKAM, 1993; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005; MURDOCH et al., 2008), sendo iniciada em estágios precoces do processo de malignização (GANDOLFO et al, 2011). Acredita-se, portanto, que o início da vascularização em lesões displásicas seja um fator essencial para a formação do tumor (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

Diversas etapas são necessárias para o desenvolvimento de um novo vaso capilar durante a angiogênese, bem como sua estabilização e maturação, sendo todas as etapas envolvidas neste processo controladas por fatores de crescimento, citocinas e determinadas células, como as mastocitárias (Ms) (VAUPEL; KALLINOWSKI; OKUNIEFF, 1989; DENCKAMP, 1993; GERHARDT; BETSHOLTZ 2003; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005; BERGERS; SONG, 2005; DUSE et al., 2011).

Os Ms originam-se de precursores celulares pluripotentes da medula óssea, os quais atingem seu maior grau de maturação nos tecidos periféricos (KOBAYASHI; ISHIZUKA; OKAYAMA, 2000; JANEWAY JUNIOR et al. 2005) e, quando ativadas, estas células liberam grânulos contendo substâncias que afetam a permeabilidade vascular (JANEWAY JUNIOR et al. 2005), bem como estimulam a angiogênese (ELPEK et al. 2001; IAMAROON et al., 2003; MOHTASHAM et al., 2010, DUSE et al., 2011). Presentes em quase todos os tecidos humanos, estas células têm sido implicadas na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas (FUKUSHIMA et al. 2006), alergias (JANSSES et al. 2005; HENZ et al. 2007) e também tumores (BENÍTEZ-BRIBIESCA et al. 2001; MOHTASHAM et al., 2010; PITTONI et al., 2011).

Os mastócitos são células amplamente distribuídas nos tecidos. São encontradas principalmente próximas aos vasos sanguíneos e nervos e em áreas subepiteliais. O citoplasma destas células contém grânulos ligados à membrana que possuem vários mediadores biologicamente ativos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; JANEWAY JUNIOR al. 2005). As células mastocitárias humanas são divididas em 2 subtipos: Ms da pele (derme), que possuem triptase e quimase (MTQ) em seu interior e mastócitos da mucosa, que apresentam como conteúdo apenas a triptase (MT) (THEOHARIDES; CONTI, 2004). Estas células apresentam diferenças quanto ao número e tipo de grânulos secretórios, bem como ao tipo de estímulo. MTQs possuem mais heparina e produzem IL-4, enquanto os MTs contêm mais sulfato de condroitina e produzem IL-5 e IL-6, sendo apenas as MTQs estimuladas por neuropeptídeos (BRADDING et al., 1995; THEOHARIDES; CONTI, 2004).

Alguns estudos apontam a presença de Ms no infiltrado inflamatório peritumoral, uma vez que estas células migram para áreas hipóxicas, comuns em tumores (TOMITA et al. 2001). Segundo Michalidou; Markopoulos; Antoniades (2008), estas células podem favorecer a progressão do tumor. Além de armazenar potentes mediadores químicos da

inflamação, como a histamina, heparina, serotonina e fatores quimiotáticos dos neutrófilos (RODINI; BATISTA; LARA, 2004; BATISTA; RODINI; LARA, 2005; METZ; MAURER, 2007); os Ms também sintetizam as triptases (BLAIR et al. 1997) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GRÜTZKAU, et al., 1998; DUSE et al., 2011), importantes na remodelação e angiogênese tecidual (BLAIR et al. 1997; BENJAMIN; KESHET, 1997), e esta última tem sido associada com a progressão neoplásica e metástases (MALTBY: KHAZAIE; MCNAGNY, 2009), estando relacionadas à angiogênese em neoplasias malignas, como carcinoma gástrico (YANO et al. 1999), do esôfago (ELPEK et al., 2001) e ovário (CHAN et al. 2005).

Entretanto, há relatos na literatura que, além do papel benéfico ao tumor, os mastócitos possuem características nocivas para o crescimento tumoral, através da mediação da citotoxicidade, ou indiretamente pela inibição da angiogênese e remodelação tecidual, além do favorecimento do recrutamento de células imunes (MALTBY: KHAZAIE; MCNAGNY, 2009). Pelo fato de possuírem extensa plasticidade, as células mastocitárias podem modular a função linfocitária durante a resposta imune, através da liberação de citocinas, como TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, participando do recrutamento de leucócitos, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune adquirida (KOBAYASHI; ISHIZUKA; OKAYAMA, 2000; GALLI; NAKAE; TSAI, 2005) e, conseqüentemente, rejeição ao tumor. Ao mesmo tempo, os Ms ainda possuem a capacidade de atuar diretamente na morte celular tumoral e, a partir de determinados estímulos, diminuir a angiogênese e, conseqüentemente, o crescimento neoplásico através da apoptose de células tumorais (MALTBY: KHAZAIE; MCNAGNY, 2009). Acredita-se, ainda, que as células mastocitárias podem ser úteis ao crescimento tumoral apenas se conseguirem liberar, de maneira seletiva, moléculas benéficas ao tumor sem a degranulação (THEOHARIDES; CONTI, 2004) (Figura 2). Este mecanismo é possível, uma vez que já foi demonstrada liberação diferencial de serotonina sem histamina *in vitro* (THEOHARIDES et al., 1982).

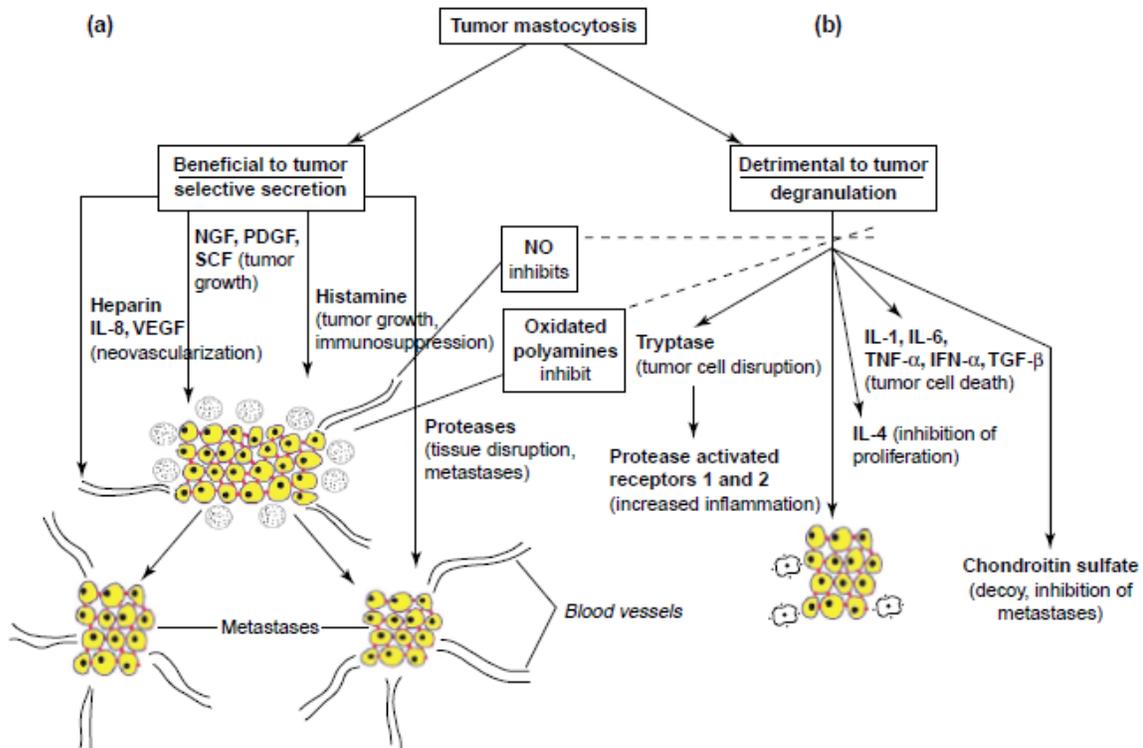


Figura 2. O possível papel do aumento do número de Ms no estroma de determinados tumores. (a) Ms podem ser recrutados por quimioatraentes derivados do tumor, como MCP-1, RANTES e SCF, para secretar seletivamente moléculas benéficas à neoplasia, incluindo fatores de crescimento, histamina (mitógeno para H1 e Imunossupressor para H2), fatores angiogênicos, como VEGF e IL-8, bem como proteases que poderiam permitir a formação e novos vasos e metástase. A degranulação parece ser bloqueada por inibidores derivados do tumor. (b) Ms podem acumular em reação ao tumor. Eles podem degranular e secretar moléculas como IL-4 e TNF- α , que são indutores de apoptose; IL-1 e IL-6, os quais possuem propriedades pró-inflamatórias; e sulfato de condroitina, o qual pode bloquear metástases. Ms, mastócitos; IFN- γ , interferon gama; MCP-1, proteína quimioatraente de monócito 1; SCF: fator de células-tronco; IL-8, interleucina 8; NGF, fator de crescimento neural; NO, óxido nítrico; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- β , fator de crescimento transformante β ; TNF- α , fator de necrose tumoral α ; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: THEOHARIDES; CONTI (2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi descrito pela primeira vez por Erhlich em 1978 (ERHLICH, 1978 citado por METCALF, 2008). Esta citocina possui como receptores o Flt-1 (*c-fms-like tyrosine kinase*) e Flk-1 (*Fetal liver kinase-1*) (PLATE et al., 1992; QUINN et al., 1993; SOINI et al., 2003), sendo todas as suas isoformas, VEGF_{121, 165, 189, 206}, produzidas e liberadas pelas células mastocitárias, onde ficam armazenadas em grânulos específicos. Acredita-se que o principal mecanismo de liberação das isoformas VEGF_{189, 206} nos tecidos ou dentro de outras células pelos Ms seja secreção via degranulação (GRÜTZKAU, et al., 1998), existindo fortes indícios que o VEGF seja um mediador parácrino da angiogênese (PLATE et al., 1992). Apesar disso, tem sido descrito que o VEGF recém-sintetizado pode ser liberado seletivamente através da indução do hormônio liberador de corticotropina, sem liberação de triptase, histamina ou citocinas, como IL-6 e TNF- α . Esta

liberação seletiva uma suposta explicação da participação das Ms em processos inflamatórios na ausência de degranulação (CAO et al., 2005).

O VEGF tem sua regulação controlada por condições de hipóxia (PLATE et al., 1992; BENJAMIN; KESHET, 1997; SYVÄRANTA et al., 2010), quando sua concentração irá aumentar, e hiperóxia, quando será encontrado em menores concentrações, sendo responsável pelo controle da expansão e regressão vascular (BENJAMIN; KESHET, 1997). Sua participação ocorre em processos fisiológicos e patológicos, como cicatrização, inflamação e crescimento tumoral, nos quais promove o aumento da permeabilidade vascular e proliferação de células endoteliais. É uma importante ferramenta na regulação da permeabilidade microvascular e manutenção da densidade de células endoteliais em tecidos adultos normais (BERSE et al., 1992), bem como crescimento, manutenção e remodelação de vasos sanguíneos durante o desenvolvimento neoplásico (BENJAMIN; KESHET, 1997; BERSE et al., 1992), sendo também secretado por células tumorais (BERSE et al., 1992).

A angiogênese associada ao VEGF é considerada uma das vias de formação vascular mais importantes em alguns tipos de neoplasias, como carcinomas ductais invasivos da mama (SALVEN et al., 2002; VALKOVIĆ et al., 2002). Ainda neste tipo de câncer, o VEGF está associado a um aumento da microdensidade vascular, metástases em linfonodos regionais, aumento da progressão tumoral e, conseqüentemente, pior prognóstico (VALKOVIĆ et al., 2002).

Segundo Gandolfo e colaboradores (2011), esta citocina encontra-se significativamente aumentada em lesões leucoplásicas orais displásicas quando comparadas àquelas que não apresentam displasia; bem como em tumores quando comparados à mucosa oral normal. Ao mesmo tempo, estes autores demonstraram haver uma forte correlação entre a presença de VEGF e aumento da vascularização da mucosa normal, leucoplasia associada e não associada à displasia e tecidos referentes às bordas tumorais. Paralelamente, já foi demonstrado que o acúmulo de Ms está relacionado com o aumento da vascularização, aumento da presença de VEGF e, conseqüentemente, a uma maior agressividade de tumores e pior prognóstico (THEOHARIDES; CONTI, 2004).

O estudo da angiogênese em tumores pode ser realizado através da análise da microdensidade vascular, a qual é determinada pela quantidade de vasos presentes em áreas de maior acúmulo (*Hot Spots*) dos mesmos nas neoplasias (KALRA et al., 2011). Para este

propósito, é amplamente descrita na literatura a utilização do marcador imuno-histoquímico CD 34 (GANDOLFO et al., 2011; KALRA et al., 2011; DUSE et al., 2011), uma vez que esta proteína demonstra robustez e especificidade para vasos sanguíneos imaturos (VERMEULEN et al., 2002), presentes em maior número nos tumores malignos (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

3. OBJETIVOS E METAS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a densidade de mastócitos e marcadores de angiogênese (VEGF e CD34) em displasias epiteliais orais e carcinomas escamocelulares orais.

3.2 Objetivos específicos/ Metas

- Avaliar e comparar a densidade e *status* (Granulado e Degranulado) dos mastócitos em DEOs e CECOs, considerando a graduação histológica e parâmetros clínicos;
- Avaliar e comparar a microdensidade vascular e expressão de VEGF em DEOs e CECOs, considerando a graduação histológica e parâmetros clínicos;
- Associar a densidade de mastócitos e a microdensidade vascular em DEOs e CECOs, considerando a graduação histológica e parâmetros clínicos;

4. CASUÍSTICA, MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi elaborado considerando-se as resoluções 196/96 e 347/05 que tratam sobre os aspectos éticos gerais da pesquisa com seres humanos e utilização de material biológico em pesquisas, respectivamente. O mesmo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM, FIOCRUZ, Bahia), obtendo parecer número 229/2010.

4.2 Casuística

Este estudo é do tipo retrospectivo, de corte transversal e foi composto por 14 casos de DEOs e 56 casos de CECOs, obtidos do Banco de Tumores do Hospital AC Camargo (São Paulo, Brasil) entre os anos de 1985 a 2002, através de uma parceria científica do nosso grupo de pesquisas, com o grupo coordenado pelo Dr. Fernando Soares. As amostras disponibilizadas fazem parte da Rede Nacional de Biorepositórios. Inicialmente, estavam disponíveis 45 DEOs e 76 CECOs, entretanto, 31 amostras de DEOs e 20 de CECOs foram excluídas por não se enquadrarem nos critérios de inclusão abaixo descritos.

Os dados clínicos e histológicos referentes aos casos estudados também foram obtidos do banco de dados disponíveis no Banco de Tumores desta instituição, a qual representa um hospital terciário, privado, voltado para o tratamento, ensino e pesquisa sobre o câncer.

Os critérios para inclusão das lesões no trabalho foram os descritos a seguir: tecido preservado e passível de análise microscópica, dados clínicos e histológicos disponíveis, bem como diagnóstico de DEO ou CECO localizada na cavidade oral, a qual é representada pela língua (dois terços anteriores), assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva (SLOOTWEG; EVESON, 2005). Ao mesmo tempo, os critérios para exclusão foram: ausência de preservação do tecido e menos de 3 áreas passíveis de análise (*hot spots*).

4.3 Revisão dos casos

Para a revisão dos casos de DEOs, secções de 4µm dos blocos parafinizados de cada tecido foram cortados e dispostos em lâminas de vidro para a realização da análise histológica com coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina), conforme rotina histotécnica da Plataforma de Histotecnologia do CPqGM.

A análise, revisão e classificação dos casos de DEOs foi realizada por um patologista experiente e treinado, a partir de um microscópio de luz (Modelo BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), com aumento final de 400x, sob um foco fixo e clareza de campo, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (GALE et al., 2005) (Tabela 1). Os casos foram avaliados também quanto à associação com o tipo e grau do processo inflamatório presente na lâmina própria, podendo ser classificado em mononuclear, misto ou polimorfonuclear e quanto ao grau de inflamação em ausente, discreto, moderado e intenso.

Tabela 1. Critérios utilizados para a classificação de DEOs. Salvador, Bahia, 2012.

Arquiteturais	Citológicos
Estratificação epitelial irregular	Variação do tamanho nuclear
Perda de polaridade das células basais	Pleomorfismo nuclear
Projeções em gota	Variação do tamanho celular
Aumento do número de mitoses	Pleomorfismo celular
Mitoses anormais	Aumento da relação núcleo-citoplasma
Disqueratoses	Aumento do tamanho nuclear
	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos proeminentes
	Hipercromatismo

Displasia discreta: quando as alterações arquiteturais, acompanhada de atipia citológica, envolve o terço inferior do epitélio.

Displasia moderada: quando as alterações arquiteturais, acompanhada de atipia citológica, estende-se ao terço médio do epitélio.

Displasia grave: quando as alterações arquiteturais, acompanhada de atipia citológica, estende-se ao terço superior do epitélio.

Fonte: Gale et al. (2005).

A graduação histológica dos CECOs, também considerando-se os critérios da OMS (2005), foi realizada no Hospital AC Camargo e revisada por um patologista deste hospital. Para os CECOs, levou-se em consideração a classificação TNM para agrupar os tumores nos diferentes estádios clínicos, a qual é adotada pela OMS. Através deste sistema, desenvolvido por Pierre Denoix, é possível descrever a extensão anatômica da lesão com base em 3 componentes: T, a extensão do tumor primário; N, a ausência ou a presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; e M, a ausência ou a presença de metástase a distância.

De acordo com o TNM, os tumores são classificados em estádios clínicos, que variam do estágio I ao IV. Nos estádios I e II as lesões não apresentam metástase em linfonodos regionais (N0), nem à distância (M0), são tumores T1 (até 2cm) e T2 (2 a 4cm), respectivamente. Os tumores T3 (mais de 4cm) ou aqueles com um linfonodo regional invadido (N1) são considerados estágio III. A partir de lesões classificadas como T4 (invasão de tecidos adjacentes), ou aquelas que apresentam 2 linfonodos regionais invadidos (N2) e todos os tumores que apresentam metástase à distância (M1), considera-se estágio IV (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA, 2004).

4.3.1 Estudo imuno-histoquímico

Para avaliar a expressão de VEGF-A (específico para as isoformas VEGF₁₂₁,₁₆₅,₁₈₉), a densidade de células mastocitárias, bem como vasos sanguíneos nos casos de DEO, foram utilizados cortes de 4µm de espessura obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. Para os casos de CECO, foi realizada a mesma técnica em lâminas de *tissue microarray* (TMA), confeccionadas como descrito a seguir.

A presença do tumor era avaliada em secções coradas com Hematoxilina e Eosina e, então, as áreas usadas para a construção do TMA eram marcadas na lâmina e no bloco doador, sendo os tecidos correspondentes às áreas selecionadas removidos usando um instrumento manual (*Manual Tissue Arrayer 1; Beecher Instruments, Sun Prairie, Wisconsin, USA*). As amostras consistiam de dois núcleos de diferentes áreas do tumor, colocadas coordenadamente no arranjo. Depois de finalizar o arranjo, os blocos de TMA eram cortados e dispostos em uma única lâmina TMA, com 2mm de diâmetro e 4 µm de profundidade. Uma secção era corada com Hematoxilina e Eosina, para checar a presença de estruturas neoplásicas, e duas outras secções, 40 µm distante das outras, eram usadas para marcação imuno-histoquímica dos anticorpos estudados neste trabalho.

Para a realização da técnica imuno-histoquímica, o sistema utilizado para a imunomarcação dos anticorpos VEGF e CD34 foi o Envision Advance™ (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*) e para o anticorpo anti-mast cell tryptase, o sistema Histofine (*Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan*).

Apenas para os casos de CECO, a primeira etapa da técnica imuno-histoquímica consistiu em colocar as lâminas de TMA por 2 horas em estufa a 60°C. Sendo assim,

procedeu-se à desparafinização dos casos de DEO e CECO com dois banhos de xilol e hidratação com álcool, a recuperação antigênica foi realizada conforme descrito na tabela 2, de acordo com o anticorpo em questão. Seguida desta etapa, as secções foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena (solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada) por 15min e protegido da luz. Em seguida, os anticorpos primários VEGF e CD34 foram incubados *overnight*, à temperatura de 4°C; e *mast cell tryptase* por 1 hora, em temperatura ambiente (Tabela 2).

Tabela 2. Especificidade, clone, diluição, forma de recuperação antigênica, marca comercial dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas. Salvador, Bahia, 2012.

Anticorpo	Clone	Recuperado r antigênico	Tempo e forma de recuperar antígeno	Diluição	Marca	Controle
<i>Mast cell Tryptase</i>	AA1	Tripsina 1%	Estufa, 30 minutos	1:50	Novocastra	Mastocitose cutânea
VEGF-A (VEGF)	VG1	Tris/EDTA pH 9,0	Banho-maria, 30 minutos	1:100	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca	Glândula salivar
CD34 class II	QBEnd 10	Citrato pH 6,0	Banho-maria, 30 minutos	1:50	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca	Placenta

Após lavagens com tampão PBS/BSA 1%, foi aplicado um pool de anticorpos secundários (reagente HRP LINK; EnVision Advance™, *Dako Corporation, Carpinteria, USA*), por 20 minutos, e reagente HRP, também por 20 minutos (Sistema EnVision Advance™, *Dako Corporation, Carpinteria, USA*) para as secções imunomarcadas para os anticorpos VEGF e CD34. Esta etapa, para as secções imunomarcadas para *mast cell tryptase*, foi constituída da aplicação do reagente do sistema Histofine (*Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão*).

Após lavagem com PBS/BSA 1%, as reações foram reveladas com a substância 3,3 diaminobenzidina diluída em uma solução tampão de Imidazole-HCL, pH 7.5, contendo peróxido de hidrogênio (*DAKO Corporation, Carpinteria, USA*) e contracoradas com hematoxilina de Harris.

A análise imuno-histoquímica foi realizada por um observador previamente treinado, a partir de imagens capturadas no aumento de 20X pelo sistema microscópico digital virtual VS110 (*Olympus Corporation, Tóquio, Japão*). As imagens eram exibidas em um monitor LCD e as 5 áreas com maior imunomarcção (*hot spots*) foram escolhidas através do

programa Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão), analisadas com auxílio do programa Image J 1.44 (*National Institutes of Health, USA*) e medidas, em mm², pelo programa Image-pro Plus, versão 5 (*Media Cybernetics, Inc.*), após calibração. A análise feita para cada anticorpo é especificada a seguir.

- *Densidade de mastócitos (DM) - Mast cel tryptase*

Contagem dos mastócitos

A contagem das células mastocitárias foi realizada nas áreas de *hot spot* previamente selecionadas no programa Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão). As imagens eram abertas no programa Image J 1.44 (*National Institutes of Health, USA*) e, então, as células eram observadas por um avaliador e marcadas e contadas pelo programa. Posteriormente, a área da mesma imagem era obtida utilizando-se o programa Image-pro Plus, versão 5 (*Media Cybernetics, Inc.*). Dessa forma, calculava-se o número total de mastócitos e, posteriormente, dividia-se o número de células pela área encontrada, obtendo-se a densidade de mastócitos por mm² (densidade de mastócitos- DM).

Análise morfométrica dos mastócitos

Para a avaliação da morfologia dos mastócitos, as mesmas imagens utilizadas para a contagem destas células foram utilizadas, com o auxílio do programa Image J 1.44 (*National Institutes of Health, USA*). Nos casos de DEO e CECO, os mastócitos eram considerados degranulados (sem grânulos em seu citoplasma) ou granulados (com grânulos citoplasmáticos) levando-se em consideração a presença dos grânulos no interior da célula ou no meio extracelular, prevalecendo a morfologia presente na maioria das células.

- *Microdensidade vascular (MDV) - CD34*

Para a obtenção do número total de vasos por área (microdensidade vascular), realizou-se a captura de 5 áreas de *hot spot*, com o auxílio do programa Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão), e posterior contagem dos vasos imunomarcados nestas áreas a partir do programa Image J 1.44 (*National Institutes of Health, USA*), onde os vasos eram observados por um avaliador e marcados e contados pelo programa. Estas mesmas áreas selecionadas eram, então, medidas, em mm², através do programa Image-pro Plus, versão 5 (*Media Cybernetics, Inc.*), obtendo-se o número de vasos por mm².

- *VEGF*

Para a análise desta citocina, foi utilizado o programa Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão), levando-se em consideração, de maneira independente, o epitélio displásico e lâmina própria nos casos DEO, bem como o parênquima e estroma nos casos de CECO. Foi utilizado o Escore imuno-histoquímico (EI), descrito por Sinicrope et al. (1995), onde se considera o percentual de células positivas, bem como a intensidade da sua marcação. Assim, foram estabelecidas 5 categorias para o percentual de células marcadas, 0, $\leq 5\%$; 1, 5-25%; 2, 25-50%; 3, 50-75% e 4, $\geq 75\%$; e 3 categorias para a intensidade da imunomarcação, 1+, fraca; 2+, moderada e 3+, intensa. Para a obtenção do EI o escore do percentual de células marcadas era multiplicado pelo escore da intensidade da marcação, como descrito na fórmula a seguir:

$$EI = E_{pcm} \times E_{im}$$

Onde EI é o escore imuno-histoquímico, E_{pcm} é o escore do percentual de células marcadas e E_{im} é o escore da intensidade da marcação.

Também foi avaliada a localização do anticorpo, membranas, citoplasmática ou ambas, de maneira independente para epitélio e lâmina própria nos casos de DEO, bem como para parênquima e estroma nos casos de CECO.

4.4 Análise dos dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.04 (*GraphPad Software, Inc.*).

A análise foi realizada segundo a distribuição na curva normal de Gauss e, a partir da análise estatística descritiva destes (Média, Mediana, Desvio Padrão, Curtose e Variância) foram aplicados testes paramétricos e não-paramétricos, quando os dados distribuíam-se de forma simétrica ou assimétrica, respectivamente.

As amostras foram comparadas utilizando os seguintes testes estatísticos:

- Mann-Whitney e Teste t não-pareado: para comparar e testar diferenças estatísticas entre duas amostras independentes.

- Kruskal-Wallis para comparar e testar diferenças estatísticas entre mais de duas amostras independentes.

- Teste de Correlação de Pearson e Spearman para testar a independência dos níveis de MDV, DM e expressão de VEGF avaliados.

O nível de significância e poder dos testes foram estabelecidos, respectivamente, em 5% e 80%.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e morfológicos

Quatorze casos de DEO compuseram essa casuística, sendo que 9 lesões (64,28%) acometiam homens e 5 mulheres (35,71%), com uma média de 1,8:1. A idade dos pacientes variou de 43 a 91 anos, apresentando uma média de idade de 65,29 (DP= 14,55). A localização preferencial destes casos foi língua (n= 5; 35,71%), mucosa jugal (n=3; 21,42%), assoalho bucal (n=3; 21,42%), palato e rebordo gengival (n=1; 7,14%) (Tabela 3). A localização de um caso (7,14%) não estava descrita no prontuário.

Oito DEOs (57,14%) foram classificados como displasia discreta, 5 (35,71%) como displasia moderada e 1 (7,14%) como displasia intensa (Tabela 3). Onze (78,57%) casos apresentavam-se associados à inflamação, dos quais 7 (63,63%) eram displasia discreta e 4 (36,36) moderada.

Tabela 3. Aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de pacientes com DEOs. Salvador, Bahia, 2012.

<i>Caso</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Localização Anatômica</i>	<i>Diagnóstico</i>
1	M	68	Língua	DEO discreta
2	F	66	Palato	DEO moderada
3	M	91	Língua	DEO moderada
4	F	75	Língua	DEO discreta
5	F	82	Não especificado	DEO moderada
6	M	60	Assoalho de boca	DEO discreta
7	M	53	Assoalho de boca	DEO moderada
8	M	75	Mucosa jugal	DEO discreta
9	F	59	Língua	DEO discreta
10	F	45	Mucosa jugal	DEO intensa
11	M	49	Língua	DEO moderada
12	M	68	Rebordo gengival	DEO discreta
13	M	80	Mucosa jugal	DEO discreta
14	M	43	Assoalho de boca	DEO discreta

A casuística deste trabalho também foi composta por 56 casos de CECO primários, sendo 35 (62,5%) pacientes do sexo masculino e 21 (37,5%) do sexo feminino, com uma média de 1,66:1. A idade dos pacientes variou de 26 a 92 anos, com média de 62,73 (DP= 62,73). Os locais de maior acometimento foram língua (n= 22; 39,28%), mucosa jugal (n= 7; 12,5%) e assoalho bucal (n= 7; 12,5%), as demais localizações são descritas na Tabela 4.

Clinicamente, os tumores foram classificados de acordo o sistema TNM para classificação dos tumores malignos (2004). Considerando-se a extensão do tumor primário, 35 (62,5%) foram classificados como T1 ou T2, 20 (35,71%) como T3 ou T4 e 1 (1,78%)

não teve seu tamanho definido. Em relação à presença de metástase em linfonodos regionais, 28 (50%) apresentaram envolvimento de linfonodo regional, sendo classificado como N1, N2 ou N3, 20 (35,71%) não apresentaram metástase em linfonodo (N0), 5 (8,92%) não puderam ser avaliados (Nx) e 3 (5,35%) não possuía informação quanto a esta característica. Em relação à determinação do estadiamento clínico, 22 (39,28%) foram classificados como estadio I ou II e 34 (60,71%) como estadio III ou IV (Tabela 4).

Quando avaliada presença ou ausência de invasão vascular, 45 (80,35%) casos não apresentaram invasão e 9 (16,07%) casos apresentaram invasão vascular; dois (3,57%) casos não possuíam informações quanto a esta análise. Em relação à invasão perineural, 31 (55,35%) casos não estavam associados à invasão e 23 (41,07%) casos apresentaram invasão, não sendo esta informação apresentada em 2 (3,57%) casos (Tabela 4).

Tabela 4. Características clínico-patológicas dos pacientes com CECO primário. Salvador, Bahia, 2012.

Parâmetros clínicos	Total (n)	%
<u>Sexo</u>		
Homem	35	62,5
Mulher	21	37,5
<u>Tamanho</u>		
T1/T2	35	62,5
T3/T4	20	35,71
Sem informação	1	1,78
<u>Estadio clínico</u>		
I e II	22	39,28
III e IV	34	60,71
<u>Envolvimento de linfonodo</u>		
N0	20	35,71
N1-N3	28	50
Nx	5	8,92
Sem informação	3	5,35
<u>Infiltração perineural</u>		
Sim	23	41,07
Não	31	55,35
Sem informação	2	3,57
<u>Invasão vascular</u>		
Sim	9	16,07
Não	45	80,35
Sem informação	2	3,57
<u>Gradação Histológica</u>		
Bem diferenciado	36	64,28
Moderadamente	18	32,14
Pouco diferenciado	2	3,57
<u>Local</u>		
Língua	22	39,28
Mucosa jugal	7	12,5
Assoalho bucal	7	12,5
Região retromolar	6	10,71
Gengiva	4	7,14
Palato	2	3,57

Não informado	2	3,57
---------------	---	------

A análise histológica, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (2005), permitiu classificar 36 (64,28%) casos de CECO como bem diferenciados, 18 (32,14%) como moderadamente diferenciados e 2 (3,57%) como pouco diferenciados.

5.2 Resultados Imuno-histoquímicos

Displasias epiteliais orais

a) Mastócitos

Em todos os casos avaliados (n=14), observou-se imunomarcção para os mastócitos. Estas células estavam localizadas principalmente na lâmina própria, próximas a vasos sanguíneos, distribuídas esparsamente e raramente se agrupavam. Entretanto, um caso de displasia moderada apresentou mastócitos agrupados.

A densidade de mastócitos variou de 28,75 a 133,3 células/mm², com mediana de 53,86 células/mm² (DP=27,18 células/mm²). A mediana da densidade para o sexo masculino foi de 42,20 células/mm² (DP= 32,06 células/mm²) e 62,62 células/mm² para o sexo feminino (DP=18,28 células/mm²). Ao se comparar as medianas da densidade entre as diferentes localizações, verificou-se que a mucosa jugal apresentava maior mediana, com 68,56 células/mm² (DP=9,23 células/mm²), seguida da língua, com mediana de 46,20 células/mm² (DP=12,99 células/mm²) e assoalho bucal (mediana= 35,51 células/mm²; DP= 6,62). Os valores para o palato e gengiva foram, respectivamente, 62,62 e 133,26 células/mm². A mediana da DEO discreta foi de 42,59 células/mm² (DP=34,57) e DEO moderada foi de 62,62 células/mm² (DP= 14,34); o valor de densidade de mastócitos para a DEO intensa foi de 76,45 células/mm² (Tabela 5). Não foi possível comparar os graus histológicos DEO discreta e DEO moderada, com a DEO intensa, uma vez que esse último grupo possuía apenas uma amostra.

Os resultados da análise estatística demonstraram não existir diferenças significantes entre os sexos (p=0,4376; Teste de Mann-Whitney), as localizações (p=0,0559; Teste de Kruskal-Wallis) e entre os graus de DEO discreta e moderada (p=0,3543; Teste de Mann-Whitney).

A média da DM entre as lesões associadas e não associadas à inflamação foi, respectivamente, 58,26 células/mm² (DP= 29,89 células/mm²) e 49,66 (DP= 18,09

células/mm²) células/mm². Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (p= 0,8763; Teste de Mann-Whitney).

Tabela 5. Densidade total de mastócitos em DEO. Salvador, Bahia, 2012.

Parâmetros	Densidade total			
	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>				
Femino	5 (35,71)	62,62	18,28	0,4376
Masculino	9 (64,28)	42,20	32,06	
<u>Gradação Histológica</u>				
Discreta	8 (57,14)	42,59	34,57	0,3543
Moderada	5 (35,71)	62,62	14,34	
Intensa	1 (7,14)	76,45	-	
<u>Local</u>				
Língua	5 (35,71)	46,20	12,99	0,0559
Palato	1 (7,14)	62,62	-	
Assoalho bucal	3 (21,42)	35,51	6,625	
Gengiva	1 (7,14)	133,26	-	
Mucosa Jugal	3 (21,42)	68,56	9,231	
Desconhecida	1 (7,14)	77,18	-	

Nota: Para análise estatística paramétrica, foi utilizado o valor de mediana para DM. O cálculo estatístico para os diferentes graus histológicos levou em consideração apenas as DEOs discretas e moderadas. O cálculo estatístico para as diferentes localizações levou em consideração apenas as DEOs em língua, assoalho bucal e mucosa jugal. Os valores demonstrados para gradação histológica intensa, localizações de palato e gengiva e localização desconhecida não são correspondentes a medidas de tendência central.

Ao avaliar a morfologia celular (mastócitos granulados e degranulados), independente dos graus de displasia, verificou-se que a densidade de mastócitos granulados variou de 32,07 a 133,3 células/mm², com mediana de 63,59 células/mm² (DP= 29,38) e a densidade das células degranuladas variou de 28,75 a 62,62 células/mm², com mediana de 40,86 células/mm² (DP= 14,77) (Tabela 6). A análise descritiva para o grupo de DEOs que apresentavam mastócitos granulados e degranulados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros clínicos e histológicos e *status* de granulação de mastócitos. Salvador, Bahia, 2012.

	Granulado		Degranulado	
Total (%)	10 (71,42%)		4 (28,57%)	
Mediana	63,59		40,86	
DP	29,38		14,77	
Parâmetros	Total	%	Total	%
<u>Sexo</u>				
Femino	4	40	1	25
Masculino	6	60	3	75
<u>Gradação Histológica</u>				
Discreta	6	60	2	50
Moderada	3	30	2	50
Intensa	1	10	-	-
<u>Local</u>				
Língua	4	40	1	25
Palato	-	-	1	25
Assoalho bucal	1	30	2	50
Gengiva	1	10	-	-
Mucosa Jugal	3	30	-	-
Desconhecida	1	10	-	-

Nota: Para análise estatística dos mastócitos granulados foi utilizado o valor de média para DM

b) Microdensidade vascular (CD 34)

Dos 14 casos de DEO, 11 (78,57%) foram positivos para CD34 e 3 (21,42%) foram excluídos da análise, uma vez que os tecidos não possuíam um mínimo de 3 áreas *Hot Spots* para a análise. Dos casos analisados, 7 (63,63%) foram classificados como displasia discreta, 3 (27,27%) como moderada e 1 (9,09%) como intensa. Destes, 4 (36,36%) casos acometiam a língua, 3 (27,27%) a mucosa jugal, 2 (18,18%) o assoalho da boca e 1 (9,09) o palato e a gengiva (Tabela 7).

A microdensidade vascular variou de 28,62 a 60,96 vasos/mm², com média de 44,61 vasos/mm² (DP=9,84 vasos/mm²). A análise descritiva da microdensidade vascular para sexo, grau histológico e localização está representada na Tabela 7.

A análise mostrou não existir diferença estatisticamente significativa entre os sexos ($p= 0,5277$; Teste de Mann-Whitney), entre os casos que acometiam língua e mucosa jugal ($p= 0,2286$; Teste de Mann-Whitney) e entre os graus histológicos estudados ($p= 0,1833$; Teste de Mann-Whitney) (Tabela 7). Outras localizações não foram comparadas por possuírem um número de casos menor que 3.

Tabela 7. Microdensidade vascular em DEO. Salvador, Bahia, 2012.

CD 34				
Parâmetros	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>				
Femino	4 (36,36)	46,98	11,55	0,5277
Masculino	7 (63,63)	43,23	9,421	
<u>Gradação Histológica</u>				
Discreta	7 (63,63)	41,84	7,296	0,1833
Moderada	3 (27,27)	49,51	9,471	
Intensa	1 (9,09)	60,96	-	
<u>Local</u>				
Língua	4	42,15	10,87	0,2286
Palato	1	49,51	-	
Assoalho bucal	2	33,48	6,866	
Gengiva	1	41,84	-	
Mucosa Jugal	3	48,41	7,752	

Nota: Para análise estatística paramétrica, foi utilizado o valor de mediana para MDV. O cálculo estatístico para os diferentes graus histológicos levou em consideração apenas as DEOs discretas e moderadas. O cálculo estatístico para as diferentes localizações levou em consideração apenas as DEOs em língua e mucosa jugal. Os valores demonstrados para gradação histológica intensa, localizações de palato e gengiva não correspondem a medidas de tendência central.

A média da MDV entre as lesões associadas à inflamação foi de 43,89 vasos/mm² (DP= 8,56 vasos/mm²) e para as lesões não associadas à inflamação foi de 33 vasos/mm² (DP= 30,53 vasos/mm²). Não foi possível realizar testes estatísticos para análise desta variável, pois apenas duas lesões não apresentavam associação com infiltrado inflamatório.

c) VEGF-A

A maioria dos casos de DEO apresentou, em epitélio, escore imuno-histoquímico igual a 0 (n=11; 84,61%), 1 (7,69%) caso escore 2 e 1 (7,69%) caso escore 4. Em todos os casos positivos, VEGF-A estava no citoplasma celular e a imunomarcagem apresentava um

aspecto granular. Um caso foi excluído desta análise, por apresentar tecido considerado inadequado para uma correta análise de imunomarcção. O caso que possuiu escore 4 foi de uma displasia moderada.

Quando avaliada as características da imunomarcção na lâmina própria, 12 (92,3%) casos apresentaram escore imuno-histoquímico igual a 0 e 1 (15,38%) caso escore 3. Os casos positivos (n=2; 15,38%) possuíam imunomarcção no citoplasma, principalmente de células endoteliais. O percentual de expressão de VEGF-A e o EI são representados na Figura 3.

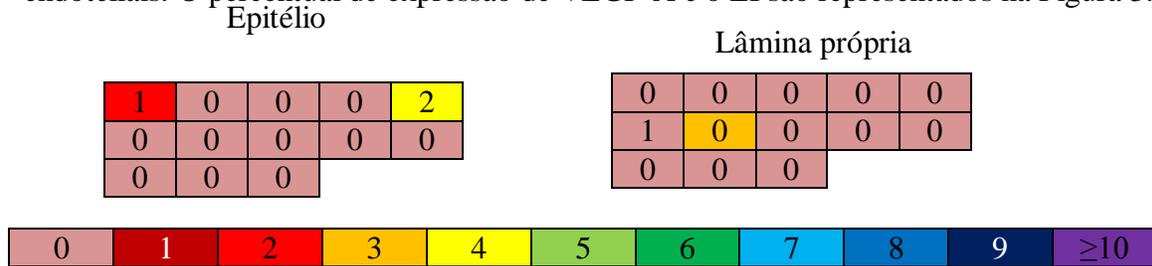


Figura 3. Percentual de células que expressam VEGF-A e EI no epitélio e lâmina própria em DEO. Salvador, Bahia, 2012.

Não houve diferenças estatísticas de imunomarcção epitelial de VEGF-A quando sexo, localizações de acometimento (assoalho bucal, língua e mucosa jugal) e graus histológicos (discreto e moderado) foram comparados (p= 0,5397, Teste de Mann-Whitney; p= 0,2636, Teste de Kruskal-Wallis e Dunn e p= 0,6015, Teste de Mann-Whitney), respectivamente (Tabela 8).

A avaliação estatística também foi realizada para o escore imuno-histoquímico da lâmina própria entre as diferentes localizações, assim como do escore total do epitélio em relação ao escore total da lâmina própria, não sendo encontradas diferenças significantes entre os mesmos (valor de p= 0,2636 e 0,5793, respectivamente) (Tabela 8). Não foi possível realizar o cálculo estatístico para sexo e gradação histológica na lâmina própria, pois estes grupos apresentaram apenas um caso que possuía EI maior que zero.

Tabela 8. Expressão da citocina VEGF-A em DEO. Salvador, Bahia, 2012.

Parâmetros	Epitélio				Lâmina própria			
	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)	Total	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>								
Femino	4 (30,76)	0	2	0,5397	4 (30,76)	0	0	-
Masculino	9 (69,23)	0	0,6667		9 (69,23)	0	1,061	
<u>Gradação Histológica</u>								
Discreta	8 (61,53)	0	0,7071	0,6015	8 (61,53)	0	0	-
Moderada	4 (30,76)	0	2		4 (30,76)	0	1,5	
Intensa	1 (7,69)	0	-		1 (7,69)	0	-	
<u>Local</u>								
Língua	5 (38,46)	0	0	0,2636	5 (38,46)	0	0	0,2636
Assoalho bucal	3 (23,07)	0	1,155		3 (23,07)	0	1,732	
Gengiva	1 (7,69)	0	-		1 (7,69)	0	-	
Mucosa Jugal	3 (23,07)	0	0		3 (23,07)	0	0	

Nota: O cálculo estatístico para os diferentes graus histológicos, para epitélio e lâmina própria, levou em consideração apenas as DEO discreta e moderada, bem como as localizações de língua, assoalho bucal e mucosa jugal. Os valores demonstrados para gradação histológica intensa e localização de gengiva não correspondem a medidas de tendência central.

A caracterização dos mastócitos, microdensidade vascular e imunomarcção de VEGFA estão ilustrados na Figura 4.

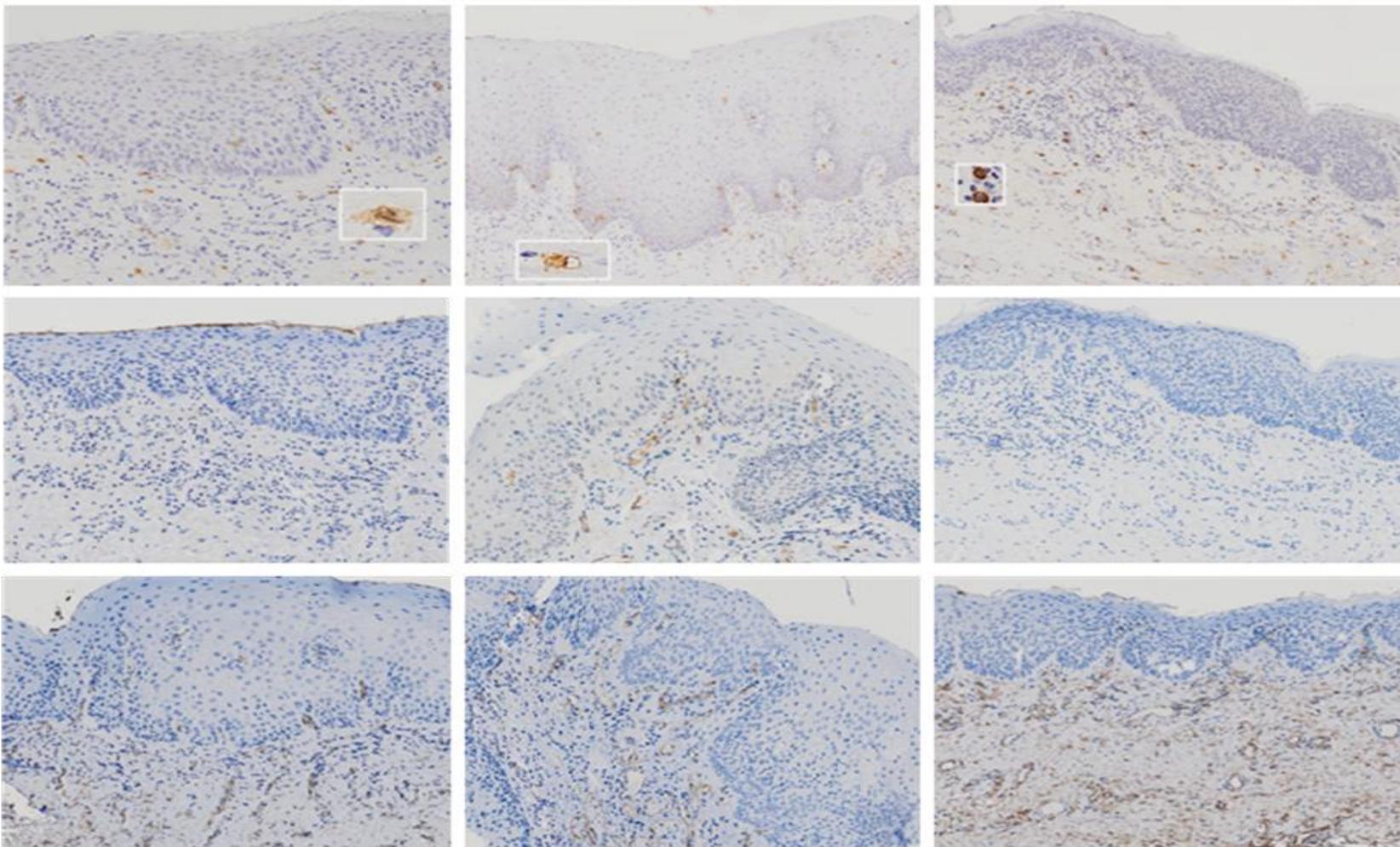


Figura 4. Imuno-histoquímica em DEO (100µm). (A), (B) e (C) Presença e *status* de células mastocitárias em DEO discreta, moderada e intensa, respectivamente. (D) e (F) EI 0 para a proteína VEGF em DEO discreta e intensa, respectivamente; (E) Imunomarcção de VEGF no citoplasma de células endoteliais em DEO moderada (Seta). (G), (H) e (I) CD34. Presença de vasos imunomarcados por CD34 em DEO discreta, moderada e intensa, respectivamente (Seta).

Carcinoma escamocelular oral

a) Mastócitos

Dos 56 casos inicialmente selecionados para compor o TMA, 38 (67,85%) foram analisados, 5 (8,92%) excluídos por possuírem menos que 3 áreas de *hot spot* e 13 (23,21%) apresentaram artefatos teciduais que impossibilitaram a análise. Dos casos avaliados, 2 (5,25%) foram negativos para o anticorpo utilizado. Dos casos positivos (n=36; 94,73%), 27 (75%) apresentaram, predominantemente, mastócitos granulados e 9 (25%) mastócitos degranulados. Observando a totalidade dos CECOs, a DM variou de 6,09 a 156,54 células/mm², com mediana de 29,89 células/mm² (DP= 32,84 células/mm²).

Os parâmetros clínicos dos CECOs foram então confrontados, considerando-se o status de granulação/degranulação. Nos tumores cujos mastócitos eram predominantemente granulados, a densidade de células variou de 6,09 células/mm² a 156,54 células/mm², com mediana de 34,95 células/mm² (DP=35,91 células/mm²). Os resultados estatísticos demonstraram existir diferenças significantes quando os tumores que não apresentavam invasão vascular e aqueles que possuíam invasão vascular foram comparados (p= 0,0307; Teste de Mann-Whitney) (Figura 5). As comparações entre os demais parâmetros podem ser observadas na Tabela 9.

No grupo das lesões que apresentaram, predominantemente, mastócitos degranulados, a densidade de células variou de 8,51 células/mm² a 59,63 células/mm², com média de 25,71 células/mm² (DP=14,87 células/mm²). A análise estatística deste grupo demonstrou não existir diferenças significantes entre as variáveis estudadas (Tabela 9). Também não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tumores com predomínio de mastócitos granulados e degranulados (p= 0,1439; Teste de Mann-Whitney).

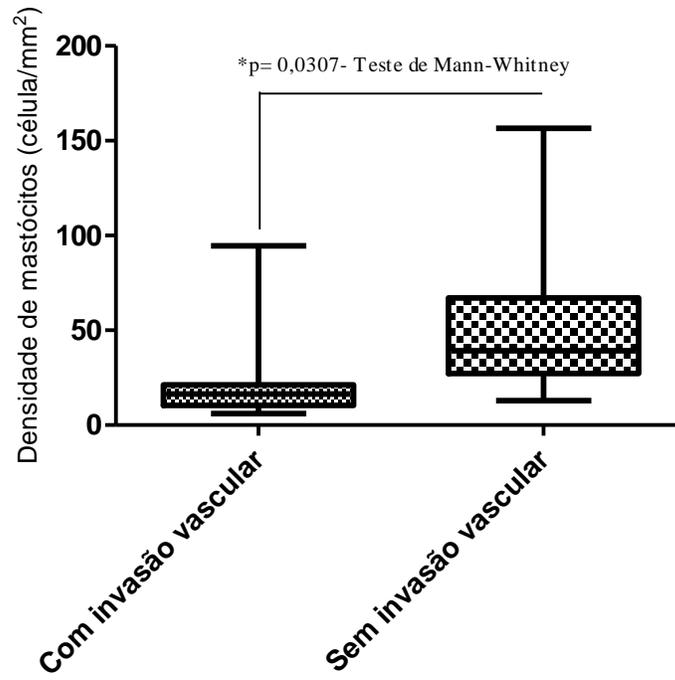


Figura 5. Comparação da densidade de mastócitos granulados em lesões de CECO com e sem invasão vascular. Salvador, Bahia, 2012.

Tabela 9. Densidade total de mastócitos em CECO. Salvador, Bahia, 2012.

Parâmetros	Granulado				Degranulado			
	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>								
Femino	8 (29,62)	62,11	33,27	0,0670	3 (33,33)	25,07	18,59	0,9048
Masculino	19 (70,37)	28,33	35,70		6 (66,66)	26,30	4,423	
<u>Tamanho</u>								
T1/T2	19 (70,37)	35,80	38,02	0,7703	5 (55,55)	25,71	18,20	0,7302
T3/T4	8 (29,62)	41,98	32,29		4 (44,44)	25,37	10,23	
<u>Estadio clínico</u>								
I/II	11 (40,74)	42,80	40,98	0,5053	4 (44,44)	29,42	16,49	0,2857
III/IV	16 (59,25)	28,09	32,97		5 (55,55)	24,43	10,49	
<u>Linfonodo</u>								
N0	11 (40,74)	43,47	38,69	0,1063	3 (33,33)	32,54	4,121	0,2000
N1-N3	14 (51,85)	27,50	33,37		3 (33,33)	10,38	9,776	
Sem informação	2 (7,40)	51,03	49,89		3 (33,33)	24,43	20,45	
<u>Infiltração perineural</u>								
Sim	14 (51,85)	40,05	27,09	0,8651	4 (44,44)	21,46	23,88	0,9048
Não	13 (48,14)	31,45	43,88		5 (55,55)	25,71	3,703	
<u>Invasão vascular</u>								
Sim	6 (22,22)	16,36	33,31	0,0307*	-	-	-	-
Não	20 (74,07)	39,30	36,11		9 (100%)	27,18	14,87	
Sem informação	1 (3,70)	73,46	-		-	-	-	
<u>Gradação Histológica</u>								
Bem diferenciado	19 (70,37)	42,80	38,27	0,7726	5 (55,55)	23,99	8,769	0,1429
Moderadamente	7 (25,92)	43,05	33,66		4 (44,44)	32,54	4,858	
Pouco	1 (3,70)	31,45	-		-	-	-	
<u>Local</u>								
Língua	11 (40,74)	43,16	33,73	0,1760	3 (33,33)	25,71	12,63	0,2686
Palato	1 (3,70)	86,31	-		1 (11,11)	23,99	-	
Assoalho bucal	4 (14,81)	38,88	62,40	-	-	-	-	
Região retromolar	2 (7,40)	63,06	44,70	-	-	-	-	
Gengiva	7 (25,92)	24,43	10,21	-	1 (11,11)	24,43	-	
Mucosa Jugal	1 (3,70)	68,84	-	-	4 (44,44)	29,42	20,52	
Sem informação	1 (3,70)	67,1	-	-	-	-	-	

Legenda: *, estatisticamente significativa

Nota: Para análise estatística paramétrica, foi utilizado o valor de mediana para MDV. Os casos de CECO que não possuíam informação quanto ao envolvimento de linfonodos regionais e invasão vascular, bem como o de gradação histológica pouco diferenciado não foram incluídos na análise estatística. Só foram incluídos no estudo estatístico os casos localizados em língua, assoalho bucal e gengiva no grupo das lesões com mastócitos granulosos. No grupo das lesões com mastócitos degranulosos apenas os tumores que acometiam mucosa jugal e língua. Os valores observados no caso que não apresentava informação quanto ao envolvimento vascular e localização, bem como o de gradação histológica pouco diferenciado e que acometiam as localizações de palato, gengiva (degranulado) e mucosa jugal (granulado) não correspondem a medidas de tendência central.

a) Microdensidade vascular (CD 34)

Cinquenta e seis casos foram imunomarcados para CD 34, sendo 31 (55,35%) casos analisados, 14 (25%) foram excluídos por apresentarem menos de 3 áreas de *hot spot* e 11 (19,64%) não possuíam material suficiente para avaliação. Dos 31 casos analisados, todos apresentaram marcação positiva para o anticorpo. A microdensidade variou de 12,61 vasos/mm² a 59,29 vasos/mm², com mediana de 21,73 vasos/mm² (DP=12,69 vasos/mm²).

Os resultados estatísticos demonstraram não existir diferenças significantes entre a microdensidade vascular para os sexos masculino e feminino (p=0,1666; Teste Mann-Whitney), entre os casos que apresentavam e os que não possuíam invasão vascular (p=0,1350; Teste Mann-Whitney), entre os casos com e sem infiltração perineural (p=0,1405; Teste de Mann-Whitney), entre os tumores T1/T2 e T3/T4 (p=0,2811; Teste Mann-Whitney), entre os casos N0 e N1-N3 (p=0,9029; Teste Mann-Whitney), entre os estadiamentos I/II e III/IV (p=0,2825; Teste Mann-Whitney), entre as diferentes localizações de acometimento (p=0,8278; Teste de Kruskal-Wallis e Dunn) e entre os diferentes graus histológicos (p=0,7921; Teste Mann-Whitney) (Tabela 10).

Tabela 10. Microdensidade vascular em CECO. Salvador, Bahia, 2012.

CD 34				
Parâmetros	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>				
Femino	11 (35,48)	29,42	11,39	0,1666
Masculino	20 (64,51)	17,73	13,29	
<u>Tamanho</u>				
T1/T2	20 (64,51)	17,73	13,10	0,2811
T3/T4	10 (32,25)	28,92	11,45	
Sem informação	1 (3,22)	41,20	-	
<u>Estadio clínico</u>				
I/II	12 (38,70)	17,35	14,60	0,2825
III/IV	19 (61,29)	27,46	11,57	
<u>Linfonodo</u>				
N0	12 (38,70)	27,53	15,62	0,9029
N1-N3	15 (48,38)	24,36	10,82	
Sem informação	4 (12,90)	30,43	11,66	
<u>Infiltração perineural</u>				
Sim	10(32,25)	30,52	12,95	0,1405
Não	20 (64,51)	17,73	12,36	
Sem informação	1 (3,22)	35,84	-	
<u>Invasão vascular</u>				
Sim	4 (12,90)	16,10	3,259	0,1350
Não	26 (83,87)	24,78	13,18	
Sem informação	1 (3,22)	35,84	-	
<u>Gradação Histológica</u>				
Bem diferenciado	19 (61,29)	21,73	11,50	0,7921
Moderadamente	12 (38,70)	25,40	11,21	
<u>Local</u>				
Língua	13 (41,93)	26,05	12,62	0,8278
Palato	3 (9,67)	26,31	14,15	
Assoalho bucal	3 (9,67)	17,94	5,942	
Região retromolar	2 (6,45)	37,51	30,81	
Gengiva	3 (9,67)	16,76	8,625	
Mucosa Jugal	6 (19,35)	31,32	11,51	
Sem informação	1 (3,22)	21,73	-	

Nota: As características que apresentaram número menor que 3 não foram incluídas na análise estatística, bem como os casos que não possuíam informação quanto ao tamanho, envolvimento de linfonodos regionais, invasão vascular, perineural e localização de acometimento. As característica que apresentaram apenas um caso não são descritas aqui como medida de tendência central.

b) VEGF-A

Dos 56 casos submetidos à técnica imuno-histoquímica para marcação de VEGF-A, 41 (73,21%) foram analisados e 15 (26,78%) excluídos porque os cortes histológicos não apresentavam condições de análise.

Quando o parênquima destas lesões foi avaliado, 26 (63,41%) casos apresentaram EI igual a 0, 3 (7,31%) casos EI 1, 1 (2,43%) caso EI 2, 1 (2,43%) caso EI 3, 4 (9,75%) casos EI 4, 3 (7,31%) casos EI 6, 2 (4,87%) casos EI 8 e 1 (2,43%) caso EI 9, com mediana igual a 0 (DP=2,6) (Figura 3). Os casos positivos (n=24; 58,53%) apresentaram marcação citoplasmática; os demais não apresentaram marcação imuno-histoquímica (n=17; 41,46%). O padrão de expressão de VEGF-A e o EI são representados na Figura 6.

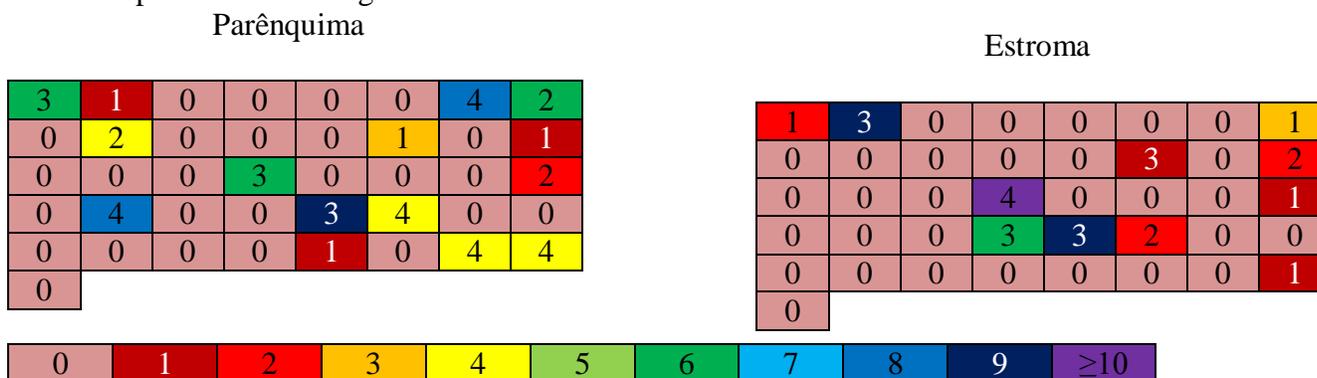


Figura 6. Percentual de células que expressam VEGF-A e EI no parênquima e estroma de CECO. Salvador, Bahia, 2012.

A análise do estroma das lesões demonstrou que 30 (73,17%) casos obtiveram EI 0, 3 (7,31%) casos EI 1, 3 (7,31%) casos EI 2, 1 (2,43%) caso EI 3, 1 (2,43%) caso EI 6, 2 (4,87%) casos EI 9 e 1 (2,43%) caso EI 12, com mediana igual a 0 (DP=2,78) (figura 6). Os casos positivos (n= 29; 70,73%) apresentaram marcação no citoplasma de células endoteliais e fibroblastos e 12 (29,26%) não apresentaram imunomarcção. Tumores bem diferenciados apresentaram maior EI quando comparados aos moderadamente diferenciados (p= 0,0291; Teste de Mann-Whitney). Quando avaliadas as diferenças de expressão de VEGF-A entre células do parênquima e estroma, estas também não foram significantes (p=0,3117; Teste de Mann-Whitney). As comparações entre os demais parâmetros clínicos estão descritas na Tabela 11.

A Figura 7 ilustra os padrões de imunomarcção dos mastócitos, microdensidade vascular e VEGFA em CECO.

Tabela 11. Expressão de VEGF-A em CECO. Salvador, Bahia, 2012.

Parâmetros	Parênquima				Estroma			
	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)	Total (%)	Mediana	DP	p (valor)
<u>Sexo</u>								
Femino	13 (31,70)	0	2,23	0,5370	13 (31,70)	0	1,801	0,3230
Masculino	28 (68,29)	0	2,877		28 (68,29)	0	3,166	
<u>Tamanho</u>								
T1/T2	27 (65,85)	0	2,678	0,6785	27 (65,85)	0	3,332	0,9859
T3/T4	14 (34,14)	0	2,785		14 (34,14)	0	1,016	
<u>Estadio clínico</u>								
I/II	15 (36,58)	0	2,667	0,8262	15 (36,58)	0	2,669	0,9865
III/IV	26 (63,41)	0	2,741		26 (63,41)	0	2,852	
<u>Linfonodo</u>								
N0	14 (34,14)	0	2,054	0,8650	14 (34,14)	0	1,730	0,5105
N1-N3	22 (53,65)	0	2,787		22 (53,65)	0	3,111	
Sem informação	5 (12,19)	0	3,975		5 (12,19)	0	4,025	
<u>Infiltração perineural</u>								
Sim	20 (48,78)	1	3,197	0,0065*	20 (48,78)	0	3,658	0,4750
Não	19 (46,34)	0	1,012		19 (46,34)	0	1,465	
Sem informação	2 (4,87)	3	4,243		2 (4,87)	1,5	2,121	
<u>Invasão vascular</u>								
Sim	7 (17,07)	0	3,388	0,6238	7 (17,07)	0	4,536	0,5929
Não	32 (78,04)	0	2,501		32 (78,04)	0	2,435	
Sem informação	2 (4,87)	3	4,243		2 (4,87)	1,5	2,121	
<u>Gradação Histológica</u>								
Bem diferenciado	26 (63,41)	0	2,855	0,3960	26 (63,41)	0	3,347	0,0291*
Moderadamente	14 (34,14)	0	2,424		14 (34,14)	0	0,2673	
Pouco	1 (2,43)	0	-		1 (2,43)	0	-	
<u>Local</u>								
Língua	18 (43,9)	0	2,662	0,6236	18 (43,9)	0	2,787	0,4381
Palato	3 (7,31)	0	0		3 (7,31)	0	0	
Assoalho bucal	6 (14,63)	0	4,401		6 (14,63)	0	0	
Região retromolar	3 (7,31)	1	3,215		3 (7,31)	0	1,155	

Gengiva	3(7,31)	0	2,309	3(7,31)	0	4,5
Mucosa Jugal	6 (14,63)	1	1,506	6 (14,63)	0,5	3,521
Sem informação	2 (4,87)	2	2,828	2 (4,87)	4	2,828

Legenda*: valor estatisticamente significante

Nota: Os casos de CECO que não possuíam informação quanto ao envolvimento de linfonodos regionais e invasão vascular, bem como o de gradação histológica pouco diferenciado não foram incluídos na análise estatística. As característica que apresentaram apenas um caso não são descritas aqui como medida de tendência central.

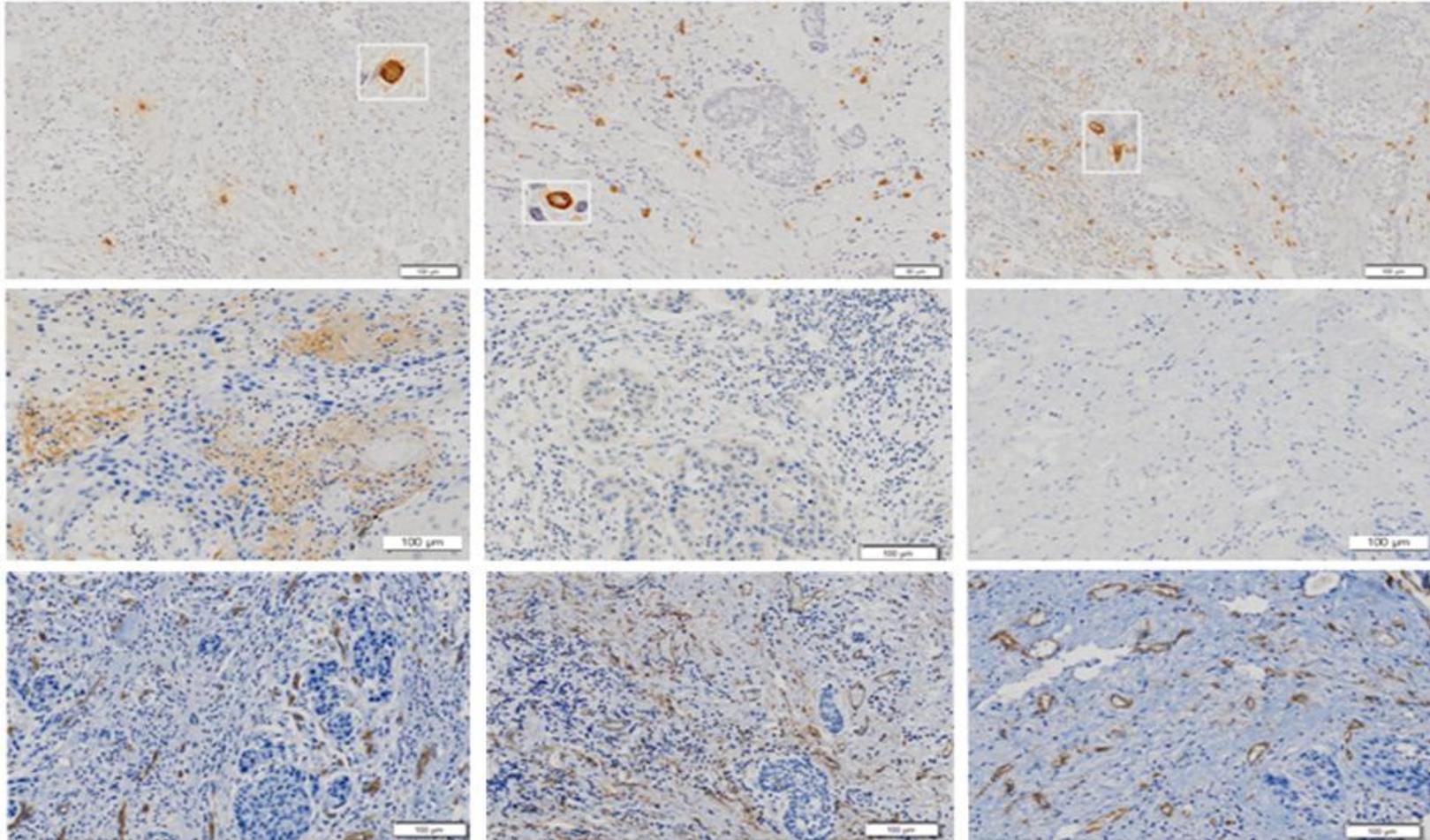


Figura 7. Imuno-histoquímica em CECO (100µm). (A), (B) e (C) Mastócitos. Presença de células mastocitárias predominantemente granuladas em CECO bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. (D) e (E) Imunomarcção citoplasmática e granular de VEGF em CECO bem diferenciado e moderadamente diferenciado, respectivamente; (F) EI 0 para a proteína VEGF em CECO pouco diferenciado. (G) e (H) e (I) CD34. Presença de vasos imunomarcados para CD34 em CECO bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, respectivamente (Seta).

Comparação dos resultados entre DEOs e CECOs

A avaliação dos Ms demonstrou existir uma maior densidade destas células entre as DEOs, independente do grau histológico ($p= 0,01$; Teste de Mann-Whitney), quando este grupo foi comparado com os CECO.

Em relação à MDV total, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa maior entre as DEOs quando comparadas aos CECOs ($p=0,0003$; Teste de Mann-Whitney) (Figura 8).

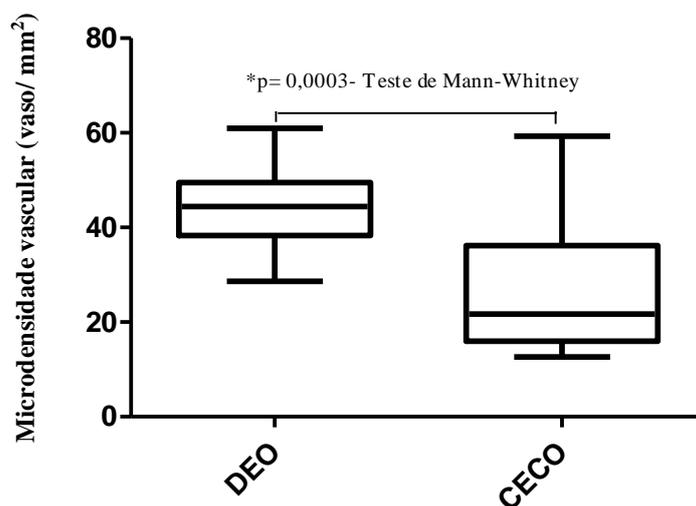


Figura 8. Comparação da microdensidade vascular entre DEO e CECO. Salvador, Bahia, 2012.

A análise estatística da expressão de VEGF-A para os casos de DEOs e CECOs, demonstrou não haver diferenças significantes na marcação localizada no epitélio/parênquima destas duas lesões ($p= 0,13$; Teste de Mann-Whitney), bem como na expressão da lâmina própria/estroma ($p= 0,0439$; Teste de Mann-Whitney).

Correlação dos resultados encontrados

Analisando-se os casos de DEO, foi encontrada correlação positiva regular entre densidade de mastócitos granulados e microdensidade vascular ($r= 0,48$, $p= 0,15$; Correlação de Pearson) e correlação positiva forte entre densidade de mastócitos degranulados e microdensidade vascular ($r= 0,8$, $p= 0,33$; Correlação de Spearman).

Para os CECOs, foi encontrada correlação positiva fraca entre densidade de mastócitos granulados e microdensidade vascular ($r= 0,05$, $p= 0,77$; Correlação de Spearman) e correlação negativa fraca entre densidade de mastócitos degranulados e microdensidade vascular ($r= -0,25$, $p= 0,52$; Correlação de Spearman).

Correlacionando os dados de densidade de mastócitos e EI de VEGFA, para as displasias, observamos uma correlação positiva fraca entre a presença de mastócitos

granulados e a expressão de VEGF-A na lâmina própria das DEOs ($r= 0,29$, $p= 0,41$; Correlação de Spearman). Não foi possível realizar o cálculo da correlação entre mastócitos degranulados e a expressão de VEGF-A na lâmina própria das DEOs.

Para os tumores, houve correlação negativa fraca entre mastócitos granulados e expressão de VEGF-A no estroma dos CECOs ($r= -0,24$, $p= 0,21$; Correlação de Spearman) e correlação negativa regular entre mastócitos degranulados e expressão de VEGF-A no estroma dos CECOs ($r= -0,45$, $p= 0,21$; Correlação de Spearman).

Estudando-se os casos de DEOs, foi encontrada relação negativa regular entre a expressão de VEGF-A no epitélio e a microdensidade vascular ($r= -0,60$, $p= 0,04$, IC: $-0,8891$ a $0,09865$; Correlação de Spearman) e correlação nula entre a expressão da citocina na lâmina própria e a microdensidade vascular ($r= 0$, $p= 1$; Correlação de Spearman).

Para os casos de CECO, existiu correlação positiva regular entre a expressão de VEGF-A no parênquima e a microdensidade vascular ($r= 0,39$; $p=0,02$, Correlação de Spearman) e correlação positiva fraca entre a expressão de VEGF-A no estroma e a microdensidade vascular ($r= 0,18$, $p= 0,31$; Correlação de Spearman).

6. DISCUSSÃO

O CECO corresponde a mais de 90% dos casos de neoplasias malignas diagnosticados em boca e representa o sexto tumor mais freqüente na população mundial (HARUHIKO; KASHIWAZAKI, 2008). Esta neoplasia é precedida, em alguns casos, por lesões pré-malignas (WANG et al., 2009), caracterizadas histologicamente por alterações arquiteturais e citológicas do tecido epitelial, as quais configuram as DEOs (GALE et al., 2005; HSUE et al., 2007). Por isso, acredita-se que o risco de desenvolver CECO está aumentado em pacientes portadores destas lesões (LEE et al., 2000; HSUE et al., 2007), com 5% das DEO evoluindo para CECO em um curto período de 3 anos (HSUE et al., 2007).

As principais causas para o desenvolvimento destas doenças estão associadas ao uso do tabaco, concomitante ou não ao uso do álcool (JOHNSON et al., 2005; GALE et al., 2005), sendo o HPV, principalmente os subtipos 16 e 18, recentemente documentado como um possível fator causal (MILLER; JOHNSTONE, 2001; RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007).

Inicialmente, 45 amostras de DEO e 75 de CECO foram obtidas dos arquivos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e Hospital AC Camargo (São Paulo, Brasil), os quais representam instituições de referência para diagnóstico e tratamento destas doenças. Entretanto, foram incluídas nesse estudo apenas 14 DEOs e 56 CECOs que preencheram os critérios de inclusão desse estudo.

Apesar da perda amostral inerente a estudos retrospectivos, nossa casuística ainda é relevante quando comparamos esse trabalho com outros na literatura, tais como Iamaroon et al. (2003), os quais utilizaram 6 casos de DEO e 26 casos de CECO; Mărgăritescu et al. (2008) que analisaram 19 casos de CECO; Michailidou; Markopoulos; Antoniadis (2008) que utilizaram 12 DEOs e 35 CECOs; e Shivamallappa et al. (2011) apresentaram os resultados realizados em 18 DEOs e 19 CECOs. Ao mesmo tempo, cabe ressaltar, no presente estudo, uma grande perda de casos para análise nas lâminas de TMA.

Na presente casuística, a idade dos pacientes com DEO variou de 43 a 91 anos, apresentando média de 65,29 (DP= 14,55), corroborando com outros autores (COWAN et al., 2001; LEE et al., 2006), sendo os homens mais acometidos que as mulheres, de acordo com o relatado por Lee et al. (2006) e diferente do descrito por Cowan et al. (2001) que demonstrou serem as mulheres as mais acometidas. A localização preferencial dos casos deste estudo foi língua (n= 4; 28,57%), mucosa jugal (n=3; 21,42%) e assoalho da boca (n=3; 21,42%), que são os locais comumente envolvidos (COWAN et al., 2001; LEE et al., 2006).

Entre os CECOs, a idade de diagnóstico variou entre 26 e 92 anos, com média de 62,73 (DP= 62,73), sendo os homens mais acometidos e as localizações preferenciais a língua (n= 22; 39,28%), mucosa jugal (n= 7; 12,5%) e assoalho de boca (n= 7; 12,5%), corroborando com dados que apontam uma maior incidência destes tumores em homens, entre as 6ª e 7ª décadas de vida (LEE et al., 2006; HSUE et al., 2007; GROOME et al., 2011) e nas localizações aqui encontradas (LEE et al., 2006; HSUE et al., 2007). Ainda, Lambert et al. (2011) apontam a língua como o local de maior acometimento de câncer na cavidade oral, assim como relatado neste estudo.

A maioria dos casos de DEO do presente estudo (n=8; 57,14%) foram classificados como displasia discreta, de acordo com dados relatados anteriormente (AMAGASA; YAMASHIRO; ISHIKAWA, 2006; HSUE et al., 2007). Isso provavelmente ocorre porque os indivíduos tendem a tomar consciência de forma rápida das anormalidades que acometem a cavidade oral (IZUMO, 2011), descobrindo de forma precoce as lesões ainda em estágio inicial de desenvolvimento. Entretanto, há a possibilidade também das áreas piores das lesões não serem incluídas na biópsia (COWAN et al., 2001).

Em relação aos CECOs, 62,5% (n=35) foram classificados como T1/T2 e a maioria (n=22; 39,28%) como estadio I/II, demonstrando existir um maior predomínio de lesões menores (DIAZ et al., 2003; GRIMM; LAZARIOTOU, 2011) e de estadios menos graves (GROOME et al., 2011; GRIMM; LAZARIOTOU, 2011). Entre os trabalhos publicados (FAGAN et al., 1998; DIAZ et al., 2003; SOUDRY et al., 2010; GRIMM; LAZARIOTOU, 2011) não é comum haver o comprometimento de linfonodos regionais, diferente do verificado na maioria (n=28; 50%) dos casos deste estudo. Entretanto, é possível existir o envolvimento de linfonodos sem a identificação clínica (FAGAN et al., 1998; DIAZ et al., 2003; AN et al., 2008) e, talvez, esta possa ser uma possível explicação para a divergência dos dados encontrados. Devido a isso, acredita-se que o esvaziamento cervical eletivo possa aumentar a taxa de sobrevivência de paciente portadores de CECO (FAGAN et al., 1998; DIAZ et al., 2003).

Quando avaliada a presença ou ausência de invasão vascular, 80,35% (n=45) dos casos não apresentaram invasão, corroborando com dados anteriores (FAGAN et al., 1998; GRIMM; LAZARIOTOU, 2011) que demonstram uma maior prevalência de tumores não associados à invasão vascular. Em relação à invasão perineural, a maioria (n=31; 55,35%) dos casos não estava associada à mesma, de acordo com Sethi et al. (2009) e Soudry et al. (2010), demonstrando uma menor capacidade destes tumores em desenvolver metástases, já que estas

características representam uma maneira de disseminação das células neoplásicas (BINMADI; BASILE, 2011).

A gradação histológica é um dos critérios que podem indicar o comportamento biológico tumoral (SETHI et al., 2009), existindo, neste estudo, um predomínio dos CECOs classificados como bem diferenciados (n=36; 64,28%), assim como relatado em outros estudos como o de Hsue et al. (2007). Entretanto, em estudos realizados em 2011, Groome et al. e Grimm e Lazariotou classificaram a maioria dos seus casos como moderadamente diferenciados. O primeiro autor cita a dificuldade de alguns profissionais em realizar o exame intra-oral na busca de lesões malignas, prolongando o tempo de diagnóstico destas doenças. Assim, este se torna um possível fator da diferença dos seus resultados para os descritos neste estudo.

Vem sendo amplamente discutido que o crescimento tumoral está diretamente associado à angiogênese, principalmente nos estágios iniciais da formação do tumor, uma vez que os novos vasos formados são responsáveis por realizar as trocas metabólicas das células neoplásicas, prover nutrientes e oxigênio às mesmas (VALKOVIČ et al., 2002), bem como oferecer a via hematogênica como uma maneira de disseminação (FOX, 1997). Brevemente, a angiogênese envolve a reprogramação do perfil de transcrição celular, com a predominância de fatores pró-angiogênicos, resultando em uma proliferação de vasos (MENAKURU et al., 2008). Acredita-se, entretanto, que o início da neovascularização em lesões displásicas seja um pré-requisito para a formação do tumor (BERGERS; BENJAMIN, 2003; MENAKURU et al., 2008). Sendo que a angiogênese pode ser um marcador de prognóstico em tumores malignos (IAMAROON et al., 2003).

A angiogênese está relacionada à liberação de determinados fatores pelos Ms (ELPEK et al. 2001; MALTBY; KHAZAIE; MCNAGNY, 2009), como VEGF (PARIZI et al., 2010) e triptase (IAMAROON et al., 2003). Estas células são originadas de precursores pluripotentes da medula óssea, atingindo sua maturação nos tecidos (KOBAYASHI; ISHIZUKA; OKAYAMA, 2000; JANEWAY JUNIOR et al. 2005), onde são amplamente distribuídas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; JANEWAY JUNIOR et al. 2005). Além de participar da angiogênese fisiológica (COUSSENS et al., 1999; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005), acredita-se que estas células participam da formação de vasos em lesões malignas (RANIERI et al., 2009), contribuindo para um comportamento biológico mais agressivo em alguns tumores, entre eles o carcinoma escamocelular (ELPEK et al. 2001; MALTBY; KHAZAIE; MCNAGNY, 2009).

Sugere-se que estas células mastocitárias possuam características ambíguas ao tumor (EROL et al., 2011), podendo atuar contra as células tumorais, através do recrutamento das células imunes – dendríticas e células T - e da sua capacidade citotóxica (DAWICK; MARSHALL, 2007; MALTBY; KHAZAIE; MCNAGNY, 2009); bem como ser úteis ao crescimento neoplásico se liberarem seletivamente, sem degranular, moléculas benéficas ao tumor (THEOHARIDES; CONTI, 2004). Isso ocorre porque, uma vez degranuladas, estas células liberam proteinases, as quais degradam a matriz extracelular peritumoral e promovem atividade contra as células tumorais (DABBOUS et al., 1986). Sendo assim, diz-se que os Ms parecem desenvolver um papel pró-tumoral em algumas neoplasias malignas, como melanomas (TÓTH et al., 2000) e carcinoma escamocelular de esôfago (ELPEK et al. 2001); e anti-tumoral, ou não exercer função, em outros, como câncer de mama (RANIERI et al., 2009), colorretal (LINDMARK et al., 1996), de pulmão (CARLINI et al., 2010) e próstata (FLEISCHMAN et al., 2009). Por isso, foi realizado neste estudo, pioneiro neste aspecto, a análise morfológica dos mastócitos (granulados e degranulados) nas lesões que possivelmente antecedem as neoplasias malignas (DEOs) e os CECOs.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a mediana da densidade total de Ms nas DEOs foi de 53,86 células/mm², valor menor que o encontrado por Iamaroon et al. (2003) e Araújo et al. (2010), sendo os valores descritos por estes últimos em lesões de lábio. Essa divergência pode ser explicada pela atuação da radiação ultravioleta no lábio, qual está associada ao recrutamento de células mastocitárias (ROJAS et al., 2005).

As maiores DM foram encontradas entre pacientes do sexo feminino (62,62 células/mm²), na localização de gengiva (133,26 células/mm² – valor total). Ainda, a displasia classificada como intensa apresentou uma maior DM (76,45 células/mm² – valor total), assim como demonstrado por Michalidou; Markopoulos; Antonides (2008). Entretanto, a análise estatística demonstrou não existir diferenças significantes entre os sexos (p=0,43), as localizações (p=0,05) e os graus histológicos (p=0,35). O que parece não demonstrar relação de Ms, de maneira independente, para estas características. Araújo et al. (2010), em lesões de lábio, também não encontraram diferenças significativas entre os diferentes graus histológicos de displasia, porém relataram um aumento do número destas células nas lesões displásicas quando comparadas ao lábio normal.

Muitos estudos que utilizam lesões pré-malignas, não as descrevem associadas ao processo inflamatório (SUGÁR; BANOCZY, 1969; WEIJERS et al., 2002; WANG et al., 2009). Em nosso estudo, a média da DM entre as lesões associadas e não associadas à

inflamação foi, respectivamente, 58,26 células/mm² e 49,66 células/mm². Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,8763$), dados semelhantes aos demonstrados por De Assis Caldas Pereira et al. (2012), os quais observaram não observaram uma associação significativa entre presença de mastócitos e infiltrado inflamatório em tumores odontogênicos. Alguns autores sugerem que existem, em lesões malignas, duas formas de se ativar a resposta inflamatória, presente em quase todos os tumores: por uma via intrínseca e uma via extrínseca (determinada por ativação de oncogenes). Essa ativação da resposta inflamatória determinaria um aumento na sobrevivência e proliferação das células tumorais (MANTOVANI et al., 2008). Em relação às lesões displásicas, os mastócitos fizeram-se presentes independente do infiltrado inflamatórios, como demonstrado anteriormente (ARAÚJO et al., 2010), sugerindo que a presença destas células possa ocorrer pela atuação de moléculas específicas não relacionadas à inflamação. Ao mesmo tempo, pode existir também uma tentativa de reparo nestas lesões associadas ao processo inflamatório, uma vez que a inflamação precede a reparação dos tecidos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Ao avaliar a morfologia celular, verificou-se que a média da densidade de mastócitos granulados foi maior (63,59 células/mm²) entre as lesões de DEO, não existindo diferenças estatísticas significantes entre os valores encontrados para os grupos com predomínio de células granuladas e degranuladas ($p=0,18$). Este fato sugere que os diferentes tipos morfológicos de mastócitos não exercem atividades distintas nas DEOS. A análise descritiva para o grupo com prevalência de células granuladas demonstrou existir maior número de lesões em pacientes do sexo masculino ($n= 6$; 60%), nas DEOs classificadas como discretas ($n= 6$; 60%) e que acometiam a língua ($n= 4$; 40%). Já no grupo de células degranuladas, houve maior número de lesões entre indivíduos homens ($n= 3$; 75%), na localização de assoalho bucal ($n= 2$; 50%) e número igual de lesões classificadas como discreta e moderada ($n= 2$; 50%). Outros estudos, com casuística maior, devem ser realizados no objetivo de elucidar melhor os dados acima descritos.

Avaliando-se os CECOs, a mediana da DM foi de 29,89 células/mm², valor consideravelmente menor que aquele já relatado (Iamaronn et al., 2003), e a maioria dos casos ($n= 27$, 75%) apresentaram, predominantemente, Ms granulados. Neste grupo, a mediana da DM foi de 34,95 células/mm², maior que a observada para o grupo que possuía, predominantemente, Ms degranulados (25,71 células/mm²). Esses números são maiores que o

observado por Parizi et al. (2010), os quais demonstraram DM de 13,1 células/mm² em CECO. Entretanto, estes mesmos autores encontraram uma maior concentração de Ms quando analisadas lesões de lábio (108,5 células/mm²), existindo diferenças significativas de densidade de células entre estas 2 localizações. Sabe-se que a radiação ultravioleta é um potente ativador de mastócitos (PARIZI et al., 2010) e, provavelmente por isso, diferenças importantes são encontradas entre CEC de lábio e da cavidade oral.

Analisando-se as características associadas com maior agressividade tumoral, os maiores valores de DM estavam entre os tumores T3/T4 (41,98 células/mm²), associados à infiltração perineural (40,05 células/mm²) e classificados histologicamente como moderadamente diferenciados (43,05 células/mm²). Entretanto, a avaliação estatística demonstrou existir uma DM significativamente maior entre os tumores que não apresentavam invasão vascular (36,11 células/mm²) quando comparados aos que possuíam (33,31 células/mm²) (p= 0,0307), o que não parece estar de acordo com dados que apontam uma maior capacidade de Ms granulados atuarem no crescimento e desenvolvimento tumoral (THEOHARIDES; CONTI, 2004). Ao mesmo tempo, Oliveira-Neto et al. (2007) e Parizi et al. (2010) também não encontraram diferenças significativas entre características clínicas e histopatológicas em lesões de CECO, sugerindo existir outros fatores que atuem na agressividade tumoral e no recrutamento e ativação de Ms nesta neoplasia maligna. Vale ressaltar que a análise imuno-histoquímica nos permite dizer apenas se as células estão granuladas ou não, não podendo ser demonstrada a possível secreção seletiva de fatores pró-tumorais.

Além disso, pacientes do sexo feminino e as lesões que acometiam palato apresentaram maiores valores de DM, 62,11 células/mm² e 86,31 células/mm² (valor total), quando comparados ao sexo masculino e a outras localizações, respectivamente. Corroborando com dados que demonstram uma maior DM em lesões de pacientes do sexo feminino, o que sugere a possível existência de diferentes mecanismos de recrutamento e ativação destas células relacionadas às mulheres (PARIZI et al., 2010).

No grupo das lesões de CECO que apresentaram, predominantemente, Ms degranulados, os maiores valores de DM estavam entre pacientes do sexo masculino (26,30 células/mm²), em tumores T1/T2 (25,71 células/mm²), de estadiamento clínico I/II (29,42 células/mm²), sem envolvimento de linfonodo cervical (32,54 células/mm²), não associados à infiltração perineural (25,71 células/mm²), classificados como moderadamente diferenciados

(32,54 células/mm²) e que acometiam a língua (25,71 células/mm²). Entretanto, a análise estatística deste grupo demonstrou não existir diferenças significantes entre as variáveis estudadas, apontando para uma possível atuação de mastócitos degranulados associados a outros fatores que contribuam para um comportamento biológico menos agressivo nestes tumores. O que não está de acordo com dados descritos anteriormente (MALTBY; KHAZAIE; MCNAGNY, 2009).

Também não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tumores com predomínio de mastócitos granulosos e degranulados ($p= 0,1439$). O que provavelmente demonstra não existir diferenças na atuação dos diferentes tipos morfológicos dos mastócitos em CECO. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo que faz a análise da presença de mastócitos granulosos e degranulados neste tipo de tumor.

Ainda, a avaliação da densidade de células mastocitárias entre as duas lesões estudadas revelou existir um número estatisticamente significativo maior entre as DEOs (53,86 células/mm²) quando comparadas aos CECOs (29,89 células/mm²) ($p=0,01$), diferente de dados já descritos (OLIVEIRA-NETO et al., 2007; MICHALIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008). Apesar de ser descrita uma falha na migração de Ms em DEO e CECO, isso não explica o número aumentado destas células em lesões pré-malignas. Paralelamente, a possível explicação para este fenômeno seria a complexa rede de sinalização existente no meio ambiente tumoral que estaria regulando o número de Ms nestas neoplasias através da indução de morte (OLIVEIRA-NETO, 2007).

Como já descrito, as células mastocitárias parecem estar associadas ao desenvolvimento da angiogênese em neoplasias malignas (MOHTASHAM et al., 2010; DUSE et al., 2011). Sendo assim, foi realizada a análise imuno-histoquímica da MDV, através da imunomarcagem de CD 34, em casos de DEO e CECO para avaliar a formação de vasos nestas duas lesões. Apesar de muitos estudos utilizarem a MDV para avaliação da quantidade de vasos em tecidos, ainda não foi estabelecido um consenso a respeito de como realizá-la. Entretanto, defende-se que a contagem realizada em quatro ou cinco áreas de *hot spot*, como feito no nosso estudo, seja a melhor técnica de determinar valores prognósticos em pacientes acometidos por câncer (DE JONG; VAN DIEST; BAAK, 2000), tornando-se um método eficaz para verificar o valor da MDV. Ao mesmo tempo, já foi demonstrada a utilização da proteína CD 34 em estudos de angiogênese neoplásica (GADOLFO et al., 2011), bem como a

robustez e especificidade da mesma para vasos imaturos (VERMEULEN et al., 2002), constituindo um bom marcador para o estudo da MDV.

Em 2002, foi publicado por Vermeulen e colaboradores uma revisão que teve como objetivo descrever as principais metodologias para determinação da microdensidade vascular para tumores, entretanto os diferentes artigos que são publicados nesta área não trazem uma informação unificada a respeito da mesma, dificultando de maneira expressiva a comparação dos dados. Ainda, poucos estudos trazem a avaliação da MDV em DEOs (TAE et al., 2000; IAMAROON et al., 2003; GANDOLFO et al., 2011), os quais também não possuem um padrão para esta análise, tornando difícil a análise comparativa.

Nosso estudo é pioneiro em demonstrar a MDV em DEO, tomando-se como base os sexos, localizações e gradações histológicas. Nos nossos casos, a média da MDV foi de 44,61 vasos/mm², as maiores densidades de vasos estavam entre as lesões de DEO de pacientes do sexo feminino (46,98 vasos/mm²), de grau intenso (60,96 vasos/mm² – valor absoluto) e na localização de palato (48,51 vasos/mm² - valor absoluto), entretanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entres os sexos (p= 0,5277), os diferentes graus histológicos (p= 0,1833) e para as localizações de língua e mucosa jugal (p= 0,2286).

Em 2010, Souza e colaboradores também não encontraram associação entre a MDV e os graus histológicos de displasia epitelial em lábio, demonstrando não existir uma alteração importante entre os diferentes graus histológicos de displasia e MVD. Ainda, parece que a localização e o sexo não são fatores que contribuam para o aumento da MDV, mesmo existindo relatos que apontem uma maior propensão para o desenvolvimento de neoplasias malignas quando lesões histológicas que as precedem acometem o assoalho de boca (ZHANG et al., 2001; REIBEL, 2003).

Por outro lado, já havia sido demonstrada uma maior MDV em lesões displásicas classificadas histologicamente como intensas (TAE et al., 2000; MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008), o que pode significar um aumento da presença de vasos à medida que a lesão progride. Contudo, o aumento da densidade de vasos parece não estar relacionado com as variáveis estudadas, merecendo outras abordagens que elucidem melhor o valor aumentado de MDV em pacientes do sexo feminino e na localização do palato.

Segundo Mantovani et al. (2008), o infiltrado inflamatório está associado a uma aumento da angiogênese, pois células como mastócitos, neutrófilos e eosinófilos são responsáveis por liberar citocinas, prostaglandinas e quimiocinas que irão atuar no desenvolvimento de novos vasos. Parece que nosso estudo corrobora com estes achados, uma

vez que a média da MDV foi maior entre as lesões associadas à inflamação quando comparadas às que não associadas à inflamação, sendo, respectivamente 43,89 vasos/mm² e 33 vasos/mm². Infelizmente, não foi possível realizar testes estatísticos para análise desta variável, o que poderia ajudar a elucidar melhor esta questão.

Para os CECOs, a média de MDV foi de 21,73 vasos/mm², valor maior que o demonstrado por Mărgăritescu et al. (2008) e menor que o encontrado por Iamaroon et al. (2003) em câncer de boca. Estudos apontam uma maior densidade de vasos em tumores mais agressivos e, conseqüentemente, de estágios mais avançados (ELPEK et al., 2001; MĂRGĂRITESCU et al., 2008; EL-ROUBY, 2010), sendo observada na nossa pesquisa uma maior MDV associada a tumores que demonstravam infiltração perineural (30,52 vasos/mm²), estadiamento clínico III/IV (27,46 vasos/mm²), classificados como T3/T4 (28,92 vasos/mm²) e moderadamente diferenciados (25,40 vasos/mm²). Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as variáveis estudadas (sexo, localização, envolvimento de linfonodos, invasão vascular e perineural e gradação histológica), o que já havia sido demonstrado em estudos anteriores (TAE et al., 2000; KYZAS; AGNANTIS; STEFANO, 2006; MĂRGĂRITESCU et al., 2008). Entretanto, Souza et al. (2010) encontraram uma maior propensão a metástases cervicais em pacientes portadores de câncer de lábio que possuíam um valor mais acentuado de MDV. Vale ressaltar que a metodologia utilizada por estes autores foi diferente da realizada neste estudo, merecendo atenção ao avaliar estes dados.

O estudo das MDV encontradas para DEOs e CECOs demonstrou existir um maior valor entre os casos de DEO. Foram observadas diferenças significativas entre os valores totais de MDV ($p=0,0003$) existindo uma maior média de MDV entre os casos de DEO (44,61 vasos/mm²) quando comparada aos CECOs (21,73 vasos/mm²). Entretanto, o que se descreve é uma maior densidade de vasos em lesões malignas quando comparadas às displásicas (TAE et al., 2000; MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008; SOUZA et al., 2010; GANDOLFO et al., 2011).

Apesar de ser o TMA um método acessível e capaz de permitir a análise de diversos casos em uma única lâmina, os resultados de microdensidade vascular são diferentes daqueles observados em lâminas convencionais de tecidos parafinizados, pois ao selecionar as áreas que farão parte do TMA, dá-se preferência às áreas pertencentes ao parênquima tumoral, as quais representam melhor os tumores, e deixa-se em segundo plano o estroma, diminuindo a

acurácia de análise da MDV (CHARPIN et al., 2004). É, provavelmente, devido a isto que os valores de MDV foram maiores nos casos de DEO quando comparados aos CECOs. Entretanto, alguns autores defendem que a angiogênese está associada ao crescimento tumoral em estágios iniciais do seu desenvolvimento, existindo a possibilidade de outros fatores influenciarem o crescimento e proliferação do tumor, em seus estágios mais tardios (VALKOVIČ et al., 2002). Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar melhor estas observações, inclusive comparando a análise de MDV em TMA e em cortes convencionais.

Quando avaliada a correlação entre a DM, granulados e degranulados, e MDV nas lesões de DEO e CECO, esta não se mostrou estatisticamente significante ($p > 0,05$), entretanto estudos apontam uma maior MDV quando há uma maior DM em lesões de DEO e CECO (IAMAROON et al., 2003; MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008). Mesmo assim, a MDV não aumenta consideravelmente quando é atingido um determinado patamar da densidade de mastócitos, deixando estas células de atuar após atingir este limiar. Por isso, acredita-se que a correlação entre DM e MDV está limitada aos processos iniciais de tumorigênese em CECO (MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008), podendo estar mais relacionada ao desenvolvimento de outros cânceres (RANIERI et al., 2009).

Cabe ressaltar ainda que é demonstrada uma maior correlação entre a presença de Ms e MDV em áreas peritumorais (CARLINI et al., 2010; JOHANSSON et al., 2010), as quais não puderam ser avaliadas neste estudo, uma vez que a análise dos carcinomas foi feita em lâminas de TMA, abrangendo apenas tecidos alterados. Dessa maneira, fica explícita a necessidade de estudos que avaliem a densidade e status de Ms nas bordas das DEOs e em zonas peritumorais na tentativa de melhor elucidar o papel destas células nestas lesões.

Já foi amplamente discutida a participação de VEGF na angiogênese fisiológica (CAMELIET et al., 1996; ASAHARA et al., 1999) e patológica, como em neoplasias malignas (VALCOVIČ et al., 2002). Esta citocina é liberada por células do hospedeiro, entre elas os Ms (PLATE et al., 1992; PARIZI et al., 2010) e células epiteliais (PAMMER et al., 1998) e também células tumorais (BERSE et al., 1992). O VEGF é capaz de mobilizar células precursoras endoteliais da medula óssea e promover a sua diferenciação nos tecidos, aumentando, assim, a vascularização tecidual (ASAHARA et al., 1999). Acredita-se que os Ms possuem a capacidade de liberar seletivamente o VEGF recém-sintetizado, sem degranular (CAO et al., 2005; SYVÄRANTA et al., 2010), contribuindo para o crescimento

(THEOHARIDES; CONTI, 2004) e comportamento mais agressivo em CECOs (TÓTH et al., 2000; VALCOVIC et al., 2002; ARORA et al., 2003), assim como maior gravidade nos graus histológicos de lesões pré-malignas (GANDOLFO et al., 2011).

Apesar de dados anteriores apontarem uma menor expressão de VEGF, em lesões displásicas, à medida que as mesmas progridem (TAE et al., 2000; JOHNSTONE; LOGAN, 2007), no nosso trabalho a expressão da citocina não ocorreu desta maneira, com lesões moderadas apresentando os maiores EI para VEGF. No atual estudo, ao analisar a expressão de VEGF, a maioria dos casos de DEO apresentaram EI, no epitélio, igual a 0 (n=11; 84,61%) e a marcação localizava-se no citoplasma celular, como já relatado (CHENG et al., 2011). O caso que possuiu o maior EI (4) era de um paciente do sexo feminino e classificado como moderado. Ao mesmo tempo, quando avaliada as características da expressão na lâmina própria, 12 (92,3%) casos apresentaram escore imuno-histoquímico igual a 0. A marcação foi no citoplasma, principalmente de células endoteliais, de acordo com Cheng et al. (2011). O caso que possuiu escore 3 era de um paciente do sexo masculino, acometendo o assoalho de boca e classificado como DEO moderada.

Entretanto, a análise estatística demonstrou não existir diferenças significantes entre os parâmetros clínicos e histológicos (para marcação no epitélio e lâmina própria), de acordo com Johnstone; Logan (2007), bem como entre epitélio e lâmina própria (p= 0,5793). Sendo assim, estes resultados parecem demonstrar que o VEGF não exerce uma função expressiva no desenvolvimento e progressão das DEOS, tornando-se importante a realização de outros estudos para avaliar outros possíveis fatores envolvidos na patogênese destas lesões.

Entre os casos de CECO, avaliando-se o parênquima, a maioria (n= 26; 63,41%) apresentou EI igual a 0, sendo a expressão de VEGF citoplasmática (ARORA et al., 2005; CHENG et al., 2011). O caso com maior EI (9) era de um paciente do sexo masculino, classificado como CECO bem diferenciado e que apresentava como característica de agressividade apenas a infiltração perineural. A análise estatística demonstrou existir diferenças significantes entre os casos associados e não associados à infiltração perineural (p= 0,0065), possuindo as lesões associadas a esta característica um maior EI. Apesar de não terem analisado a expressão de VEGF nas células do parênquima e estroma dos CECOs, Cheng et al (2011) encontraram diferenças significantes entre as lesões que apresentavam e não possuíam envolvimento de linfonodos, bem como entre tumores de estadiamento clínico menos e mais avançados. Ao passo que Tae et al. (2000) e Arora et al. (2005) não encontraram diferenças significantes entre a presença da citocina e os parâmetros clínicos e

histológicos das neoplasias, estando de acordo com nossos achados, os quais sugerem que a expressão da citocina também não está associada a um crescimento e comportamento biológico agressivo em CECOs.

Ao mesmo tempo, a análise do estroma intratumoral das neoplasias malignas demonstrou que a maioria (n= 30; 73,17%) dos casos obtiveram EI igual a 0, sendo a expressão localizada no citoplasma de células endoteliais (ARORA et al., 2005; CHENG et al., 2011) e de fibroblastos (CARLILE et al., 2001). O caso com maior EI (12) correspondia a um paciente do sexo masculino, classificado como CECO bem diferenciado e associado à invasão vascular e perineural e de estadiamento clínico III. Os resultados da análise estatística da expressão de VEGF demonstraram existir diferenças significantes apenas entre os graus histológicos dos tumores ($p= 0,0291$), possuindo os CECOs bem diferenciados valores maiores de EI. Johnstone; Logan (2007) também encontraram diferenças significantes entre os diferentes graus histológicos tumorais estando os maiores valores em neoplasias bem diferenciadas, de acordo com os dados aqui relatados. Diante do exposto, sugere-se que a expressão de VEGF não está associada a um comportamento biológico tumoral mais agressivo, como já descrito anteriormente (JOHNSTONE; LOGAN, 2007). Ou seja, a presença do VEGF nestas lesões parece está associada à presença fisiológica desta citocina em tecidos bucais (PAMMER et al., 1998).

Entre os trabalhos publicados, existe uma controvérsia acerca da expressão de VEGF em lesões de DEOs e CECOs. Alguns estudos descrevem um aumento da expressão à medida que há progressão das DEOs para CECOs (JOHNSTONE; LOGAN, 2007; GANDOLFO et al., 2011, CHENG et al., 2011), outro demonstra uma diminuição da expressão com a progressão de uma lesão para outra (TAE et al., 2000). A análise estatística da expressão de VEGF-A para os casos de DEOs e CECOs demonstrou existir diferenças significantes apenas quando avaliada a expressão da citocina na lâmina própria e estroma dos distintos tipos histológicos das duas lesões ($p= 0,0439$), sendo os valores mais altos de EI encontrados em CECO bem diferenciado, seguido de DEO moderada, CECO moderadamente diferenciado e DEO discreta. Assim, de acordo com os resultados aqui descritos, parece não existir relação entre a expressão de VEGF e a progressão das duas doenças. Contudo, outros estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar melhor estas características, uma vez que já foi demonstrado que a discrepância destes dados pode estar associada aos diferentes marcadores imuno-histoquímicos, com distinta especificidade, utilizados nos estudos (CARLILE et al., 2001).

Ao mesmo tempo, é amplamente demonstrada a participação das Ms na produção e secreção de VEGF (AOKI et al., 2003; PARIZI et al., 2010; SYVÄRANTA et al., 2010), participando ativamente da patogênese de doenças malignas, como carcinoma basocelular (AOKI et al., 2003), melanoma (TÓTH et al., 2000) e carcinoma da mama (CONTI et al., 2007). Entretanto, este estudo é pioneiro em demonstrar a relação entre Ms e presença de VEGF em DEO e CECO. Nossos resultados demonstraram não existir correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a DM, granulados e degranulados, e expressão de VEGF nestas duas lesões. O que provavelmente demonstra que, nestas lesões, não há participação dos Ms na produção desta citocina e, provavelmente, a mesma esteja sendo produzida por outras células do meio ambiente de DEOs e CECOs.

Alguns estudos descrevem uma correlação positiva significativa entre a expressão de VEGF e MDV (ARORA et al., 2003; GANDOLFO et al., 2011), outros apontam que a citocina não está correlacionada à MDV (TAe et al., 2000; NAYAK et al., 2011) e ainda existem relatos que demonstram uma relação inversa entre a expressão de VEGF e MDV (CARLILE et al., 2001), em DEOs e CECOs. Neste estudo, para os casos de DEO, não foram encontradas correlações significantes entre a expressão de VEGF no epitélio/lâmina própria e microdensidade vascular ($p > 0,05$). Contudo, para os casos de CECO, existiu correlação significativa, positiva regular, entre a expressão de VEGF-A no parênquima tumoral e a microdensidade vascular ($r = 0,39$; $p = 0,0299$). Sendo assim, as células do parênquima podem estar contribuindo para a angiogênese tumoral, através da secreção de fatores de crescimento, o que já foi observado em outros tipos de lesões, como carcinoma de mama (VALCOVIC et al., 2002).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem sugerir que:

- Os diferentes tipos morfológicos de mastócitos (granulado e degranulado) parecem não exercer atividades distintas nas DEOS e CECOs e não observamos associação entre a presença de mastócitos, graduação histológica e parâmetros clínicos nestas lesões;
- Existiu um número estatisticamente significativo maior de DM entre as DEOs do que em CECOs;
- A MDV, nos casos de DEO e CECOs, não esteve associada aos parâmetros clínicos e graduação histológica das lesões avaliadas. Os casos de DEO apresentaram MDV significativamente maior em relação aos CECOs;
- A expressão de VEGF, no epitélio/parênquima e lâmina própria/estroma, não esteve relacionada aos parâmetros clínicos e graduação histológica em DEOs e CECOs. Não foi encontrada relação entre a expressão desta citocina e a progressão de DEO para CECO.
- Existiu associação entre a expressão de VEGF por células tumorais e MDV, o que parece demonstrar que células do parênquima participam da angiogênese em CECOs;

O *Status* dos mastócitos (granulados e degranulados), neste estudo, não estava associado à MDV em CECO e DEO.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSSON A. et al. Analysis of Mural Cell Recruitment to Tumor Vessels. **Circulation**, v. 105, p. 112-117, 2002.
- AMAGASA, T.; YAMASHIRO, M.; UZAWA, N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. **Int J Clin Oncol**, v. 16, n. 1, p. 5–14, 2011.
- AN, S. Y.; JUNG, E. J.; LEE, M. et al. Factors related to regional recurrence in early stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 1, n. 3, p. 166-170, 2008.
- AOKI, M.; PAWANKAR, R.; NIIMI, Y. et al. Mast Cells in Basal Cell Carcinoma Express VEGF, IL-8 and RANTES. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 130, n. 3, p. 216–223, 2003.
- ARORA, S.; KAUR, J.; SHARMA, C. et al. 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**, v.11, n. 6, p. 2272-2284, 2005.
- ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **EMBO J**, v. 18, n. 14, p. 3964-72, 1999.
- ARAÚJO, C. P.; GURGEL, C. A. S.; RAMOS, E. A. G. et al. Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. **J Mol Hist**, v. 41, n. 6, p. 357–365, 2010.
- BINMADI, N. O.; BASILE, J. R. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literature. **Oral Oncology**, v. 47, n. 11, p. 1005–1010, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em 30 de janeiro de 2012
- BRASIL, Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324. Acesso em 30 de janeiro de 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer (2003). Disponível em: http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=11. Acesso em 27 de outubro de 2010.
- BATISTA, A.C; RODINI, C.O; LARA, V.S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Dis**, v. 11, p. 249-254, 2005.
- BLAIR, R.J. et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. **J Clin Invest**, v. 99, p. 2691-700, 1997.

BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. et al. The role of Mast Cell Tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **The journal of histochemistry & cytochemistry**, v. 49, p. 1061-1062, 2001.

BENJAMIN, L.E.; KESHET, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: Induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 8761–8766, 1997.

BERGERS G.; SONG S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro-oncology**, v. 7, p. 452–464, 2005.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic. **Nature Reviews**, v.3, p. 401-410, 2003.

BERSE, B.; BROWN, L. F.; WATER, L. V. Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Gene is Expressed Differentially in Normal Tissues, Macrophages, and Tumors. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3,n. 2, p. 211-220, 1992.

BOYLE, J. O.; HAKIM, J.; KOCH, W. et al. The Incidence of *p53* Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer. **Cancer Research**, v.53, n. 19, p. 4477-4480, 1993.

BUTLER, J.M.; KOBAYASHI, H.; RAFII, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. **Nature**, v. 10, n. 2, p. 138-146, 2010.

BOUQUOT, J. E.; SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. Epithelial dysplasia of the oral mucosa—Diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 11–21, 2006.

BRENNAN, J. A.; BOYLE, J. O.; KOCH, W. M. et al. Association between cigarette smoking and mutation of the *p53* gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med**, v. 332, n. 11, p. 712–7, 1995.

BRADDING, P.; OKAYAMA, Y.; HOWARTH, P. H. et al. Heterogeneity of Human Mast Cells Based on Cytokine Content. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 1, p. 297-307, 1995.

CAO, J.; PAPADOPOULOU, N.; KEMPURAJ, D. et al. Human mast cells Express Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Receptors and CRH Leads to Selective Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor. **J Immunol**, v.174, n. 12, p. 7665-7675, 2005.

CAMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, n. 6573, p. 435-439, 1996.

CARLILE, J.; HARADA, K.; BAILLIE, R. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **J Oral Pathol Med**, v. 30, n. 8, p. 449–57, 2001.

- CARLINI, M. J.; DALURZO, M. C. L.; LASTIRI, J. M. et al. Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. **Human Pathology**, v. 41, n. 5, p. 697–705, 2010.
- CHAN, J.K. et al. Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 99 p. 20-25, 2005.
- CHARPIN, C.; DALES, J. P.; GARCIA, S. et al. Tumor Neoangiogenesis by CD31 and CD105 Expression Evaluation in Breast Carcinoma Tissue Microarrays. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5815-19, 2004.
- CHEN, C. et al. Gene Expression Profiling Identifies Genes Predictive of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 8, p. 2152-2162, 2008.
- CHENG, S. J.; LEE, J. J.; KOK, S. H. Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **J Formos Med Assoc**, v.110, n. 1, p. 50–57, 2011.
- CONTI, P.; CASTELLANI, M. L.; KEMPURAJ, D. et al. Role of Mast Cells in Tumor Growth. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 37, n. 4, p.315-321, 2007.
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, S. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1251p.
- COWAN, C. G.; GREGG, T. A.; NAPIER, S. S. et al. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. **Oral Diseases**, v. 7, n. 1, p. 18–24, 2001.
- COUSSENS, L. M.; RAYMOND, W. W.; BERGERS, G. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev.**, v.13, n.11, p. 1382-1397, 1999.
- DABBOUS, M. K.; WALKER, R.; HANEY, L. Mast cells and matrix degradation at sites of tumour invasion in rat mammary adenocarcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 54, n. 3, p. 459-465, 1986.
- DAWICKI, W.; MARSHALL, J. S. New and emerging roles for mast cells in host defence. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 31–38, 2007.
- DE ASSIS CALDAS PEREIRA, F.; GURGEL, C. A. S.; RAMOS, E. A. G. et al. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. **Tumor Biol**, v. 33,n. 2, p. 455–461, 2012.
- DE JONG, J. S.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. A. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. **Histopathology**, v. 36, n. 4, p. 306-312, 2000.
- DENCKAMP, J. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. **Br J Radiol**, v. 66, p. 181-196, 1993.

- DIAZ JR., E.M.; HOLSINGER, F. C.; ZUNIGA, E. R. et al. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: one institution's experience with 119 previously untreated patients. **Head Neck**, v. 25, n. 4, p. 267-73, 2003.
- DUSE, A. O.; CEAUSU, R. A.; MEZEI, T. et al. Mast cells contribute to the angiogenesis in non-Hodgkin lymphoma. An immunohistochemical study based on the relationship with microvessel density. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52, n. 3, p. 1091–1096, 2011.
- ELPEK, G.O. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 12, p. 940-944, 2001.
- EL NAGGAR, A.K.; REICHART, P.A. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. *In: In: WHO Classification of tumours. Head and Neck tumours*, IARC press, 430p, Lyon, 2005.
- EL-ROUBY, D. H. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 7, p. 559–564, 2010.
- EROL, A. Y. G.; TOKYOL, C.; OZDEMIR, O. et al. The role of mast cells and angiogenesis in benign and malignant neoplasms of the uterus. **Pathology – Research and Practice**, v. 207, n. 10, p. 618– 622, 2011.
- FAGAN, J.J.; COLLINS, B.; BARNES, L. et al. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.124,n. 6, p.637-640, 1998.
- FLEISCHMANN, A.; SCHLOMM, T.; KÖLLERMANN, J. et al. Immunological Microenvironment in Prostate Cancer: High Mast Cell Densities Are Associated With Favorable Tumor Characteristics and Good Prognosis. **The Prostate**, v. 69, n. 9, p. 976-981, 2009.
- FOX, S. B. Tumor angiogenesis and prognosis. **Histopathology**, v. 30, n. 3, p. 294-301, 1997.
- FUKUSHIMA, H. et al. Mast cells in diffuse large B-cells lymphoma; their role in fibrosis. **Histopathology**, v. 49,n.6, p. 498-505, 2006.
- GALE, N. et al. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. *In: WHO Classification of tumours. Head and Neck tumours*, IARC press, 430p, Lyon, 2005.
- GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 6, n. 2, p. 135-142, 2005.
- GANDOLFO, M. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. **Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.111, p. 486-493, 2011.
- GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell Tissue Res**, v. 314, p. 15–23, 2003.

- GROOME, P. A.; ROHLAND, S. L.; HALL, S. F. et al. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. **Oral Oncology**, v. 47, n. 7, p. 642–647, 2011.
- GRIMM, M.; LAZARIOTOU, M. Clinical relevance of a new pre-treatment laboratory prognostic index in patients with oral squamous cell carcinoma. **Med Oncol**, 2011.
- GRÜTZKAU, A. et al. Synthesis, Storage, and Release of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) by Human Mast Cells: Implications for the Biological Significance of VEGF206. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, p. 875–884, 1998.
- HANAHAN, D.; WINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HSUE, S. S.; WANG, W. C.; CHEN, C. H. et al. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 1, p. 25–9, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.
- HLATKY L, HAHNFELDT P, FOLKMAN J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 12, p. 383-393, 2002.
- HENZ, B.M. Exploring the mast cell enigma: a personal reflection of what remains to be done. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 91–99, 2007.
- HELAL, T. E. A; FADEL, M. T.; EL-THOBBANI, A. K. et al. Immunoexpression of p53 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma and oral dysplastic lesions in Yemen: Relationship to oral risk habits and prognostic factors. **Oral Oncology**, v. 48, n. 2, p. 120-124, 2011.
- ISHWAD, C.S. et al. Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. **Int J Cancer**, v.69, n. 1, p.1-2, 1996.
- IAMAROON, A.; PONGSIRIWET, S. JITTIDECHARAKS, S. et al. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 4, p. 195-9, 2003.
- IZUMO, T. Oral premalignant lesions: from the pathological viewpoint. **Int J Clin Oncol**, v. 16,n. 1, p.15–26, 2011.
- JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, C. A. WALPORT, M. et al. Basic concepts in immunology. *In: Immunology: the system in health and disease*, 6^a edição. New York: Garland Science Publishing, 2005, p.1-35.
- JANSSENS, A.S. et al. Mast cell distribution in normal adult skin. **J Clin Pathol.**, v.58, n. 3, p.285-9, 2005.

- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M. et al. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.
- JOHANSSON, A.; RUDOLFSSON, S.; HAMMARSTEN, P. et al. Mast Cells Are Novel Independent Prognostic Markers in Prostate Cancer and Represent a Target for Therapy. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 2, 2010.
- JOHNSON, N. et al. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. *In: WHO Classification of tumours. Head and Neck tumours*, IARC press, 430p, Lyon, 2005.
- JOHNSTONE, S.; LOGAN, R. M. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 42, n. 3, p. 337–342, 2006.
- KASHIWAZAKI, H.; HASSAN, N. M. M.; HAMADA, J. et al. Gene expression profile changes correlated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Odontology**, v. 96, n. 1, p. 38-43, 2008.
- KAWAKITA, D.; HOSONO, S.; ITO, H. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. **Oral Oncology**, v. 48, n. 2, p.186-91, 2012.
- KALRA, M.; RAO, N.; NANDA, K. et al. The Role of Mast Cells on Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 2, p. 190-196.
- KOBAYASHI, H.; ISHIZUKA, T.; OKAYAMA, Y. Human mast cells and basophils as sources of cytokines. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 9, p. 1205-1212, 2000.
- KYZAS, P. A.; AGNANTIS, N. J.; STEFANO, D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. **Virchows Arch**, v. 448, n. 6, p. 768–775, 2006.
- KUMAR, V; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Neoplasia. *In: Robins and Contran: Patologic basis of disease*. 7^a edição, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, p. 269-343.
- LAMBERT, R.; SAUVAGET, C.; DE CAMARGO CANCELA, M. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 8, p. 633-41, 2011.
- LEE, J. J. et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 5, p. 1702-1710, 2000.
- LEE, J. J.; HUNG, H. C.; CHENG, D. S. J. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 4, 2006.
- LESCH, C.A.; SQUIER, C.A.; CRUCHLEY, A. The Permeability of Human Oral Mucosa and Skin to Water. **J Dent Res**, v. 68, n. 9, p. 1345-1349, 1989.
- LI, S.; TIAN, H.; YUE, W. et al. Metastasis-associated Protein 1 Nuclear Expression is Closely Associated with Tumor Progression and Angiogenesis in Patients with Esophageal Squamous Cell Cancer. **World J Surg**, v. 36, n. 3, p. 623-631, 2012.

LINDMARK, G.; GERDIN, B.; SUNDBERG, C. et al. Prognostic Significance of the Microvascular Count in Colorectal Cancer. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 2, p. 461-466, 1996.

MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY, K. M. Mast cell in tumor growth: angiogenesis, tissue remodeling and immune-modulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 1, p. 19-26, 2009.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, 2008.

MARGARITescu, C.; SIMIONESCU, C.; MOGOANTA, L. et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. **Rom J Morphol Embryol**, v. 49, n. 3, p. 321-6, 2008.

MENDEZ, E.; CHENG, C.; FARWELL, D. G. et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. **Cancer**, v. 95, n. 7, p. 1482-94, 2002.

METZ, M.; MAURER, M. Mast cells-key effector cells in immune responses. **Trends Immunol**, v. 28, n. 5, p. 234-241, 2007.

METCALFE, D.D. Mast cells and mastocytosis. **BLOOD**, v. 112, n. 4, p. 946-956, 2008.

MENAKURU, S. R.; BROWN, N. J.; STATON, C. A. et al. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 12, p. 1961 – 1966, 2008.

MICHALIDOU, E.Z; MARKOPOULOS, A.K; ANTONIADES, D.Z. Mast Cells and Angiogenesis in Oral Malignant and Premalignant Lesions. **The Open Dentistry Journal**, v.28, p. 126-132, 2008.

MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 91, n. 6, p. 622-635, 2001.

MOHTASHAM, N.; BABAKOOHI, S.; NEJAD, J. S. et al. Mast cell density and angiogenesis in oral dysplastic epithelium and low- and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 68, n. 5, p. 300–304, 2010.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S. B. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature**, v. 8, n. 8, p. 618-631, 2008.

NAYAK, S.; GOEL, M. M.; CHANDRA, S. et al. VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v. 48, n. 3, p. 233-9, 2012.

NAWROZ, H.; RIET, P. V. D.; HRUBAN, R. H. et al. Allelotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1152-1155, 1994.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

OLIVEIRA-NETO, H. H.; LEITE, A. F.; COSTA, N. L. et al. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: Possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncology**, v. 43, n. 5, p. 484–490, 2007.

PAMMER, J.; WENINGER, W. G.; MILDNER, M. et al. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. **J. Pathol.**, v. 186, n. 2, p. 186–191, 1998.

PANNONE, G.; SANTORO, A.; PAPAGERAKIS, S. et al. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. **Infect Agent Cancer**, v. 6, n. 4, p. 1-11, 2011.

PITTONI, P.; TRIPODO, C.; PICONESE, S. et al. Mast Cell Targeting Hampers Prostate Adenocarcinoma Development but Promotes the Occurrence of Highly Malignant Neuroendocrine Cancers. **Cancer Res**, v.71, n. 18, p. 5987-5997, 2011.

QUINN, T. P.; PETERS, K. G.; VRIES, C. et al. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. **Cell Biology**, v. 90, n. 16, p. 7533-7537, 1993.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924-34, 2009.

RAGIN, C.C.R.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S.M. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. **J Dent Res**, v. 86, n. 2, p. 104-114, 2007.

RANIERI, G.; AMMENDOLA, M.; PATRUNO, R. et al. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. **International Journal of Oncology**, v. 35, n. 1, p. 115-120, 2009.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

RODINI, C.O.; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: Possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 1, p. 59-63, 2004.

ROJAS, I. G.; SPENCER, M. L.; MARTINEZ, A. Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 5, p. 268–273, 2005.

SALVEN, P. et al. Interleukin-1 α (IL-1 α) promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. **FASEB J.**, v. 16, n. 11, p. 1471-3, 2002.

SETHI, S.; LU, M.; KAPKE, A. et al. Patient and Tumor Factors at Diagnosis in a Multi-Ethnic Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cohort. **Journal of Surgical Oncology**, v. 99, n. 2, p. 104–108, 2009.

SINICROPE, F. A.; RUAN, S. B.; CLEARY, K. R. et al. bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 55, n. 2, p. 237-241, 1995.

SYVÄRANTA, S.; HELSKE, S.; LAINE, M. et al. Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Mast Cells and Myofibroblasts: A Novel Self-Perpetuating Angiogenic Pathway in Aortic Valve Stenosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 6, p. 1220-1227, 2010.

SARANATH D. **Contemporary Issues in Oral Cancer**. New Delhi: Oxford University, 2000. p. 30-71.

SHARMA, S.; SHARMA, M. C.; SARKAR, C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. **Histopathology**, v. 46, n. 5, p. 481-489, 2005.

SHIMA, D. T.; SAUNDERS, K. B.; GOUGOS, A.; D'AMORE, P. A. Alterations in gene expression associated with changes in the state of endothelial differentiation. **Differentiation**, v. 58, n. 3, p. 217-226, 1995.

SHIVAMALLAPA, S. M.; VENKATRAMAN, N. T.; SHREEDHAR, B. et al. Role angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. **Int J Oral Sci**, v. 3, n. 4, p. 216-224, 2011.

SHAH, S. I.; YIP, L.; GREENBERG, B.; et al. Two Distinct Regions of Loss on Chromosome Arm 4q in Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 126, n. 9, p.1073-1076, 2000.

SILVEIRA, E. J. D.; LOPES, M. F. F.; SILVA, L. M. M. et al. Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 3, p. 233-238, 2009.

SOINI, Y.; SALO, T.; SATTA, J. Angiogenesis Is Involved in the Pathogenesis of Nonrheumatic Aortic Valve Stenosis. **Hum Pathol**, v.34, n. 8, p. 756-63, 2003.

SOUDRY, E.; PREIS, M.; HOD, R. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. **Clin. Otolaryngol**, v. 35, n. 4, 307–312, 2010.

SOUZA, R.L.; FONSECA-SILVA, T.; SANTOS, C. C. O. et al. Association of mast cell, eosinophil leucocyte and microvessel densities in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 57, n. 6, p. 796–805, 2010.

SPEIGHT, P.M. Update on Oral Epithelial Dysplasia and Progression to Cancer. **Head and Neck Pathol**, v. 1, n. 1, p. 61–66, 2007.

SUGÁR, L.; BANOCZY, J. **Follow-up Studies in Oral Leukoplakia**, v. 41, n. 2, p. 289-293, 1969.

SWELAM, W.; IDA-YONEMOCHI, H.; MARUYAMA, S et al. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. **Virchows Arch**, v. 446, n. 6, p. 653-662, 2005.

TAE, K.; ADEL, K.; EL-NAGGAR et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density in Head and Neck Tumorigenesis. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 7, p. 2821-8, 2000.

THEOHARIDES, T.C.; CONTI, P. Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. **TRENDS in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 235-241, 2004.

TOMITA M et al. Association of mast cells with tumor angiogenesis in esophageal squamous cell Carcinoma. **Diseases of the Esophagus**, v. 14, n. 2, p. 135-138, 2001.

TÓTH, T. et al. Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelia growth factor. **Human Pathology**, v. 31, n. 8, p. 955-960, 2000.

TSANTOULIS, P.K.; KASTRINAKIS, N.G.; TOURVAS, A.D. et al. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 43, n. 6, p. 523– 534, 2007.

VAUPEL, P.; KALLINOWSKI, F.; OKUNIEFF, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. **Cancer Res**, v. 49, n. 23, p. 6449-6465, 1989.

VALKOVIĆ, T. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. **Virchows Arch**, v. 440, n. 6, p. 583–588, 2002.

VERMEULEN PB, GAPARINI G, FOX SB et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. **European Journal of Cancer**, v. 30, n. 12, p. 1564–1579, 2002.

VILLA, A.; VILLA, C.; ABATI, S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. 3, p. 253–256, 2011.

WANG Z. Involvement of potential pathways in malignant transformation from Oral Leukoplakia to Oral Squamous Cell Carcinoma revealed by proteomic analysis. **Genomics**, v. 10, p. 1-17, 2009.

WEIJERS, M.; SNOW, G. B.; BEZEMER, P. D. The clinical relevance of epithelial dysplasia in the surgical margins of tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma: an analysis of 37 patients. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 1, p. 11–15, 2002.

YANO, H. et al. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. **Gastric Cancer**, v. 2, n. 1, p. 26-32, 1999.

ZHANG, L.; CHEUNG JR., K. J.; LAM, W. L. et al. Increased Genetic Damage in Oral Leukoplakia from High Risk Sites: Potential Impact on Staging and Clinical Management. **Cancer**, v. 91, n. 11, p. 2148-55, 2001.

