

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CARLA ARIOTTI

RELAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE VEGFR1, VEGFR2,  
CD31 E KI-67 COM O COMPORTAMENTO E PROGNÓSTICO DE QUEILITE  
ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÁBIO

Porto Alegre  
2014

CARLA ARIOTTI

RELAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE VEGFR1, VEGFR2,  
CD31 E KI-67 COM O COMPORTAMENTO E PROGNÓSTICO DE QUEILITE  
ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÁBIO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Odontologia da Faculdade de  
Odontologia da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Cirurgião-  
Dentista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manoela  
Domingues Martins

Porto Alegre  
2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Ariotti, Carla

Relação da marcação imunohistoquímica de VEGFR1, VEGFR2, CD31 e KI-67 com comportamento e prognóstico de Queilite Actínica e Carcinoma Espinocelular de Lábio / Carla Ariotti. -- 2014.

52 f.

Orientadora: Manoela Domingues Martins.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Câncer bucal. 2. Queilite. I. Martins, Manoela Domingues, orient. II. Título.

Aos meus pais, Darci e Ires: Obrigada por tudo. Consegui graças a vocês, que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos. Muito obrigada pelo amor, apoio e esforço. Vocês são o que eu tenho de melhor na vida.

À minha irmã, Cristina: amiga e companheira de todas as horas.  
Muito obrigada pela ajuda e pela força.

À minha irmã, Carina: obrigada por ter sido minha melhor amiga.  
Obrigado por ser minha estrela guia. Um anjo que cuida de mim. Te levo sempre comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por torcerem pela minha vitória sempre. Pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos – Diego, Daniela, Bruna – por terem sido meu suporte em muitos momentos, vocês foram muito importantes nessa conquista e continuam sendo importantes na minha vida. Agradeço pela cumplicidade acima de tudo.

À minha colega e amiga Bruna Schmidt, pelo companheirismo nestes 5 anos, pela cumplicidade, pela paciência e pela amizade verdadeira.

À minha vizinha e, mais que isso, amiga, Grasielle Benini: obrigada por ter sido o ombro amigo nos momentos mais difíceis e nos mais alegres.

Ao Jonathan, por me fazer bem. Nossas vidas se cruzaram há pouco tempo, mas tenho muito a agradecer. Obrigado.

Aos colegas da Patologia, ICs, mestrandos, doutorandos, professores e funcionários, pela ajuda e amizade. Todos vocês contribuíram para que este trabalho fosse concluído. Agradeço em especial às colegas, e mais que isso amigas, Gabriela Salvadori e Vivian Petersen Wagner pela ajuda incansável na realização deste trabalho, as “baladas científicas” foram muito mais leves com a alegria e carinho de vocês.

À querida Flávia, pela disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. Marco Antônio Trevizani Martins, obrigado pela leveza do ensinar. Aprendi que nada nos faz mais feliz do que fazer o que gostamos.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Manoela Domingues Martins, o meu muito obrigada por cada momento de convívio. Obrigada primeiramente por ser minha orientadora. Obrigada pela ajuda, pelo carinho, paciência e dedicação. Ser mestre não é apenas lecionar, é ser amigo e instrutor, guia e companheiro, é caminhar com o aluno. Minha mestre amiga, pela lição do saber, pela orientação constante e por ter me auxiliado em cada luta, meu sincero agradecimento.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

*“Uma meta sem um plano  
Não passa de um desejo.”  
(Antoine de Saint-Exupéry)*

## RESUMO

ARIOTTI, Carla. **Relação da marcação imunoistoquímica de VEGFR1, VEGFR2, CD31 e Ki-67 com o comportamento e prognóstico de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio.** 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

A angiogênese patológica se caracteriza por um processo multifásico controlado por diferentes fatores e está relacionada com o desenvolvimento de tumores malignos. O objetivo do presente estudo foi determinar as contribuições dos receptores do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR1 e VEGFR2) durante a carcinogênese labial, investigar a correlação destes biomarcadores com a microdensidade vascular (MDV) e o perfil proliferativo dos casos, e a associação com fatores de risco, parâmetros clínico-patológicos e sobrevida. Prontuários médicos de 27 casos de queilite actínica (QA) e 46 casos de carcinoma espinocelular de lábio (CECL) foram analisados. As lesões foram classificadas de acordo com o padrão histopatológico e submetidas a marcação imunoistoquímica para VEGFR1, VEGFR2, CD31 e Ki-67. Foi analisada toda a extensão epitelial nos casos de QA e o fronte de invasão nos casos de CECL. As lâminas imunomarcadas por VEGFR1 e VEGFR2 foram submetidas à análise semi-quantitativa baseada no percentual de células epiteliais e inflamatórias positivas, enquanto que a marcação de CD31 e Ki-67 foi analisada de maneira quantitativa a fim de determinar a MDV e o índice proliferativo, respectivamente. Uma maior expressão de VEGFR1 foi observada nas células epiteliais de QA quando comparadas com o CECL ( $p < 0.001$ ). Um aumento linear de VEGFR1 foi observado nas células inflamatórias a partir dos casos de QA até o CECL ( $p < 0.001$ ). Uma maior expressão de VEGFR2 foi observada nas células epiteliais e inflamatórias na QA quando comparado com o CECL ( $p = 0.02$ ). Não foram encontradas associações entre VEGFR1 e VEGFR2 com a MDV, índice proliferativo e parâmetros clínico-patológicos. Nos casos de QA foi possível identificar uma correlação positiva significativa entre a MDV e o índice proliferativo ( $p = 0.02$ ). Os achados do presente estudo indicam que o VEGFR1 e VEGFR2 estão expressos durante a carcinogênese labial. A ativação do VEGFR1 e VEGFR2 nas células epiteliais e inflamatórias parece ser um evento precoce na carcinogênese labial e podem regular esta via de forma autócrina e parácrina.

Palavras –chave: Câncer bucal. Queilite.

## ABSTRACT

ARIOTTI, Carla. **Immunohistochemical relation between VEGFR1, VEGFR2, CD31 e KI-67 with behaviour and prognosis of actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma.** 2014. 52f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Pathological angiogenesis represents a multistep process controlled by different factors and is related to the development of malignant tumors. The aim of the present study was to determine the contributions of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR1 and VEGFR2) in lip carcinogenesis, to investigate the correlation of these biomarkers with microvessel density (MVD) and proliferative profile of cases as well as the association with risk factors, clinico-pathologic parameters and overall survival. Medical records of 27 cases of actinic cheilitis (AC) and 46 cases of low lip squamous cell carcinoma (LLSCC) were analyzed. Lesions were classified according histological pattern and submitted to immunostaining for VEGFR1, VEGFR2, CD31 and Ki-67. For AC, the entire epithelial length was analyzed and for LLSCC the invasive front of tumor. VEGFR1 and VEGFR2 immunostained sections were submitted to a semi-quantitative analysis based on the percentage of positive epithelial and inflammatory cells, while CD31 and Ki-67 were submitted to quantitative analysis to determine the MVD and proliferative labeling index, respectively. A higher expression of VEGFR1 was observed in epithelial cells of AC when compared to LLSCC ( $p < 0.001$ ). A linear increase of VEGFR1 in inflammatory cells was noted from AC to LLSCC ( $p < 0.001$ ). Higher expression of VEGFR2 was observed in epithelial and inflammatory infiltrate of AC compared to LLSCC ( $p = 0.02$ ). There was no association between VEGFR1 and VEGFR2 with MVD, proliferative labeling index and clinico-pathological parameters. In AC, a significant positive correlation was observed between MVD and proliferative labeling index ( $p = 0.02$ ). Our findings indicate that both receptors are expressed during lip carcinogenesis. The activation of VEGFR1 and VEGFR2 in epithelial and inflammatory cells appears to be an early event during lip carcinogenesis and may be involved in autocrine and paracrine regulatory pathways.

Keywords: Oral cancer. Cheilitis.



## SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS .....	8
2	OBJETIVOS .....	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3	ARTIGO CIENTÍFICO .....	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
	REFERÊNCIAS .....	40
	ANEXO - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	47
	APÊNDICE - FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS.....	52

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde houve 14,1 milhões de casos novos de câncer, 8,2 milhões de mortes por câncer e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer, em todo o mundo, em 2012. Destes, cerca de 390.000 casos são de câncer em região de cabeça e pescoço, dos quais 274.000 estão localizados em boca, ficando esta neoplasia com o 6º lugar entre os cânceres em todo o corpo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Câncer bucal refere-se ao grupo de neoplasias malignas que ocorrem em boca, sendo 90% destas representadas pelo carcinoma espinocelular (CEC) (AIKEN, 2013; BATISTA et al., 2010). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, em 2014, estima-se 11.540 novos casos de câncer bucal em homens e 3.920 em mulheres (SILVA, 2013). Esta doença vem sendo considerada um importante problema de saúde em todo o mundo devido a sua grande mortalidade e pelas morbidades geradas, como a deficiência funcional e estética (MARGARITescu et al., 2008).

O carcinoma espinocelular de lábio (CECL) corresponde aproximadamente 25% dos carcinomas de cavidade bucal perfazendo 0,6 -1,0% de todos os tumores malignos em humanos (GARCIA-MONTESINOS-PEREA; VALBERNAL; SAIZ-BUSTILLO, 2005; VUKADINOVIC et al., 2007). O CECL quando comparado aos CEC de língua e outras localizações em boca, exhibe comportamento clínico menos agressivo e melhor prognóstico devido ao seu padrão de crescimento e invasão mais localizados e baixos índices de metástases regionais (BATISTA et al., 2010). A etiopatogênese do CECL é multifatorial e está associada, principalmente, com a exposição solar e com o tabagismo (VUKADINOVIC et al., 2007).

O processo de carcinogênese envolve várias etapas descritas como iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica do tumor. A iniciação representa a fase na qual ocorre lesão ao DNA por carcinógenos. Na promoção, as células iniciadas, após a ação co-carcinógenos, são estimuladas a proliferar e passar o dano genético às células-filhas até que se formem clones de células mutadas que invadam o tecido adjacente caracterizando as neoplasias malignas (CALIFANO, 1999). No modelo aceito atualmente para descrever a carcinogênese em boca, pode-se verificar alterações celulares e arquiteturais

que são chamadas de desordens potencialmente malignas (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). Estas lesões apresentam, ao longo do seu curso, um risco aumentado de desenvolver um câncer quando comparado ao tecido normal. Nos lábios, a queilite actínica (QA) é a principal lesão cancerizável e, assim como o CECL, tem como principal agente etiológico a exposição crônica à radiação ultravioleta (UV) e o consumo de tabaco, sendo o processo de desenvolvimento destas doenças denominado de fotocarcinogênese labial (HUBER, 2010; MALASPINA et al., 2011; ROSSOE et al., 2011).

O Brasil é um país tropical sobre o qual incidem altos níveis de raios UV e sua população apresenta atividades ocupacionais que estão relacionadas com exposição solar crônica, como agricultura, pecuária e pesca (BATISTA et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2011). A prevalência de QA no Brasil varia de 2,6% a 39,6% da população (ABREU et al., 2006; DE SOUZA LUCENA et al., 2012; JORGE JUNIOR et al., 1991; MARTINS-FILHO; DA SILVA; PIVA, 2011; MIRANDA et al., 2012) e o índice de progressão das QA para CECL varia entre 10 a 20% (DOS SANTOS et al., 2003). As alterações epiteliais observadas na QA e no CECL têm sido estudadas na busca de fatores de diagnóstico e prognóstico. O principal fator relacionado, até o momento, com a evolução da QA para CECL é a presença de displasia epitelial. Marcadores de proliferação celular, de apoptose, de inflamação, dentre outros, tais como: Ki-67, p53, bcl-2, COX, TGF- $\beta$ 1 (ARAUJO et al., 2010; GARCIA-MONTESINOS-PEREA et al., 2005; GONZALEZ-MOLES et al., 2010; MARTINEZ et al., 2005; RAJU et al., 2005; ROJAS et al., 2012; SCHLIEPHAKE, 2003; SITTEL et al., 1999; SOUZA et al., 2011) vêm sendo estudados para compreender o comportamento destas lesões.

A angiogênese é um processo no qual há formação de uma rede vascular a partir de capilares pré-existentes. Este passo é fundamental para o crescimento, a invasão e a produção de metástases de tumores sólidos. Quando os tumores sólidos atingem um volume de 1 a 2 mm<sup>3</sup>, seu crescimento passa a ser diretamente dependente da angiogênese (GIMBRONE et al., 1972; MATTER, 2001). Isto ocorre, porque as células tumorais devem estar a até 200 micrômetros de distância de um vaso para receberem oxigênio e nutrientes para sobreviver (CARMELIET; JAIN, 2000; HOLMGREN; O'REILLY; FOLKMAN,

1995). Logo, a carcinogênese encontra-se diretamente relacionada com a neovascularização, a qual decorre do desequilíbrio entre os fatores angiogênicos secretados pelas células neoplásicas (RAVI et al., 1998).

Uma ampla variedade de fatores de crescimento e citocinas tem sido relatadas como estimuladoras da angiogênese, tais como fator de crescimento fibroblástico (FGF - do inglês *fibroblast growth factor*), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – do inglês *vascular endothelial growth factor*) e fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas (PDEC GF – do inglês *platelet-derived endothelial cell growth factor*), os quais são liberados pelas células tumorais e tidos como estimuladores da proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial em carcinomas de células escamosas, entre eles os da cavidade bucal. Os estudos são claros em demonstrar que a neutralização destes fatores inibe o crescimento tumoral, sendo possível sua utilização como indicador prognóstico de metástase (DOUGLAS, 2000; MARGARITESCU et al., 2009).

Os VEGFs formam uma família de glicoproteínas muito importante na regulação do crescimento e desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos. Nos mamíferos, esta família é composta pelos VEGFs A, B, C e D além do PIGF (do inglês *placenta growth factor*). Cada VEGF apresenta uma função específica: o VEGF-A é responsável pela angiogênese, quimiotaxia para macrófagos e granulócitos e vasodilatação; o VEGF-B é responsável pela angiogênese embrionária; o VEGF-C é responsável pela linfangiogênese; o VEGF-D é responsável pela linfangiogênese ao redor dos bronquíolos pulmonares; e o PIGF é responsável pela vasculogênese. O VEGF-E e VEGF-F não são encontrados em mamíferos, podemos encontrá-los em alguns vírus e no veneno de algumas cobras respectivamente. Seus efeitos são mediados predominantemente pela ligação aos receptores de VEGF (VEGFR – do inglês *vascular endothelial growth factor receptors*) que são divididos em: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (BAPTISTA, 2010).

O VEGF-A (mais conhecido como VEGF) é o tipo mais estudado e desempenha diferentes funções a partir da ativação de 2 receptores tirosina quinases denominados VEGFR1 (Flt-1) e VEGFR2 (KDR em humanos /Flk-1 em ratos) (DE VRIES et al., 1992; SHIBUYA, 1995; SHIBUYA; CLAESSION-WELSH, 2006). Esta ligação resulta em uma cascata de sinalização que regula

várias funções nas células endoteliais, incluindo proliferação, migração e diferenciação. Todavia, tem sido descrito que a ação do VEGF e seus ligantes não está apenas limitada às células endoteliais, mas também a uma ação autócrina entre as células tumorais em diferentes neoplasias malignas (KYZAS; STEFANO; et al., 2005; LALLA et al., 2003).

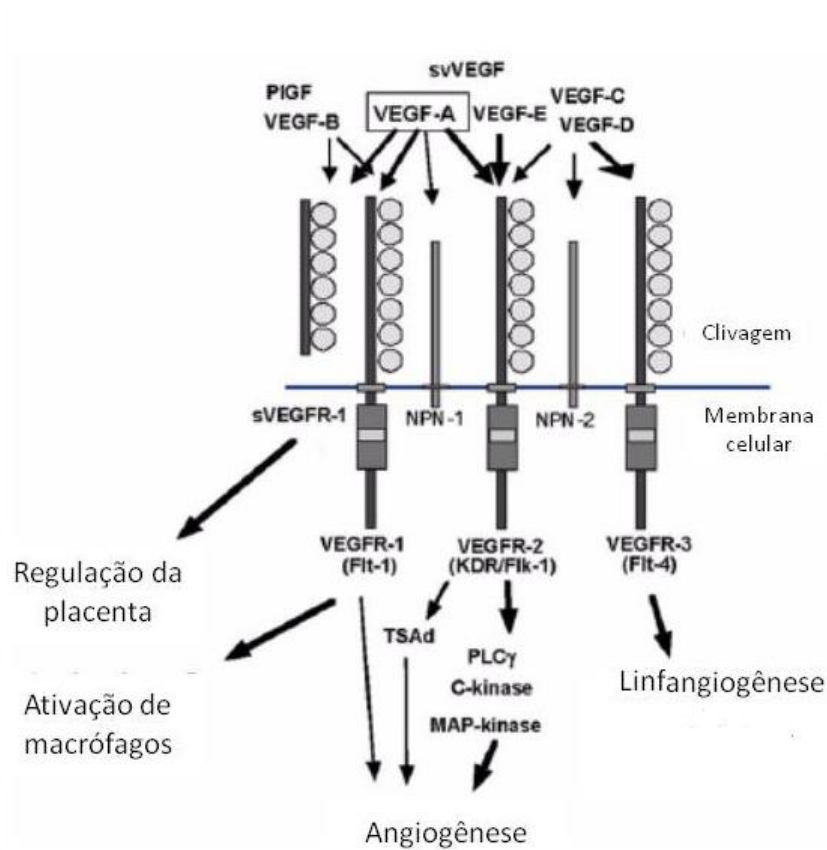
A superexpressão de VEGF tem sido relacionada com metástase linfática (BOONKITTICHAROEN et al., 2008; MINETA et al., 2000; P; RHYS-EVANS; ECCLES, 2001), recorrência (SMITH et al., 2000), perda de diferenciação histológica (JOHNSTONE; LOGAN, 2007), pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço (KYZAS; CUNHA; IOANNIDIS, 2005; MAEDA et al., 1998; MINETA et al., 2000; SMITH et al., 2000).

Estudos sobre a expressão de VEGF em mucosa bucal normal, em displasias epiteliais e seu papel potencial na progressão do CEC são contraditórios. Alguns autores relatam que tanto o epitélio bucal normal quanto o epitélio bucal displásico não apresentam expressão de VEGF ou que esta expressão foi significativamente menor do que no epitélio neoplásico (DENHART et al., 1997; LI et al., 2005). Johnstone e Logan (2007) indicaram uma regulação positiva significativa da expressão do VEGF durante a transição a partir de epitélio bucal normal, seguido de displasia epitelial até a formação do CEC, entretanto nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão de VEGF e os diferentes graus de displasia.

O VEGFR1 é expresso amplamente no endotélio dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário, mas pouco expresso no tecido adulto. O VEGFR2 tem sua expressão predominante na vasculatura sanguínea no tecido adulto e a sua ligação com o VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D é considerada a via principal de sinalização de angiogênese. O VEGFR3 se expressa no endotélio linfático no tecido adulto normal, além de ser amplamente encontrado no endotélio de vasos sanguíneos em algumas feridas (processo de reparo) e tumores (FAUSTINO, 2010; YEN et al., 2011). Estudos demonstram a existência de VEGFR em linhagem de células tumorais (LALLA et al., 2003; NEUCHRIST et al., 2003) e em células neoplásicas de melanoma, sarcoma de Kaposi e câncer de mama (HEROLD-MENDE et al., 1999; MASOOD et al., 2001; MASOOD et al., 1997; RYDEN et al., 2003). No caso de câncer bucal, estudos demonstram

que as células tumorais têm a capacidade de expressar o VEGF (JOHNSTONE; LOGAN, 2007; KYZAS; STEFANO; AGNANTIS, 2004; LI et al., 2005; SHANG; LI, 2005), porém a análise de VEGFR1 e o VEGFR2 é escassa. Kyzas, Stefanou e Agnantis (2004) sugerem que há uma via autócrina de VEGF, mediada pelo VEGFR2 e que a maior expressão de VEGF e VEGFR2 está correlacionada com a maior proliferação do tumor. Margaritescu et al. (2009) mostrou que os VEGFRs estão presentes em células tumorais do CEC de boca e em outras células do microambiente do tumor.

Figura 1 - Família de VEGFs, seus receptores (VEGFRs) e as vias para a estimulação da angiogênese.



Fonte: Adaptado de SHIBUYA, 2006.

O crescimento dos tumores sólidos e as metástases dependem da neovascularização e, baseado neste princípio, drogas inibidoras de angiogênese foram desenvolvidas e mostraram resultados efetivos em alguns tumores sólidos tais como melanoma (PETERSON et al., 2004), mieloma múltiplo (ZANGARI et

al., 2004), câncer renal (LARA et al., 2003), câncer de pulmão (JOHNSON et al., 2004). Essas drogas inibidoras de angiogênese atuam tanto na via autócrina quanto na via parácrina do VEGF (KYZAS et al., 2005). Assim, tem sido observado que as drogas inibidoras de angiogênese são promissoras no tratamento de diversas neoplasias. A maior classe de drogas que bloqueiam a angiogênese são os inibidores de tirosina quinase que têm como alvo o receptor de VEGF (VEGFR) ou a própria molécula de VEGF (CABEBE; WAKELEE, 2007). Esta forma de terapia está bem embasada no princípio de que esta via é uma das principais reguladoras da angiogênese (DVORAK, 2002).

Além dos fatores envolvidos na angiogênese, a análise morfológica da neoformação vascular tem sido realizada para compreender o comportamento de diferentes neoplasias. Dentre os diversos métodos de estudo de neoformação vascular, a análise de microdensidade vascular (MDV - do inglês *microvessel density*) tem sido muito utilizada e consiste na contagem de vasos nos campos com maior concentração vascular (“hot spots”) (WEIDNER, 1995; WEIDNER et al., 1993). Uma das moléculas utilizadas para estudar angiogênese em tumores sólidos é o CD31, uma glicoproteína transmembrana (molécula de adesão celular plaqueta-endotélio) que pode ser utilizada como um marcador pan-endotelial sensível em tecidos tumorais e normais. Esta proteína também tem sido evidenciada em células inflamatórias (MIETTINEN; LINDENMAYER; CHAUBAL, 1994). No que diz respeito a análise de MDV em CEC de boca, não existe um consenso na literatura quanto à sua utilização como fator preditor de metástases e evolução clínica em lesões bucais malignas, tendo, alguns autores, achado correlação positiva (GALLO et al., 1998; GASPARINI et al., 1993; KLIJANIENKO et al., 1995; WILLIAMS et al., 1994) e outros nenhuma correlação (ARTESE et al., 2001; DRAY; HARDIN; SOFFERMAN, 1995; EROVIC et al., 2005; GLEICH et al., 1997). Desde 1989, Folkman et al. sugeriram que a angiogênese inicia-se em estágios precoces da carcinogênese, antes da formação do tumor porém, poucos trabalhos dedicam-se a estudar a angiogênese em desordens potencialmente malignas em boca.

Outro importante aspecto muito utilizado para a compreensão do comportamento de neoplasias malignas é o perfil proliferativo tumoral, através de marcadores do ciclo celular. Dentre esses, o mais utilizado e aceito é a imunomarcagem da proteína Ki-67. Esta representa uma proteína não-histônica

de meia-vida curta, que está expressa em quase todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose). Sendo o seu aumento indicativo de aumento da proliferação celular (MIRANDA, 2007). Alguns estudos sobre os marcadores de proliferação celular em lesões da mucosa bucal demonstraram que a expressão de Ki-67 está correlacionada com o comportamento das lesões (KOVESI; SZENDE, 2003; VALENTE et al., 1994; ZOELLER et al., 1994). Todavia, o papel desta proteína como marcador prognóstico em carcinoma espinocelular de boca ainda não está completamente definido, sendo as variações metodológicas as prováveis responsáveis pelos diferentes resultados observados na literatura.

Analisando a marcação de Ki-67 em CEC de boca, Dragomir et al. (2012) mostraram correlação entre o grau de displasia de desordens potencialmente malignas e o grau de diferenciação dos carcinomas, apresentando altos valores e intensidade de marcação na área do *front* de invasão tumoral. Salvadori et al. (2014) evidenciaram que a porcentagem de células positivas para o Ki-67 em QA e CECL aumentou conforme a severidade das alterações histopatológicas e que o carcinoma possui perfil proliferativo mais elevado e encontrou correlação significativa do Ki-67 tanto em QA como CECL com o consumo de tabaco e recidiva do tumor.

A avaliação do prognóstico tumoral tem importância ímpar, pois mesmo os tumores de igual estadiamento clínico apresentam, em alguns casos, comportamentos diferentes. Portanto, a aplicação de métodos complementares de diagnóstico e classificação, como a graduação histológica é fundamental para a determinação da tendência quanto ao curso evolutivo da lesão. Atualmente, vários trabalhos vêm sendo produzidos com o objetivo de estabelecer como ocorre essa transformação maligna, utilizando diferentes marcadores celulares relacionados com a carcinogênese bucal (SCHUSSEL; PINTO; MARTINS, 2011). O papel de fatores relacionados a angiogênese, em especial o VEGF, vem sendo estudado no câncer bucal procurando estabelecer associação com o comportamento neoplásico (ROBSON et al., 1996). Entretanto, o papel do VEGFR1 e VEGFR2 na carcinogênese de lábio e sua relação com a angiogênese e proliferação celular em QA e CECL ainda não foi estudado.



## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a imunomarcção do VEGFR1 e VEGFR2 e relacioná-los com a microdensidade vascular (CD31) e proliferação celular (Ki-67) na carcinogênese labial.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Correlacionar a graduação histológica dos casos de QA e de CEC com a imunomarcção pelo VEGFR1, VEGFR2, CD31 e Ki-67.

Correlacionar a evolução dos casos de QA e CEC com a imunomarcção pelo VEGFR1, VEGFR2, CD31 e Ki-67.

Correlacionar os dados de fatores de risco (fumo e exposição solar) com a imunomarcção pelo VEGFR1, VEGFR2, CD31 e Ki-67.

Correlacionar as marcações de VEGFR1, VEGFR2 com as de CD31 e Ki-67.

### 3 ARTIGO CIENTIFICO

#### **Expression of VEGFR1 and VEGFR2 and their correlation with CD31 and Ki-67 in actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma**

Carla Ariotti<sup>1</sup>, Vivian Petersen Wagner<sup>1</sup>, Gabriela Salvadori<sup>1</sup>, Marco Antônio Trevizani Martins<sup>2</sup>, Luise Meurer<sup>3</sup>, Manoela Domingues Martins<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Oral Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

#### **Corresponding Author:**

Manoela Domingues Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503

CEP: 90035-003

Santana, Porto Alegre RS

Brazil

Phone: 55-51-33085011

[manomartins@gmail.com](mailto:manomartins@gmail.com)

\*\*\* A ser submetido ao periódico Tumor Biology – Fator de Impacto 2.52 - Qualis Capes 2013 – A1

## Abstract

Pathological angiogenesis represents a multistep process controlled by different factors and is related to the development of malignant tumors. The aim of the present study was to determine the contributions of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR1 and VEGFR2) in lip carcinogenesis, to investigate the correlation of these biomarkers with microvessel density (MVD) and proliferative profile of cases as well as the association with risk factors, clinico-pathologic parameters and overall survival. Medical records of 27 cases of actinic cheilitis (AC) and 46 cases of low lip squamous cell carcinoma (LLSCC) were analyzed. Lesions were classified according to histological pattern and submitted to immunostaining for VEGFR1, VEGFR2, CD31 and Ki-67. For AC, the entire epithelial length was analyzed and for LLSCC the invasive front of tumor. VEGFR1 and VEGFR2 immunostained sections were submitted to a semi-quantitative analysis based on the percentage of positive epithelial and inflammatory cells, while CD31 and Ki-67 were submitted to quantitative analysis to determine the MVD and proliferative labeling index, respectively. A higher expression of VEGFR1 was observed in epithelial cells of AC when compared to LLSCC ( $p < 0.001$ ). A linear increase of VEGFR1 in inflammatory cells was noted from AC to LLSCC ( $p < 0.001$ ). Higher expression of VEGFR2 was observed in epithelial cells and inflammatory infiltrate of AC compared to LLSCC ( $p = 0.02$ ). There was no association between VEGFR1 and VEGFR2 with MVD, proliferative labeling index and clinico-pathological parameters. In AC, a significant positive correlation was observed between MVD and proliferative labeling index ( $p = 0.02$ ). Our findings indicate that both receptors are expressed during lip carcinogenesis. The activation of VEGFR1 and VEGFR2 in epithelial and inflammatory cells appears to be an early event during lip carcinogenesis and may be involved in autocrine and paracrine regulatory pathways.

Keywords: Oral cancer. Cheilitis.

## Introduction

The development of lower lip squamous cell carcinoma (LLSCC) is often preceded by well-defined potentially malignant disorders named actinic cheilitis (AC). Both lesions have been associated to tobacco smoking and chronic exposure ultraviolet radiation (UV) [1]. It is estimated that 95% of lower lip cancer cases originate from AC [2]. The squamous cell carcinoma development is regulated by a balance between the pro- and antitumorigenic activities promoted by the epithelial cells as well as the influence of surrounding microenvironment like immunity cells and vascular component/angiogenesis [3, 4].

Angiogenesis is a complex process involved in the development of new blood vessels, by the division and migration of preexisting vasculature [5]. The growth and metastasis of solid tumors depends on the development of pathological angiogenesis [6, 7]. It represents a multistep process controlled by a variety of factors of which the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and its receptors play a pivotal regulator role [8, 9].

The VEGF cytokine family plays a key pro-angiogenic role in vascular development [8]. In mammals the VEGF is composed of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PIGF). The most studied member is VEGF-A (generally referred to as VEGF) which activates two tyrosine kinase receptors, VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (KDR in humans/Flk-1 in mice) [10-13]. The VEGF/VEGFR interaction results in signaling cascades that regulates many biological responses. In endothelial cell, it results in proliferation, migration, and differentiation [14, 15]. However, it is possible that its VEGF/VEGFR action is not limited in the paracrine, endothelial dependent pathway, but also extends towards a potential autocrine action between cancer cells in various malignancies, including head and neck squamous cell carcinoma [16, 14, 17, 11, 18, 15, 19]. Inhibition of this pathway could be used to treat cancer and there are various anti-angiogenic agents currently in clinical development [20, 21].

Preclinical models have showed the importance of angiogenesis during the progressive transformation of normal basal keratinocytes to cutaneous squamous cell cancer [22, 23]. Also, the evaluation of angiogenesis may be of prognostic significance in tumor progression [11] and important for the development of therapies targeted to the inhibition of VEGF signaling [24]. Some studies showed that oral and head and neck squamous cell carcinoma have the

capacity to express VEGF and VEGFR's on tumor cells [25, 26, 19] serving not only for vessel sprouting, but for other functions as tumor proliferation and aggressiveness [27, 11].

The interactions of the various VEGF/VEGFR systems in the tumor microenvironment are clearly complex, and further investigations are still needed for a complete understanding of their functions. Also, there are few studies revealing the expression of VEGFR1 and VEGFR2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) [28, 17, 29, 26, 30, 19] and no data regarding VEGFRs expression in potentially malignant disorders. Based on these aspects, the primary aim of the present study was to analyze VEGFR1 and VEGFR2 labeling in AC and LLSCC and their correlation with microvessel density and lesion proliferative profile. Additionally, association of these markers with risk factors, clinico-pathologic parameters and overall survival were investigated.

## **Material and Methods**

### ***Study population***

Ninety-six cases of AC and 176 cases of LLSCC diagnosed between 1996 and 2010 were selected from the archives of the Pathology Laboratory of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Human Research Ethics Committee approval n.55.5154).

Patient records were evaluated and information on gender, age, ethnicity, occupation, exposure to tobacco, exposure to solar radiation, clinical evaluation, extension, TNM staging and follow-up information (clinical outcome and survival time) were obtained from medical records. The follow-up period was defined as the time from diagnosis until the last visit to the hospital. Following the application of the inclusion criteria (complete information cited above in the medical records and adequate amount of material for the analysis of specimens), 27 cases of AC and 46 cases of LLSCC were included in the study. Cases of normal mucosa were included.

### ***Histopathological analysis***

For cases of AC, histological sections stained with hematoxylin-eosin (HE) and grading was based on the criteria proposed by the World Health Organization (2005) [31] for the determination of the presence and degree of epithelial

dysplasia. In cases of LLSCC, the histological sections were graded according to the criteria described by Bryne et al. [32] which consider the tumor invasive front.

### ***Immunohistochemical analysis***

Immunohistochemical stainings were performed on 3- $\mu$ m tissue sections. Sections were deparaffinized in xylene and dehydrated in descending grades of ethanol. Antigen retrieval was performed prior to incubation of primary antibody. The primary antibodies, clone, sources, antigen retrieval, dilutions and incubation times were as follows: VEGFR1 (FLT1, INVITROGEN, low pH solution in a water bath at 90°C for 18h, 1:50, 1h); VEGFR2 (FLT1, INVITROGEN, low pH solution in a water bath at 90°C for 18h, 1:50, 1h); Ki-67 (MIB-1, DAKO, low pH solution in a water bath at 90°C for 18h, 1:50, 1h); and CD31 (polyclonal, Abcam, low pH solution in a water bath at 90°C for 18h, 1:50, 2h). The EnVision (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) was employed as the detection system. The sections were then incubated with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Novocastra, Newcastle, UK) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative controls were obtained by replacing the primary antibodies with non-immune serum. The positive controls for Ki-67, VEGFR1, VEGFR2 and CD31 were respectively sections of human appendix, breast cancer for both VEGFR1 and VEGFR2 and ovarian tissue. Brown staining, regardless of intensity, was considered positive. Slide analysis was performed by pathologists who were unaware of the demographic, clinical and behavioral data of the lesions.

Two pathologists using a double-headed microscope scored VEGFR1 and VEGFR2 immunostained sections. Cytoplasmic expression was categorized semi-quantitatively on the basis of percentage of positive cells in a 200x magnification as follows: score 0- 0%, score 1 - 1-50% of positive cells and score 2 – 51-100% of positive cells (Adapted from Dhakal et al. [33]). For AC cases, epithelial cells and the adjacent inflammatory infiltrate were analyzed. In cases of LLSCC labeling was analyzed in the tumor and in inflammatory cells at the invasive front.

The microvessel density (MVD) was studied through CD31 labeling following the method described by Weidner et al. [34]. Slides were initially evaluated at a 40x or 100x magnification in order to identify the areas with higher vascular density (hotspots). Images of the selected fields were captured at 400x

magnification using a conventional light microscope (CX41RF model, Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) coupled to a camera (QColor 5, Coolet, RTV, Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) and connected to a computer (Dimension 5150, Dell, Porto Alegre, RS, Brazil). Vascular structures that had brownish marking lumen and were clearly separated from other adjacent vascular structures were counted. All hotspots of each case were counted. The total of vessels counted in each case was divided by the number of hotspots providing the mean microvessel density for the case.

Cases of AC and LSCC immunostained for Ki-67 were submitted to morphometric quantification. For AC, the entire epithelial length was analyzed and for LSCC, the invasive front of tumor was analyzed. Images of the selected fields were captured at a magnification of 400x and were analyzed using the QCapture software program, version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., Surrey, DC, Canada). Ki-67 was counted and classified based on Martinez et al. [35]. The number of positive cells was assessed in each case and 1000 cells were counted. The results were expressed as the percentage of 1000 positive cells (mean and standard deviation).

### ***Statistical analysis***

Continuous variables were expressed as mean (standard deviation) and categorical variables as a percentage of the number of cases. Differences between groups were evaluated using chi-squared test followed by Fisher's exact test or Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests for non-parametrical data or Logistic regression. Pearson's correlation coefficient was performed to test the correlation between different biomarkers. All statistical calculations were performed using the SPSS 20.0 program. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

### ***Demographic, clinical and follow-up characteristics***

Table 1 displays the demographic and clinical characteristics of the sample. The clinical aspects of AC and LLSCC were divided into

spot/plaque/nodule and ulcerated lesions. The AC group exhibited a predominance of spot/plaque/nodule lesions, whereas the LLSCC exhibited more ulcerated lesions ( $p < 0.001$ ). Pain was reported by a few patients in either group; ulcerated lesion was the clinical presentation in such cases (Table 1).

The treatment for all patients with AC involve the daily use of sunscreen. Moreover, 13 patients (48.2%) were submitted to partial lesion removal, five (18.5%) were submitted to total lesion removal, five (18.5%) were submitted to cryotherapy and four (14.8%) were submitted to a non-surgical approach. LLSCC patients were treated with surgery in 39 cases (84.8%) and surgery plus radiotherapy in seven cases (15.2%) (Table 2).

Mean follow-up of the patients with AC was 5.2 years (range: 3 to 10 years). Four cases of AC (14.8%) transformed into LLSCC. All these lesions were ulcerated, found in smokers who did not use sunscreen, smaller than  $< 2$  cm and treated with partial removal (Table 2). Moreover, the transformation occurred in less than five years of monitoring. Regarding epithelial dysplasia in the four cases that transformed into LLSCC, one (3.7%) had mild dysplasia, one (3.7%) had moderate dysplasia and two (7.4%) exhibited severe dysplasia.

Logistic regression analysis comparing sun exposure among patients with AC and lesion behavior throughout follow up revealed that patients exposed to UV radiation had a 20.2-fold higher chance of AC transforming into LLSCC ( $p = 0.03$ ). Moreover, patients who did not use sunscreen had a 15.7-fold greater chance of AC transforming into LLSCC ( $p = 0.04$ ).

In the follow-up of cases of LLSCC, four patients (8.6%) experienced a recurrence of the condition. All such cases occurred in smokers who did not use sunscreen and recurrence occurred in less than five years of monitoring.



**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of patients with AC and LSCC

Demographic/clinical characteristics	AC (n=27)	LSCC (n=46)	p-value
<b>Age</b>	65.37±15.34	63.23±13.54	p=0.90
<b>Gender</b>			
Male	22 (81.5 %)	39 (84.8 %)	p=0.71
Female	5 (18.5%)	7 (15.2 %)	
<b>Ethnicity</b>			
Caucasian	27 (100%)	46 (100 %)	-
<b>Residence</b>			
Urban	22 (81.5 %)	34 (73.9 %)	p=0.46
Rural	5 (18.5%)	12 (26.1 %)	
<b>Sun exposure</b>			
Yes	22 (81.5 %)	28 (60.9 %)	p=0.06
No	5 (18.5%)	18 (39.1 %)	
<b>Tobacco consumption</b>			
Yes	18 (66.7%)	32 (69.6 %)	p=0.79
No	9 (33.3%)	18 (30.4 %)	
<b>Clinical aspects</b>			
Ulcer	8 (29.6%)	36 (78.3 %)	p<0.001
Spot/Plaque/nodule	19 (70.4%)	10 (21.7 %)	
<b>Pain</b>			
Yes	2 (7.4%)	9 (19.6 %)	p=0.16
No	25 (92.6%)	37 (80.4 %)	
<b>TNM</b>			
I/II	-	29 (63 %)	
III/IV	-	17 (37 %)	

**Table 2.** Description of lesion size and treatment of AC according to clinical outcome.

		Clinical outcome (Number of cases)			Total
		Absence of dysplasia	Presence of dysplasia	Transformation into LSCC	
Lesion Size	< 2cm	6	14	4	24
	2-4cm	1	1	0	2
	>4 cm	1	0	0	1
	Total	8	18	4	27
Treatment	Partial Removal	0	9	4	13
	Total Removal	5	0	0	5
	Sunscreen use	0	4	0	4
	Cryotherapy	2	3	0	5
	Total	9	16	4	27

### ***Histopathological analysis***

The evaluation of epithelial lining and degree of epithelial dysplasia of 27 cases of AC showed that 5 (18.5%) cases had absence of dysplasia (non-dysplastic), 10 (37%) mild dysplasia, 6 (22.2%) cases had moderate dysplasia and 6 (22.2%) had severe dysplasia.

In the 46 cases of LSCC, the tumor front was evaluated and 31 (67.4%) cases showed low-level of malignancy, 12 (26.1 %) moderate and 3 (6.5 %) high degree.

No correlation between the histological graduation of AC and LSCC was observed with clinical and demographic features.

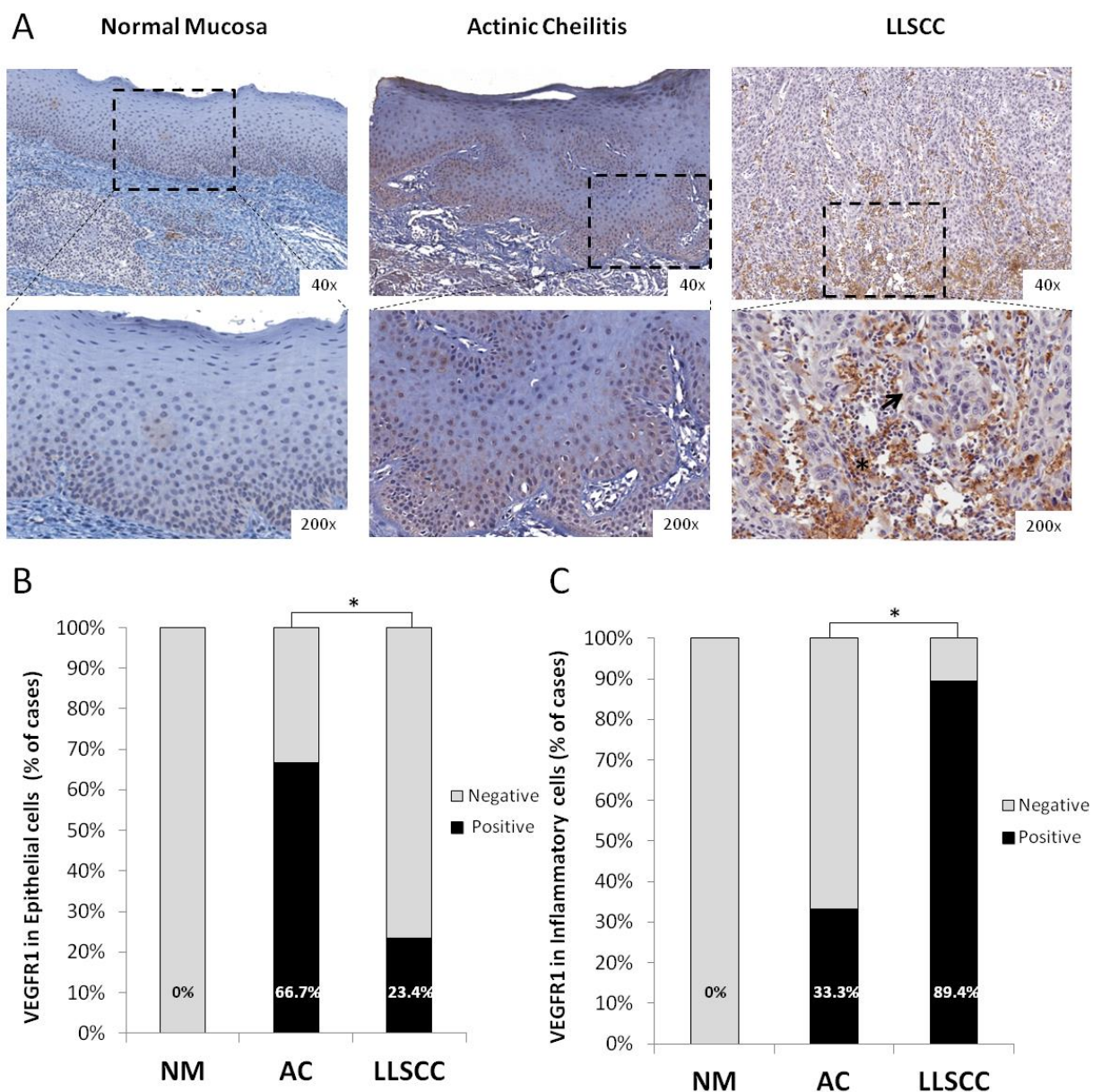
### ***Immunohistochemical analysis***

#### ***VEGFR1***

VEGFR1 was not observed in epithelial nor in the inflammatory cells of normal mucosa (Figure 1). In AC this protein was detected in epithelial cells in 66.7% (n=18) of cases. Of these, 48.1% exhibited  $\leq 50\%$  of cells labeled and 18.5% with  $\geq 51\%$  of cells positive (Figure 1). Most of positive cells were situated in basal and suprabasal layers. VEGFR1 in inflammatory infiltrate adjacent to epithelia of AC was positive only in 33.3% (n=9). Higher VEGFR1 expression was observed in inflammatory infiltrate of AC with moderate/severe dysplasia when compared to no/mild dysplasia (p=0.04).

In LLSCC cases the VEGFR1 labeling in tumor cells of invasive front was observed only in 23.4% (n=11) with 19.1% showing  $\leq 50\%$  of cells labeled and 4.3% with  $\geq 51\%$  of cells positive (Figure 1). VEGFR1 in inflammatory infiltrate of invasive front was positive in 89.4% of cases (n=42) with 85.1% (n=40) exhibiting  $\leq 50\%$  of inflammatory cells marked (Figure 1).

High expression of VEGFR1 in epithelial tissue was observed in AC (p<0.001) and higher expression of VEGFR1 was observed in LLSCC inflammatory infiltrate cells (p<0.001) (Figure 1). Both in AC and LLSCC there was no statistically significant correlation between VEGFR1 labeling and age, gender, sun exposure, tobacco consumption, lesion size, epithelial histological analysis and follow-up.



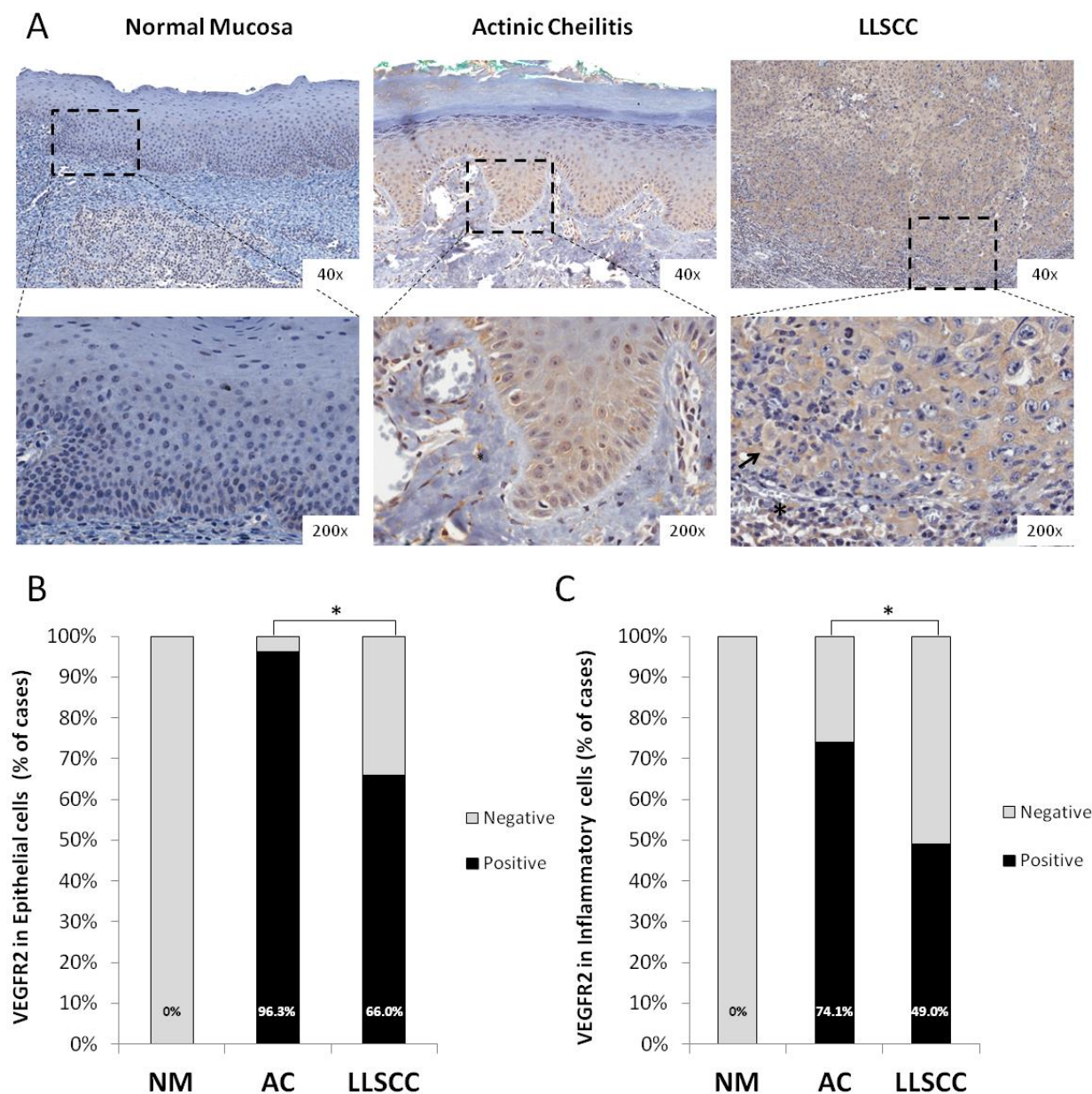
**Figure 1.** VEGFR1 analysis. (A) Representative examples of VEGFR1 expression in normal mucosa, AC and LLSCC. Note VEGFR1 high expression in inflammatory infiltrate in LLSCC (\*) and labeling absence in tumor cells (arrow). (B) Analysis of VEGFR1 expression in epithelial cells in normal mucosa, AC (n=27) and LLSCC (n=46). AC presented a higher value of positive cases (66.7%) when compared to LLSCC (\*  $p < 0.001$  – Chi-squared Test). (C) Analysis of VEGFR1 expression in inflammatory infiltrate in normal mucosa, AC (n=27) and LLSCC (n=46). LLSCC presented the highest value of positive cases (\* $p < 0.001$  – Chi-squared Test), indicating a linear increase of this protein expression during lip carcinogenesis.

**VEGFR2**

VEGFR2 was not observed in epithelial nor in the inflammatory cells of normal mucosa (Figure 2). VEGFR2 was positive in epithelial cells in 96.3% (n=23) of AC and the most cases (85.2%) showed  $\geq 51\%$  of the cells labeled. In inflammatory infiltrate adjacent to AC epithelia the VEGFR2 was observed in 74.1% of cases (n=20) with the majority (66.7%) exhibiting  $\geq 51\%$  of the cells marked (Figure 2).

In cases of LLSCC the VEGFR2 expression in tumor cells of invasive front was positive in 66% of cases (n=31) of which, 49% (n=23) exhibited  $\geq 51\%$  of the cells labeled. In inflammatory infiltrate of LLSCC front of invasion the VEGFR2 was positive 49% (n=23) with 25.5% (n=12) showing  $\leq 50\%$  of cells labeled and 23.4% (n=11) with  $\geq 51\%$  of the cells marked. (Figure 2).

Higher expression of VEGFR2 in epithelial and inflammatory infiltrate was observed in AC compared with LLSCC ( $p=0.02$ ) (Figure 2). No statistically significant correlation in cases of AC and LLSCC was observed between VEGFR2 labeling and age, gender, sun exposure, tobacco consumption, clinical tumor stage, histological analysis and follow-up.

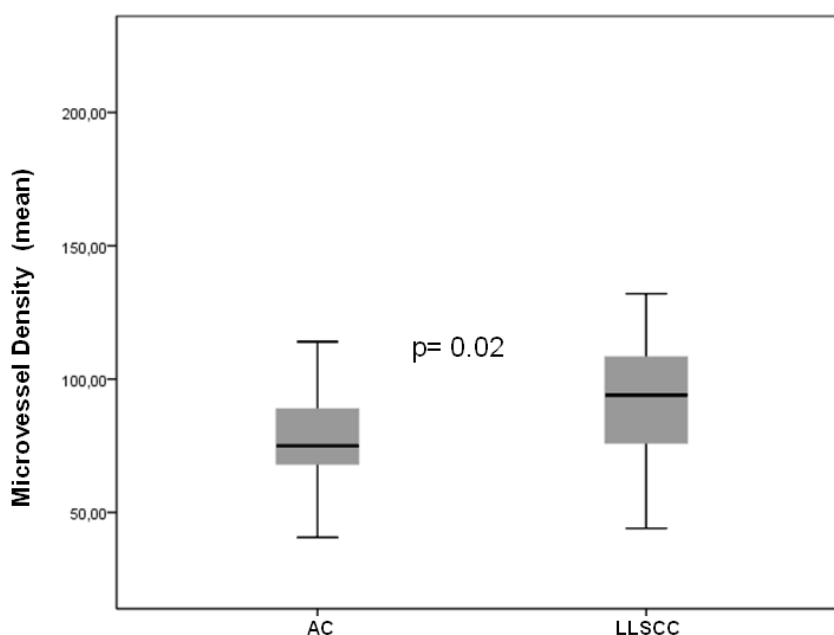


**Figure 2.** VEGFR2 analysis. (A) Representative examples of VEGFR2 expression in normal mucosa, AC and LLSCC. Note VEGFR2 cytoplasmic expression LLSCC tumor cells (arrow) and also a positive expression in inflammatory infiltrate (\*). (B) Analysis of VEGFR2 expression in epithelial cells in normal mucosa, AC (n=27) and LLSCC (n=46). AC presented a higher value of positive cases (96.3%) when compared to LLSCC (\*p=0.02 - Chi-squared Test). (C) Analysis of VEGFR2 expression in inflammatory infiltrate in normal mucosa, AC (n=27) and LLSCC (n=46). AC presented a higher value of positive cases (74.1%) when compared to LLSCC (\*p=0.02 - Chi-squared Test).



### **Microvessel Density (CD31)**

The MVD was obtained using the CD31 labeling. All cases of AC and LLSCC were positive (Figure 4 A and C). In AC the mean of MVD was  $64.3 \pm 30.4$  and in LLSCC, was  $95.8 \pm 40.7$ . There was difference in CD31 labeling between AC and LLSCC, with a higher MVD in LLSCC cases ( $p=0.02$ ) (Figure 3). Regarding histological grading of both lesions, CD31 showed a uniform distribution between the histological grades studied.



**Figure 3.** Microvessel density in AC and LLSCC. LLSCC presented a higher value of MVD compared to AC ( $p=0.02$  - Mann-Whitney U Test).

### **Proliferative labeling index (Ki-67)**

All cases were positive for Ki-67 antibody (Figure 4 A and C). AC showed different percentage of positive cells according to the evaluation of epithelial lining and degree of epithelial. The mean of Ki-67 positive cells in AC was 19.1% ( $\pm 4.7$ ) in non-dysplastic, 22,4% ( $\pm 3.8$ ) in mild dysplasia, 44.5% ( $\pm 9.6$ ) in moderate dysplasia and 56.4% ( $\pm 12.6$ ) in severe dysplasia and a significant correlation with histopathological grading ( $p < 0.01$ ) and evolution ( $p = 0.004$ ) was observed. Higher levels of Ki-67 were detected in massive tobacco smokers, in cases with higher grades of epithelial dysplasia and in those AC cases that had malignant transformation.

The LSCC exhibited an association between the percentage of Ki-67 positive cells and the graduation of tumor. Low-level malignancy cases showed 22.9% ( $\pm 8.9$ ) of cells positive to Ki-67, moderate and high level of malignancy in combination showed a mean of 47.1% ( $\pm 16.8$ ) of positive cells. To allow the samples statistical analysis, moderate and high level cases were taken together based in the small number of cases in the higher level of malignancy. A significant correlation between Ki-67 with tobacco consumption ( $p=0.009$ ), histopathological graduation ( $p<0.01$ ) and tumor recurrence ( $p<0.01$ ) was observed. The higher the levels of Ki-67 were detected in massive consumption of tobacco, higher the levels of malignancy and in cases of tumor recurrence.

#### ***Correlation of VEGFR1 and VEGFR2 with Microvessel Density***

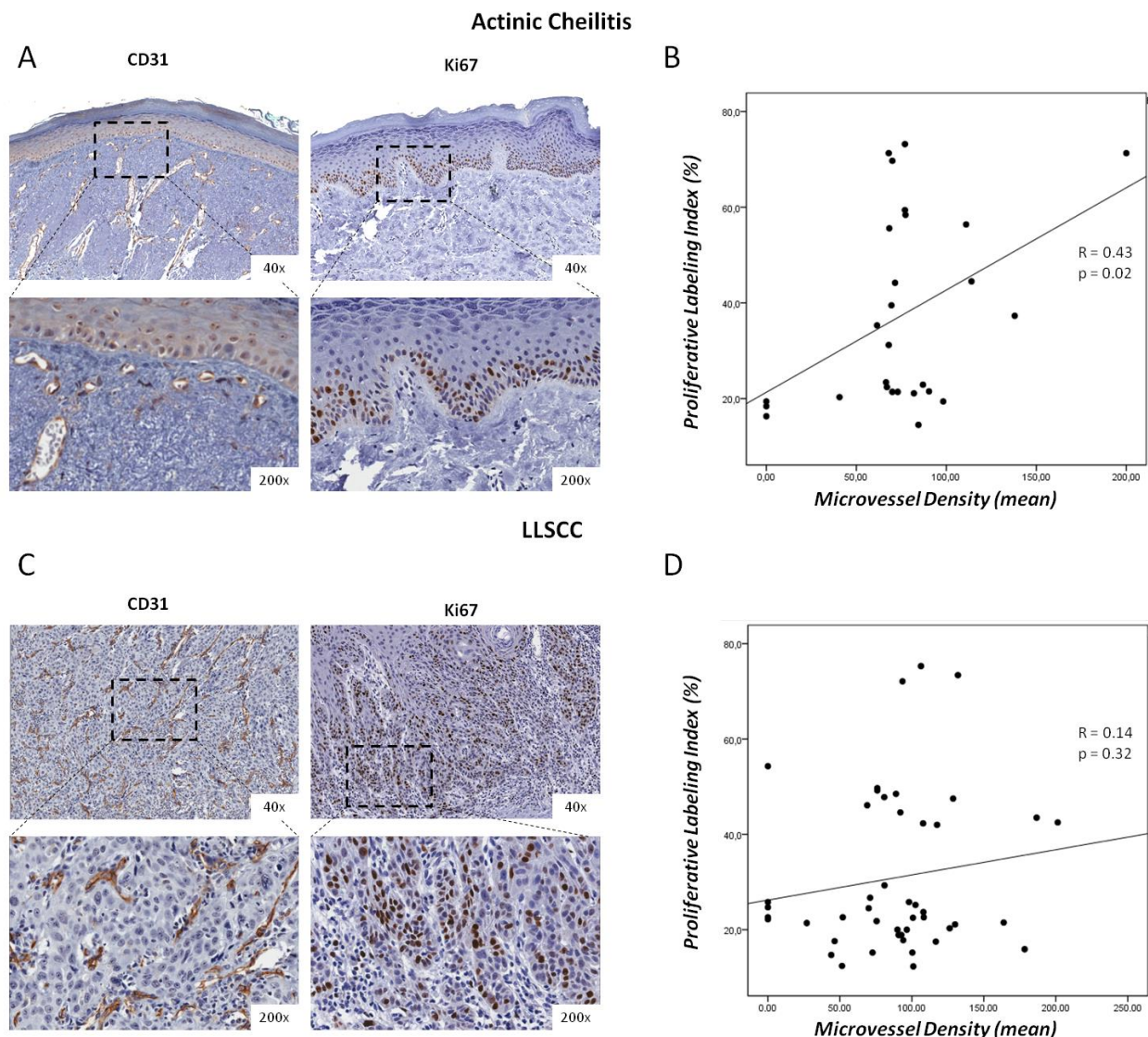
In AC there was no correlation between MVD and VEGFR1 and VEGFR2 labeling in both epithelial and inflammatory infiltrate. In LLSCC a similar result was observed with no difference between the MVD and all VEGFR1 and VEGFR2 labeling ( $p>0.05$ ).

#### ***Correlation of VEGFR1 and VEGFR2 with Proliferative Labeling Index***

There was no correlation between Ki-67 proliferative labeling index with VEGFR1 or VEGFR2 labeling in AC and LSSC.

#### ***Correlation of Microvessel Density and Proliferative Labeling Index***

In AC a significant Pearson's correlation was observed between the MVD and Ki-67 proliferative labeling index ( $p=0.02$ ;  $R=0.43$ ). An increase in Ki-67 labeling in epithelial cells was correlated higher MVD. In LLSCC this correlation was not observed ( $p=0.32$ ;  $R=0.14$ ) (Figure 4).



**Figure 4.** Correlation of Microvessel Density and Proliferative Labeling Index. (A) Representative examples of AC expressing CD31 and Ki-67. (B) Scatter plot showing a positive correlation between MVD and proliferative labeling index in AC (Pearson's correlation coefficient – 0.43,  $p=0.02$ ). An increase in the proliferative profile of cases was correlated with an increase in MVD. (C) Representative examples of LLSCC expressing CD31 and Ki-67. (D) Scatter plot showing no correlation between MVD and proliferative labeling index in LLSCC ( $p=0.32$ ).

## Discussion

Angiogenesis represents a multistep and critical process involved in different pathological conditions. During tumor development angiogenesis plays a central role in growth, invasion and metastatic spread of solid neoplasm [36, 17]. However, not all the tumors are angiogenic from the beginning of their natural



evolution. The gain of angiogenic properties is related to the angiogenic switch that reflects the ability of tumor and inflammatory cells to stimulate neovascularization in tumor microenvironment [37]. In OSCC previous studies have suggested that VEGFRs signaling may play an important role on angiogenesis by stimulation and regulation of tumor cells through autocrine and/or paracrine mechanisms [19]. However, the role of VEGFR during the different stages of oral carcinogenesis was never analyzed. Here, we investigated the impact of VEGFR1 and VEGFR2 labeling in MVD and proliferative profile of AC and LLSCC. We found alterations in the expression pattern of these receptors during the lower lip carcinogenesis indicating the participation of VEGFR pathway through this process.

VEGF is important angiogenic growth factors that have been described in oral potentially malignant disorders and also OSCC [38, 39]. Its overexpression is observed not only by endothelial and tumor cells, but also in other stromal and recruited host cells in oral carcinoma microenvironment [38-40]. In some studies the presence of VEGF indicates an unfavorable impact on overall survival [41]. The activity of VEGF depends on their link with VEGFR followed by diverse responses due to the different signaling cascades activation [27]. In endothelial cell, the VEGFR's stimulation results in cell proliferation, migration, and differentiation [14, 15]. Some studies have also described the presence of VEGFR1 and VEGFR2 in tumor cells such as melanoma, ovarian, pancreatic and oral carcinoma [36, 28, 27, 42, 19] and in stromal and immune cells in tumor site [19].

In the present study VEGFR1 and VEGFR2 were not observed in normal oral mucosa but were detected in epithelial and inflammatory cells of AC and LLSCC. The presence of these receptors on tumor cells suggests that they are involved in an autocrine regulatory loop centered in VEGF that is not completely understood. In epithelial cells, VEGFR2 was more expressed than VEGFR1 in both AC and LLSCC cases. The inverse regulation of VEGFR1 and VEGFR2 in tumor associated endothelial cells have been previously described [43], however the reason for this inverse profile of VEGFRs in tumor cells remains uncertain, and different manners and timing of modulation mechanisms on cell growth could be related with this profile [44, 19]. It is now generally accepted that VEGFR2 is the major mediator of the mitogenic, angiogenic and permeability-enhancing

effects of VEGF [11]. Previous studies point that VEGFR1 overexpression is not frequent in head and neck squamous cell carcinoma, especially in those situated in the lower lip [27, 19]. Cases of OSCC with metastatic lymph node present lower labelling of VEGFR1, but higher VEGFR2 [19] and co-overexpression of VEGF and VEGFR2 is related with worse survival in patients with oral and larynx squamous cell carcinoma [45]. These authors suggest that VEGF/VEGFR pathway presents an important role in tumor aggressiveness, and the lack of this in LLSCC could explain in part the less aggressive profile of this tumor [27].

The contribution of VEGF/VEGFR during transition from normal oral mucosa through differing degrees of dysplasia, to invasive OSCC is currently disputed due to conflicting results within the literature [46-48]. Exposure to carcinogenic agents, particularly UV radiation for LLSCC, is not restricted to a specific site, leading to a cancerization field prone for tumor development [46]. An interesting finding of our study was that the epithelial labeling of both VEGFR1 and VEGFR2 were observed in higher number of AC cases than LLSCC. In parallel, a smaller number of MVD was observed in AC than LLSCC. These characteristics of lower lip carcinogenesis were described for the first time in our study. One possible explanation for these results is centered in the tissue effect of UVB chronic irradiation. Has been described that the skin after chronic UVB irradiation present pronounced degeneration of elastin and collagen fibres, which might result in a defect of the structural integrity needed to maintain functional vasculature, thereby leading to the marked regression of blood vessels in photoaged skin [49]. In similar way, AC that is caused by UVB exposure, exhibit different level of epithelial and connective tissue alterations including elastosis and vascular modification. Probably, due to the small number of vessels in connective tissue in AC, the epithelial cells maintained the VEGFR1 and VEGFR2 expression higher in an attempt to preserve the vasculature stimulation through a paracrine way. Increased amount of VEGFR in epithelial cells distant of vessels have been interpreted as an adaptive response of the cells to lower perfusion in this area and relatively lower oxygenation, trying to stimulate an increase in angiogenesis via VEGF [19]. Besides, Li et al. [50] have demonstrated that UV radiation is capable to induce VEGF expression by skin keratinocytes in a time and dose-dependent manner, suggesting that this mechanism is related to UV-induced carcinogenesis.

To investigate whether VEGFR1 and VEGFR2 are involved in lip carcinogenesis influence the tissue vascularization, the data of both receptors expression were correlated with MVD. We observed higher MVD value in LLSCC compared to AC. This result was expected based in fact that solid tumors are capable to synthesize its own vascular network with the aim to supply nutrients through new vessels for continue growing [51]. Previous reports have demonstrated an association between higher MVD and VEGF expression in OSCC [51, 40], although in the present study no correlation between MVD and VEGFRs expression in epithelial and inflammatory cells was found. These results indicate that VEGFR1 and VEGFR2 are related to tissue angiogenesis but may not be the unique receptors involved in this process.

Tumor microenvironment presents a determinant role in this process once the angiogenic stimuli such as VEGF are produced not only from tumor cells, but also by stromal and inflammatory cells [51, 28]. In the present study the expression of VEGFR1 and VEGFR2 was observed in inflammatory cells of AC and LLSCC suggesting that these cells might be involved in a paracrine and autocrine pathway during tumoral angiogenic process. Analyzing together the epithelial and inflammatory cells labeling it is possible to suggest that in AC, that represents the early stages of lip cancerization, the epithelial cells have more pronounced angiogenic role. By the other side, in LLSCC the inflammatory tumor microenvironment cells seem to act synergistically and cooperatively with tumor cells in angiogenic process.

Other important aspects analyzed in the present study were the correlation between VEGFRs, MVD and Ki-67 with risk factors, clinico-pathologic parameters and overall survival. VEGFR1, VEGFR2 and MVD did not present any relation with the reported parameters. Ki-67 showed positive association with histological grade, tobacco consumption and tumor recurrence in LSCCC. In AC the Ki-67 exhibited an association with histological grade. Beside, only in AC the MVD present a positive correlation with proliferative profile indicating a vascular modification associated to epithelial cell behavior modification in early stage of lip carcinogenesis. By the other way, in LLSCC an increase of angiogenesis was observed but not related to Ki-67 modification. This aspect could be explained by the fact that LLSCC is well differentiated carcinoma that presents low proliferative profile and good clinical behavior. OSCC in other localizations have showed an

increase of angiogenesis associated with higher proliferative profile and worse prognosis [52, 53].

This study was the first to analyze the participation of VEGFR1 and VEGFR2 in lip carcinogenesis. Our findings indicate that both receptors are expressed during lip carcinogenesis in epithelial cells as well as in immunity cells. Interaction of VEGF receptors during oral carcinogenesis are very complex and remain incompletely understood. Nevertheless, overexpression of these receptors cannot be associated with tumor progression nor worse prognosis. Further investigations on the effective participation of VEGFRs are necessary especially for the development of future therapies involving this pathway.

The present findings indicate that VEGFR1 and VEGFR2 are expressed during lip carcinogenesis in epithelial cells as well as in immunity cells and may have a relation with tumoral immune response. The activation of VEGFR1 and VEGFR2 in epithelial and inflammatory cells appears to be an early event during lip carcinogenesis and may be involved in autocrine and paracrine regulatory pathways.

## References

1. Savage NW, McKay C, Faulkner C. Actinic cheilitis in dental practice. *Australian dental journal*. 2010;55 Suppl 1:78-84. doi:10.1111/j.1834-7819.2010.01202.x.
2. dos Santos JN, de Sousa SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araujo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *Journal of cutaneous pathology*. 2003;30(4):237-41.
3. Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular oncology*. 2014;8(1):105-18. doi:10.1016/j.molonc.2013.10.003.
4. Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. *International journal of clinical oncology*. 2014.
5. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Advances in cancer research*. 1985;43:175-203.
6. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):4-6.
7. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer metastasis reviews*. 1993;12(3-4):303-24.
8. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 5):853-65.
9. Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2004;2(1):37-45.

10. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992;255(5047):989-91.
11. Margaritescu C, Pirici D, Simionescu C, Mogoanta L, Raica M, Stinga A et al. VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2009;50(4):527-48.
12. Shibuya M. Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Advances in cancer research*. 1995;67:281-316.
13. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research*. 2006;312(5):549-60. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
14. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287.
15. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(7):1239-41.
16. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10857-62. doi:10.1073/pnas.191117498.
17. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral oncology*. 2004;40(9):941-7. doi:10.1016/j.oraloncology.2004.04.018.
18. Margaritescu C, Pirici D, Stinga A, Simionescu C, Raica M, Mogoanta L et al. VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clinical and experimental medicine*. 2010;10(4):209-14. doi:10.1007/s10238-010-0095-4.
19. Stinga AC, Margaritescu O, Stinga AS, Pirici D, Ciurea R, Bunget A et al. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2011;52(4):1269-75.
20. Cabebe E, Wakelee H. Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors. *Current treatment options in oncology*. 2007;8(1):15-27. doi:10.1007/s11864-007-0022-4.
21. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen PY, Zhuang ZW et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(7):2668-78. doi:10.1172/JCI44762.
22. Florence ME, Massuda JY, Brocker EB, Metze K, Cintra ML, Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics*. 2011;66(3):465-8.
23. Konger RL, Xu Z, Sahu RP, Rashid BM, Mehta SR, Mohamed DR et al. Spatiotemporal assessments of dermal hyperemia enable accurate prediction of experimental cutaneous carcinogenesis as well as chemopreventive activity. *Cancer research*. 2013;73(1):150-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2670.

24. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents*. 2003;3(2):95-117.
25. Margaritescu O, Pirici D, Margaritescu C. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2011;52(4):1283-92.
26. Michi Y, Morita I, Amagasa T, Murota S. Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. *Oral oncology*. 2000;36(1):81-8.
27. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(4):485-94. doi:10.1038/modpathol.3800295.
28. Ciurea R, Margaritescu C, Simionescu C, Stepan A, Ciurea M. VEGF and his R1 and R2 receptors expression in mast cells of oral squamous cells carcinomas and their involvement in tumoral angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2011;52(4):1227-32.
29. Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2003;129(8):882-8. doi:10.1001/archotol.129.8.882.
30. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 1997;33(5):369-74.
31. al. BLe. Health Organization classification of tumours. *Pathology and genetics of tumours of the head and neck*. Lyon: IARC Press,. 2005.
32. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*. 1992;166(4):375-81. doi:10.1002/path.1711660409.
33. Dhakal HP, Naume B, Synnestvedt M, Borgen E, Kaaresen R, Schlichting E et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in invasive breast carcinoma: prognostic significance and relationship with markers for aggressiveness. *Histopathology*. 2012;61(3):350-64. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04223.x.
34. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1991;324(1):1-8. doi:10.1056/NEJM199101033240101.
35. Martinez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2005;34(5):257-62. doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00299.x.
36. Christopoulos A, Ahn SM, Klein JD, Kim S. Biology of vascular endothelial growth factor and its receptors in head and neck cancer: beyond angiogenesis. *Head & neck*. 2011;33(8):1220-9. doi:10.1002/hed.21588.
37. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European journal of cancer*. 2009;45(11):1924-34. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.007.

38. Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(6):2272-84. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0572.
39. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007;36(3):263-6. doi:10.1016/j.ijom.2006.09.017.
40. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2004;40(1):13-20.
41. Zhao SF, Yang XD, Lu MX, Sun GW, Wang YX, Zhang YK et al. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(5):3165-71. doi:10.1007/s13277-013-0886-9.
42. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*. 2001;98(6):1904-13.
43. Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nor JE. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell death and differentiation*. 2010;17(3):499-512. doi:10.1038/cdd.2009.152.
44. Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer research*. 2002;62(3):854-9.
45. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1434-40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1870.
46. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2001;30(8):449-57.
47. Gandolfo M, Keszler A, Lanfranchi H, Itoiz ME. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;111(4):486-93. doi:10.1016/j.tripleo.2010.11.018.
48. Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2006;42(4):337-42. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.06.020.
49. Sawane M, Kajiya K. Ultraviolet light-induced changes of lymphatic and blood vasculature in skin and their molecular mechanisms. *Experimental dermatology*. 2012;21 Suppl 1:22-5. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01498.x.
50. Li Y, Bi Z, Yan B, Wan Y. UVB radiation induces expression of HIF-1alpha and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(4):713-9.

51. Astekar M, Joshi A, Ramesh G, Metgud R. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2012;16(1):22-6. doi:10.4103/0973-029X.92968.
52. Macluskey M, Baillie R, Chandrachud LM, Pendleton N, Schor AM. High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 2000;20(3B):2123-8.
53. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral oncology*. 1998;34(6):543-8.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi o primeiro a avaliar a expressão do VEGFR1 e VEGFR2 durante a carcinogênese labial, correlacionando com a microdensidade vascular (CD31), proliferação celular (Ki-67) e dados clínicos. O estudo da expressão destas proteínas ao longo do processo de desenvolvimento do CECL permite que seja melhor elucidado o real papel destes marcadores na progressão tumoral. Além disso, buscou-se avaliar a correlação da expressão destes receptores com as informações clínicas e também com a proliferação celular e microdensidade vascular, dados estes que até então não haviam sido abordados na literatura. No presente estudo, observou-se uma maior expressão de VEGFR1 e 2 nas células epiteliais nos casos de QA comparado com o CECL. Nas células inflamatórias, por outro lado, o VEGFR1 foi mais expresso nos casos de CECL enquanto que o VEGFR2 foi mais expresso nos casos de QA. Foi evidenciado que não há associação entre a expressão dos receptores de VEGF estudados e a microdensidade vascular, proliferação celular e dados clínicos. A microdensidade vascular foi maior nos casos de CECL, e nos casos de QA, esta apresentou uma correlação positiva com a proliferação celular. Através destes resultados conclui-se que a expressão de VEGFR1 e 2 é um evento precoce na carcinogênese labial e parece estar envolvida em vias de regulação autócrinas e parácrinas. Entretanto, estas proteínas não representam bom marcadores prognósticos ou até mesmo de progressão tumoral. Recentemente, novas terapias que possuem como alvo terapêutico o bloqueio destes receptores começam a apresentar resultados promissores em alguns tumores sólidos, como os de pulmão, ovário, entre outros. Neste sentido, sugere-se que sejam realizados novas pesquisas que avaliem o papel destes receptores no processo de carcinogênese oral.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. A. et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, São Paulo, v. 72, no. 6, p. 767-771, Nov./Dec. 2006.
- AIKEN, A. H. Pitfalls in the staging of cancer of oral cavity cancer. **Neuroimaging Clin. N. Am.**, Atlanta, v. 23, no. 1, p. 27-45, Feb. 2013.
- ARAUJO, C. P. et al. Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. **J. Mol. Histol.**, Salvador, v. 41, no. 6, p. 357-365, Dec. 2010.
- ARTESE, L. et al. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, Athens, v. 21, no. 1B, p. 689-695, Jan./Feb. 2001.
- BAPTISTA, A. M. **Correlação entre a expressão de VEGF e a sobrevida de osteossarcoma.** 2010. 93f. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 109, no. 3, p. 74-79, Mar. 2010.
- BOONKITTICHAROEN, V. et al. Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 134, no. 12, p. 1305-1311, Dec. 2008.
- CABEBE, E.; WAKELEE, H. Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors. **Curr. Treat. Options Oncol.**, Philadelphia, v. 8, no. 1, p. 15-27, Feb. 2007.
- CALIFANO, J. SIDRANSKY, D. **Molecular biology of head and neck cancer.** 1999.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, London, v. 407, no. 6801, p. 249-257, Sept. 2000.
- DE SOUZA LUCENA, E. E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 18, no. 6, p. 575-579, Sept. 2012.
- DE VRIES, C. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, New York, v. 255, no. 5047, p. 989-991, Feb. 1992.
- DENHART, B. C. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 77, no. 6, p. 659-664, Dec. 1997.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 30, no. 4, p. 237-241, Apr. 2003.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada à Odontologia e Fonoaudiologia**. São Paulo: Pancast, 2000.

DRAGOMIR, L. P. et al. The immunoexpression of EGFR and Her2/neu in oral squamous carcinoma. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, Bucuresti, v. 53, no. 3, p. 597-601, 2012.

DRAY, T. G.; HARDIN, N. J.; SOFFERMAN, R. A. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, St. Louis, v. 104, no. 9, p. 724-729, Sept. 1995.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 20, no. 21, p. 4368-4380, Nov. 2002.

EROVIC, B. M. et al. Quantitation of microvessel density in squamous cell carcinoma of the head and neck by computer-aided image analysis. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Wien, v. 117, no. 1-2, p. 53-57, Jan. 2005.

FAUSTINO, S. E. S. **VEGF-C e densidade de vasos linfáticos em carcinoma espinocelular de boca: associação com as metástases linfonoidais ocultas e com o prognóstico dos pacientes**. 2010. 176f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FOLKMAN, J. et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, London, v. 339, no. 6219, p. 58-61, May 1989.

GALLO, O. et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 90, no. 8, p. 587-596, Apr. 1998.

GARCIA-MONTESINOS-PEREA, B.; VAL-BERNAL, J. F.; SAIZ-BUSTILLO, R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 10, no. 5, p. 454-461, Nov./Dec. 2005.

GASPARINI, G. et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, New York, v. 55, no. 5, p. 739-744, Nov. 1993.

GIMBRONE, M. A., JR. et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. **J. Exp. Med.**, New York, v. 136, no. 2, p. 261-276, Aug. 1972.

GLEICH, L. L. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. **Head Neck**, New York, v. 19, no. 4, p. 276-280, July 1997.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 46, no. 7, p. 525-530, July 2010.

HEROLD-MENDE, C. et al. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 79, no. 12, p. 1573-1582, Dec. 1999.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat. Med.**, New York, v. 1, no. 2, p. 149-153, Feb. 1995.

HUBER, M. A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 28, no. 3, p. 262-268, May/June 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.  
**Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2013.

JOHNSON, D. H. et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 22, no. 11, p. 2184-2191, June 2004.

JOHNSTONE, S.; LOGAN, R. M. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 36, no. 3, p. 263-266, Mar. 2007.

JORGE JUNIOR, J. et al. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, no. 3, p. 173-175, June 1991.

JUNQUEIRA, J. L. et al. Actinic cheilitis among agricultural workers in Campinas, Brazil. **Community Dent. Health**, London, v. 28, no. 1, p. 60-63, Mar. 2011.

KLIJANIENKO, J. et al. Tumor vascularization, mitotic index, histopathologic grade, and DNA ploidy in the assessment of 114 head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer**, New York, v. 75, no. 7, p. 1649-1656, Apr. 1995.

KOVESI, G.; SZENDE, B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. **Oncology**, New York, v. 65, no. 4, p. 331-336, 2003.

KYZAS, P. A.; CUNHA, I. W.; IOANNIDIS, J. P. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 11, no. 4, p. 1434-1440, Feb. 2005.

KYZAS, P. A.; STEFANO, D.; AGNANTIS, N. J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and

recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, no. 9, p. 941-947, Oct. 2004.

KYZAS, P. A. et al. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 18, no. 4, p. 485-494, Apr. 2005.

LALLA, R. V. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 129, no. 8, p. 882-888, Aug. 2003.

LARA, P. N., JR. et al. SU5416 plus interferon alpha in advanced renal cell carcinoma: a phase II California Cancer Consortium Study with biological and imaging correlates of angiogenesis inhibition. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 9, no. 13, p. 4772-4781, Oct. 2003.

LI, C. et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 34, no. 5, p. 559-565, July 2005.

MAEDA, T. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 51, no. 10, p. 771-775, Oct. 1998.

MALASPINA, T. S. et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, Berlin, v. 60, no. 7, p. 965-974, July 2011.

MARGARITESCU, C. et al. VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, Bucuresti, v. 50, no. 4, p. 527-548, 2009.

MARGARITESCU, C. et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, Bucuresti, v. 49, no. 3, p. 321-326, 2008.

MARTINEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, no. 5, p. 257-262, May 2005.

MARTINS-FILHO, P. R.; DA SILVA, L. C.; PIVA, M. R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v. 50, no. 9, p. 1109-1114, Sept. 2011.

MASOOD, R. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. **Blood**, New York, v. 98, no. 6, p. 1904-1913, Sept. 2001.

MASOOD, R. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 94, no. 3, p. 979-984, Feb. 1997.

MATTER, A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. **Drug. Discov. Today**, Oxford, v. 6, no. 19, p. 1005-1024, Oct. 2001.

MIETTINEN, M.; LINDENMAYER, A. E.; CHAUBAL, A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 7, no. 1, p. 82-90, Jan. 1994.

MINETA, H. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. **Br. J. Cancer**, London, v. 83, no. 6, p. 775-781, Sept. 2000.

MIRANDA, A. M. et al. Prevalence of actinic cheilitis in a population of agricultural sugarcane workers. **Acta. Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 25, no. 2, p. 201-206, 2012.

MIRANDA, S. P. **Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno.** 2007. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

NEUCHRIST, C. et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Head Neck**, New York, v. 25, no. 6, p. 464-474, June 2003.

P, O. C.; RHYS-EVANS, P.; ECCLES, S. A. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. **Cancer**, New York, v. 92, no. 3, p. 556-568, Aug. 2001.

PETERSON, A. C. et al. Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 10, no. 12, p. 4048-4054, June 2004.

RAJU, B. et al. Expression of p53, cyclin D1 and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions: association with clinicopathological parameters. **Anticancer Res.**, Athens, v. 25, no. 6C, p. 4699-4706, Nov./Dec. 2005.

RAVI, D. et al. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 6, p. 543-548, Nov. 1998.

ROBSON, H. et al. Transforming growth factor beta 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. **Br. J. Cancer.**, London, v. 74, no. 5, p. 753-758, Sept. 1996.

ROJAS, I. G. et al. Increased fibroblast density in actinic cheilitis: association with tryptase-positive mast cells, actinic elastosis and epithelial p53 and COX-2 expression. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 41, no. 1, p. 27-33, Jan. 2012.

ROSSOE, E. W. et al. Actinic cheilitis: aesthetic and functional comparative evaluation of vermilionectomy using the classic and W-plasty techniques. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, no. 1, p. 65-73, Jan./Feb. 2011.

RYDEN, L. et al. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 82, no. 3, p. 147-154, Dec. 2003.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF-beta1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol.**, Tokyo, May 2014.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 32, no. 3, p. 233-245, June 2003.

SCHUSSEL, J. L.; PINTO DDOS, S., JR.; MARTINS, M. T. Altered beta-catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Ann. Diagn. Pathol.**, Philadelphia, v. 15, no. 1, p. 1-5, Feb. 2011.

SHANG, Z. J.; LI, J. R. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, no. 3, p. 134-139, Mar. 2005.

SHIBUYA, M. Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. **Adv. Cancer Res.**, New York, v. 67, p. 281-316, 1995.

\_\_\_\_\_. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J. Biochem. Mol. Biol.**, New York, v. 39, no. 5, p. 469-478, Sept. 2006.

SHIBUYA, M.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 312, no. 5, p. 549-560, Mar. 2006.

SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 6, p. 583-589, Nov. 1999.

SMITH, B. D. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 18, no. 10, p. 2046-2052, May 2000.

SOUZA, L. R. et al. Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v. 58, no. 3, p. 352-360, Feb. 2011.

VALENTE, G. et al. Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? **J. Clin. Pathol.**, London, v. 47, no. 2, p. 109-112, Feb. 1994.

VUKADINOVIC, M. et al. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 65, no. 4, p. 675-679, Apr. 2007.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 36, no. 10, p. 575-580, Nov. 2007.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 147, no. 1, p. 9-19, July 1995.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 143, no. 2, p. 401-409, Aug. 1993.

WILLIAMS, J. K. et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. **Am. J. Surg.**, New York, v. 168, no. 5, p. 373-380, Nov. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.** 2012.

YEN, P. et al. A two-compartment model of VEGF distribution in the mouse. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, no. 11, p. e27514, 2011.

ZANGARI, M. et al. Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 10, no. 1, p. 88-95, Jan. 2004.

ZOELLER, J. et al. Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. **Anal. Cell Pathol.**, Amsterdam, v. 7, no. 1, p. 77-88, July 1994.



## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE VEGFR-1 E VEGFR-2 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE LÁBIO

**Pesquisador:** Manoela Domingues Martins

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 26713714.9.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 555.154

**Data da Relatoria:** 12/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado Expressão Imunoistoquímica de VEGFR-1 E VEGFR-2 em Queilites Actínicas e Carcinomas Espinoceulares, é um estudo observacional analítico que pretende verificar a imunomarcagem do VEGFR-1 e VEGFR-2 em Queilites Actínicas (QA) e Carcinomas Espinoceulares (CEC) de lábio com intuito de identificar um possível papel destas proteínas na carcinogênese labial. Um total de 82 amostras será utilizado, 53 CEC de lábio e 29 QA que foram obtidos no estudo GPPG 12-0176.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Geral:

O objetivo do presente estudo será verificar a imunomarcagem do VEGFR-1 e VEGFR-2 em QA e CEC de lábio com intuito de identificar um possível papel destas proteínas na carcinogênese labial.

##### Objetivos Específicos:

- Correlacionar a graduação histológica dos casos de QA e de CEC com a imunomarcagem pelo VEGFR-1 e VEGFR-2.
- Correlacionar a evolução dos casos de QA e CEC com a imunomarcagem pelo VEGFR-1 e VEGFR-

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359-7640 **Fax:** (51)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 555.154

2.

- Correlacionar os dados de fatores de risco (fumo e exposição solar) com a imunomarcagem pelo VEGFR-1 e VEGFR-2.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não existe nenhum tipo de risco conhecidos aos pacientes, uma vez que as amostras utilizadas serão oriundas de outro projeto.

**Benefícios:**

Não existe nenhum tipo de benefício direto aos pacientes, porém o conhecimento do papel do VEGFR-1 e VEGFR-2 na carcinogênese de lábio poderá contribuir para o prognóstico da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Atualmente, vários trabalhos vêm sendo produzidos a fim de tentar estabelecer como ocorre a transformação maligna, utilizando diferentes marcadores celulares relacionados com a carcinogênese bucal. A busca de biomarcadores prognósticos tem sido alvo de estudo nestas lesões para compreender seu comportamento biológico, e estes tem indicado que as células tumorais apresentam uma síntese de VEGF aumentada quando comparado com os seus homólogos normais, implicando que os níveis elevados de VEGF favorecem o crescimento do tumor e sua progressão. Entretanto, o papel do VEGFR-1 e VEGFR-2 na carcinogênese de lábio ainda não foi estudado, bem como sua relação com alterações conjuntivas relacionadas à exposição crônica a radiação UV.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto inclui descrição da equipe, contextualização do tema, objetivos, metodologia, cálculo do tamanho amostral, análise estatística, riscos e benefícios, critérios de inclusão e exclusão, cronograma de atividades, orçamento e referências bibliográficas. Também inclui o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas. Solicita dispensa do TCLE com a justificativa de que a etiologia desta doença (sobrevida de 50% dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca é de apenas 5 anos; idade avançada ao diagnóstico) impedindo muitas vezes um novo contato com este grupo de pacientes.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
 Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (513)359-7640 Fax: (513)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 555.154

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**Pendências:**

- É mencionado que a amostra dos pacientes será oriunda do projeto GPPG 12-0176, mas este também propôs dispensa do TCLE. Portanto, onde e quando essas amostras foram coletadas? E este projeto previa armazenamento de amostras biológicas e uso posterior em outros estudos? Esclarecer.

**RESPOSTA DOS PESQUISADORES:** As amostras biológicas que serão utilizadas neste estudo, assim como as obtidas no projeto 12-0176, estão armazenadas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em biorrepositório, para fins assistenciais, não sendo necessária a elaboração do TCLE em concordância com as Resoluções 466/12 e 441/11 do Conselho Nacional de Saúde. Os pesquisadores se comprometem a cumprir todos os requisitos relativos à proteção das informações dos pacientes. Para tanto, os pesquisadores assinam o Termo de Compromisso para Utilização de dados e o termo de compromisso na utilização de material biológico. Apenas os pesquisadores envolvidos no estudo, e que assinaram os Termos de Compromisso terão acesso à identidade dos pacientes, que, por sua vez, será substituída por códigos no momento em que for criado o banco de dados do estudo.

Os prontuários médicos e os blocos de parafina obtidos de pacientes com lesões de queilite actínica em lábio inferior e de carcinoma espinocelular de lábio que compuseram a amostra do projeto 12-0176 foram obtidos no SAMIS (prontuários) e no Serviço de Patologia (blocos e laminas). As coletas de informações e blocos foram realizadas após a aprovação do CEP-HCPA durante o final de 2012 e todo o ano de 2013. O projeto 12-0176 não previa o armazenamento para uso em posterior estudo. Os blocos foram devolvidos para o Serviço de Patologia porém, temos possibilidade de mediante aprovação pelo CEP de realizarmos a busca destes material. Estamos propondo neste novo projeto utilizar os mesmos blocos visto que já foi dispendido tempo e verba para a identificação de amostras ideais destas lesões. Assim, seria possível realizar novos cortes histológicos deste material cujas informações clínicas já foram coletadas e realizar análise de outras proteínas envolvidas na carcinogênese labial. Optamos por colocar na metodologia que utilizaríamos as informações já coletadas por pensarmos ser este um estudo que continua a responder duvidas oriundas do projeto 12-0176.

**PENDÊNCIA ESCLARECIDA.** O CEP-HCPA esclarece que a autorização para a utilização de material biológico sem a utilização do TCLE é pertinente uma vez que os pesquisadores justificam que a sobrevivência de 50% dos pacientes com o diagnóstico a ser estudo é de 5 anos. Segundo a normativa

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (513)359-7640 **Fax:** (513)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 555.154

vigente, o participante deverá ser contatado para consentir, a cada nova pesquisa, sobre a utilização do material biológico humano armazenado em biorrepositório, formalizando-se o consentimento por meio de TCLE específico.

- De acordo com o cálculo do tamanho amostral, serão necessárias 34 amostras em cada grupo analisado, mas apenas 29 amostras de QA estão sendo consideradas. Este número será aumentado? Esclarecer.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Apenas 29 amostras foram incluídas no trabalho 12-0176 entretanto será realizada uma nova busca de casos de QA a fim de aumentar o número de casos incluídos e atingir as 34 amostras propostas no cálculo amostral. O projeto 12-0176 obteve amostras diagnosticadas no período de Janeiro de 2001 a dezembro de 2006. Pretende-se realizar uma nova busca de amostras abrangendo os anos de 2007, 2008 e 2009 que permitem o estabelecimento do prognóstico em 5 anos de acompanhamento.

As modificações estão ressaltadas na nova versão do projeto na seção Material e métodos.- PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

- Incluir os 10 casos de Mucosa Normal que serão utilizados no número total de amostras do estudo.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Os 10 casos de mucosa normal foram incluídos no número total de amostras e a alteração esta ressaltada no texto na seção Material e Métodos. PENDÊNCIA ATENDIDA.

- Atualizar o cronograma do projeto como consta no formulário da Plat BR.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: O cronograma que consta no projeto foi atualizado como consta no formulário da Plataforma Brasil e esta destacado no texto na seção Cronograma. PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão 24/02/2014 e demais documentos

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE - HCPA /  
UFRGS



Continuação do Parecer: 555.154

submetidos até a presente data) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

Os autores deverão preencher o documento de Delegação de Funções para atividades do presente projeto (disponível na página da internet do HCPA - Pesquisa - GPPG - Formulários - Formulário de Delegação de funções para membros de equipe de pesquisa). Uma vez preenchido, o documento deverá ser enviado ao CEP como Notificação, através da Plataforma Brasil.

A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

PORTO ALEGRE, 13 de Março de 2014

---

**Assinador por:**  
**José Roberto Goldim**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Bom Fim **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)359-7640 **Fax:** (51)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

## APÊNDICE - FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS

Ficha de Levantamento de dados

Prontuário: \_\_\_\_\_ Nº AP \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: 1 ( ) masculino 2 ( ) feminino

Ocupação: \_\_\_\_\_

Cor: 1 ( ) branca 2 ( ) preta 3 ( ) amarela 4 ( ) outra

Residência: 1 ( ) urbana 2 ( ) rural

Fumo: 1 ( ) sim 2 ( ) não

6.1- Tipo: ( ) cigarro ( ) charuto ( ) cachimbo ( ) palheiro ( ) outros.

6.2- Quantidade: \_\_\_\_\_

6.3- Período de uso: \_\_\_\_\_

6.4- Ex-fumante há quanto tempo: \_\_\_\_\_

Exposição solar: 1 ( ) sim 2 ( ) não

7.1- Tempo de exposição ao sol em anos -----

7.2- Uso de proteção solar 1 ( ) sim 2 ( ) não

Dor: 1 ( ) sim 2 ( ) não

### Lesão:

Sítio: 1 ( ) Lábio Inferior

Aspecto clínico: ( ) mancha branca ( ) mancha vermelha ( ) placa ( ) nódulo ( ) úlcera

( ) úlcero-vegetante ( ) úlcero-infiltrativo

Tamanho: \_\_\_\_\_mm

( ) Tx ( ) T0 ( ) carcinoma "in situ" ( ) T1 ( ) T2 ( ) T3 ( ) T4 ( ) T4a-Lábio ( ) T4a-

Cavidade Oral ( ) T4b-Lábio e cavidade oral

Metástase regional: ( ) NX ( ) N0 ( ) N1 ( ) N2 ( ) N2a ( ) N2b ( ) N2c ( ) N3

Metástase à distância: ( ) MX ( ) M0 ( ) M1

TNM: ( ) Estádio 0 ( ) Estádio I ( ) Estádio II ( ) Estádio III ( ) Estádio IVa

( ) Estádio IVb ( ) Estádio IVc

### Tratamento:

a. Queilite actínica: ( ) filtro solar, ( ) chapéu, ( ) remoção parcial, ( ) remoção total, ( ) outros.

b. CEC: ( ) cirurgia, ( ) radioterapia, ( ) quimioterapia e as associações.

### Evolução:

Queilite actínica: 1 ( ) sem lesão, 2 ( ) com lesão, 3 ( ) evoluiu para CEC

CEC: 1 ( ) vivo 2 ( ) falecido pelo tumor 3 ( ) falecido por outra causa 4 ( ) falecido sem saber a causa

Há quantos anos: \_\_\_\_\_

Recidiva: 1 ( ) sim 2 ( ) não