

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA

TEZA DE DOCTORAT

REZUMAT

*ROLUL ANGIOGENEZEI ÎN PROGRESIA
CARCINOAMELOR SCUAMOASE ALE BUZELOR -
STUDIU CLINIC, HISTOPATOLOGIC ȘI
IMUNOHISTOCHIMIC*

Student Doctorand:
MARINESCU IULIA ROXANA

Conducător Științific:
PROF. UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA

CRAIOVA 2014

CUPRINS

INTRODUCERE	1
--------------------	----------

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA ȘI RISCUL DE APARIȚIE AL CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE	
I.A. EPIDEMIOLOGIA CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE	4
I.B. FACTORII DE RISC AI CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE	7
CAPITOLUL II. ANGIOGENEZA TUMORALĂ ÎN CONTEXTUL CARCINOGENEZEI ORALE	15
CAPITOLUL III. PROGNOSTICUL CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE CU LOCALIZARE LA NIVELUL BUZELOR	28

CONTRIBUȚII PROPRII

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII	36
CAPITOLUL IV. MATERIAL ȘI METODE	
IV.A. MATERIALUL CERCETAT	37
IV.B. METODE FOLOSITE ÎN CERCETARE	37
CAPITOLUL V. REZULTATE	
V. A. STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC AL PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE ALE BUZELOR	44
V.B. STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL CARCINOAMELOR SCUAMOASE ALE BUZELOR	54
V.C. STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL ANGIOGENEZEI DIN CARCINOAMELE SCUAMOASE ALE BUZELOR	71
CAPITOLUL VI. DISCUȚII	
VI.A. DISCUȚII ASUPRA DATELOR CLINICO-EPIDEMIOLOGICE ALE PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE ALE BUZELOR	120
VI.B. DISCUȚII ASUPRA DATELOR HISTOPATOLOGICE ALE CARCINOAMELOR SCUAMOASE ALE BUZELOR	127
VI.C. DISCUȚII ASUPRA DATELOR IMUNOHISTOCHEMICE ALE ANGIOGENEZEI TUMORALE ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ALE BUZELOR	134
CAPITOLUL VII. CONCLUZII	146
BIBLIOGRAFIE	151

INTRODUCERE

Carcinoamele scuamoase constituie cele mai frecvente tumori epiteliale din sfera orală și sunt estimate în prezent de către numeroase statistici la 95% din totalul cancerelor orale, ocupând locul șase ca frecvență la nivel mondial. Raportul publicat în anul 2012 de către membrii comisiei de cercetare a stării de sănătate orală din țările UE, consideră cancerul oral a 8-a cea mai comună formă de cancer la nivel mondial, iar cancerul de buză se situează pe locul al 12-lea drept cel mai comun tip de cancer la bărbați, în cadrul țărilor UE.

Prevalența cea mai crescută a bolii a fost înregistrată în Spania și Ungaria, iar în ceea ce privește rata mortalității, aceasta continuă să crească în țările est-europene.

În anul 2007 s-au înregistrat aproximativ 8 milioane de decese la nivel mondial din cauza cancerului și a complicațiilor sale, iar pentru anul 2030 sunt prognozate 12 milioane de decese.

La nivel mondial sunt diagnosticate mai mult de 300.000 de noi cazuri de carcinoame scuamoase anual, acestea reprezentând aproximativ 90% din neoplazmele cavității orale, iar cancerul de buză atinge un procent de 25-30% dintre cancerele cavității orale. Carcinoamele scuamoase cu localizare la nivelul buzelor prezintă incidență crescută în țările tropicale, fiind influențate de factori socio-demografici și culturali locali și însumează 40% din carcinoamele capului și gâtului.

Cei 107 pacienți cuprinși în acest studiu au fost mai întâi analizați din punct de vedere clinico-epidemiologic, ceea ce a dus la următoarele concluzii: cele mai multe cazuri de carcinoame scuamoase cu localizare la nivelul buzelor s-au înregistrat la pacienți de sex masculin, în decada a șaptea de viață, predominant din mediul rural, leziunile fiind localizate în procent de peste 90% la nivelul buzei inferioare.

Studiul microscopic al carcinoamelor scuamoase de la nivelul buzelor a urmărit pentru cele 107 cazuri investigate, evaluarea patternului de creștere tumoral, a tipului tumoral și a gradului histologic, cuantificarea infiltratului inflamator, prezența/absența invaziei limfo-vasculare, perineurale și musculare, paternul invaziei tumorale, statusul limitelor de rezecție chirurgicală și leziunile asociate, prezența/absența adenopatiei metastatice.

Analiza imunohistochimică s-a realizat pentru 40 de carcinoame scuamoase și displazii asociate și a urmărit imunoexpresia CD105 și evaluarea MVD CD105+, cuantificarea gradului de maturitate al vaselor tumorale pentru CD105 și α -SMA, stabilirea gradului de proliferare vasculară și tumorală prin dublă imunocolorare pentru CD105 și Ki67, cuantificarea imunoexpresiei VEGF și a receptorilor săi VEGFR1, VEGFR2 și cuantificarea imunoexpresiei Angiopoietinei 2. De asemenea, expresia markerilor la nivelul carcinoamelor incluse în lot a fost analizată comparativ cu leziunile displazice asociate, respectiv cu metastazele corespunzătoare.

Cuvinte cheie: carcinom scuamos, buză, angiogeneză, factori imunohistochimici, microdensitate vasculară, prognostic.

Capitolul I. Epidemiologia și riscul de apariție al carcinoamelor scuamoase orale – oferă date despre incidența cancerelor orale la nivel mondial, dar și informații cu privire la principalii factori de risc incriminați și influența pe care o au aceștia asupra carcinogenezei: consumul cronic de alcool, fumatul, deficiențele nutriționale, expunerea prelungită la radiații solare, imunodeficiența, leziunile cu potențial de malignizare.

Capitolul II. Angiogeneza tumorală în contextul carcinogenezei orale – prezintă câteva date despre cercetările care s-au făcut încă din secolul trecut despre procesul de angiogeneză, etapele angiogenezei tumorale, descrierea factorilor proangiogeni și antiangiogeni și a funcțiilor acestora, a căror înțelegere este esențială pentru terapia tumorală și pentru aplicarea clinică a rezultatelor obținute.

Capitolul III. Prognosticul carcinoamelor scuamoase orale cu localizare la nivelul buzelor – oferă informații despre factorii clinici (sex, vârstă, rasă, condiții socio-economice, localizarea anatomică a tumorilor), factorii histopatologici (metastazare, stadializare TNM) și factorii imunohistochimici (VEGF, genele HOX) care au rol în aprecierea prognosticului carcinoamelor scuamoase ale buzelor.

OBIECTIVELE STUDIULUI

Acest studiu propune o cercetare complexă a procesului de angiogeneză din carcinoamele scuamoase cu localizare la nivelul buzelor, folosind metode clasice de investigare, dar și tehnici moderne precum morfometria și imunohistochimia.

Principalele obiective specifice ale acestui studiu sunt:

1. evaluarea caracteristicilor clinico-epidemiologice, histopatologice și imunohistochimice ale carcinoamelor scuamoase ale buzelor, pentru o perioadă de timp de 3 ani, prin cuantificarea următorilor parametri:
 - *clinici*: sexul și vârsta pacienților, mediul de proveniență, factorii de risc, perioada de timp scursă de la debutul bolii, simptomatologia, localizarea tumorilor, prezența/absența adenopatiei metastatice.
 - *histopatologici*: patternul de dezvoltare și patternul invaziei tumorale, gradul de diferențiere, infiltratul inflamator, prezența/absența adenopatiei metastatice, a invaziei perineurale, vasculare și musculare, prezența/absența celulelor maligne reziduale la nivelul marginilor de siguranță chirurgicală, prezența leziunilor asociate.
 - *imunohistochimici*: cuantificarea expresiei CD105, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, ANG2.
 - *morfometrici*: evaluarea MVD (microdensității vasculare).
2. cuantificarea vaselor sangvine în carcinoamele scuamoase ale buzelor cu scopul de a evidenția gradul de implicare al angiogenezei în apariția și progresia leziunilor;
3. stabilirea gradului activității proliferative a vaselor de neoformație;
4. identificarea și cuantificarea proteinelor cu rol angiogenic și a receptorilor acestora în vederea identificării surselor proangiogenice și stabilirea rolului acestora în fiecare etapă a carcinogenezei scuamoase de la nivelul buzelor;

5. identificarea unor mecanisme moleculare sinergice sau antagonice în modularea angiogenezei.
6. selectarea datelor semnificative statistic, în urma analizei parametrilor amintiți, cu rol în carcinogeneza de la nivelul buzelor și care pot constitui eventuale ținte terapeutice.

CAPITOLUL IV- Material și Metode - oferă date despre materialul studiat și metodele utilizate în cercetare.

MATERIALUL CERCETAT

Studiul a fost realizat pe o perioadă de 3 ani (2010-2012), cuprinzând un număr de 107 cazuri de carcinoame scuamoase localizate la nivelul buzelor. Materialul cercetat a fost reprezentat de piese de exereză chirurgicală cu limite variabile de rezecție, iar în 25 de cazuri, în care s-a practicat și limfadenectomie, au fost însoțite de ganglionii limfatici respectivi. Materialul a provenit de la pacienții internați și operați în Clinica de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova.

METODE UTILIZATE

Am început prin a urmări obținerea unor date **epidemiologice** și **clinice**, pentru cei 107 pacienți ai lotului de studiu, referitoare la: sexul, vârsta, mediul de proveniență, factori de risc, perioada de timp scursă de la debutul bolii, simptomatologia, localizarea tumorilor, prezența/absența adenopatiei metastatice.

Analiza **histopatologică** s-a realizat pe un lot de 107 cazuri de carcinoame scuamoase ale buzelor și a inclus următoarele criterii de apreciere: patternul de dezvoltare al tumorilor; gradul de diferențiere; amploarea infiltratului inflamator; patternul invaziei tumorale; prezența/absența adenopatiei metastatice, a invaziei perineurale, vasculare sanghine și limfatice; prezența/absența invaziei musculare; prezența/absența celulelor maligne reziduale la nivelul marginilor de siguranță chirurgicale; prezența leziunilor asociate: displazii, cheilită actinică, elastoză solară, ulceratii, etc.

Studiul **imunohistochimic** a cuprins un număr de 40 de cazuri selectate, pentru care au fost analizate microdensitatea vasculară (CD105), gradul de maturitate al vaselor (CD105/ α -SMA), gradul de proliferare vasculară și tumorală (Ki67/CD105), precum și expresia unor factori de creștere și a receptorilor acestora (VEGF, VEGFR1, VEGFR2, ANG2).

Am utilizat reacții simple și duble; pentru reacțiile simple și pentru prima parte a reacțiilor duble am folosit sistemul de amplificare LSAB2-HRP și CSAII (Biotin-Free Catalyzed Amplification System- CD105 monoclonal), dezvoltarea realizându-se cu cromogen DAB (culoare brună). Pentru cea de-a doua parte a reacțiilor duble (α -SMA; CD105 - policlonal), după blocare cu avidină biotină, am utilizat LSAB2-AP System și cromogenul Vulcan Fast Red (culoare roșie).

Analiza morfometrică a analizat microdensitatea vaselor marcate CD105 și α -SMA prin metoda "hot spot", care a constatat în cuantificarea manuală a vaselor. Microdensitatea vasculară a fost analizată atât intratumoral, cât și la nivelul frontului de invazie. În cazul SMA au fost analizate doar vasele care au prezentat marcaj dublu, CD105+ și SMA+.

A fost utilizat următorul panel de anticorpi:

ANTICORPUL	CLONA/ PRODUCĂTOR	DILUȚIA	DEMASCAREA ANTIGENICĂ	CONTROL POZITIV
CD105 (endoglina)	SN6h/ Dako	1:1000	-	Rinichi
CD105 (endoglina)	Policlonal/ Thermo Scientific	1:50	Citrat, pH 6	Rinichi
α -SMA (smooth muscle actin)	1A4/ Dako	1:50	Citrat, pH 6	Colon
Ki67	MIB 1/ Dako	1:200	Citrat, pH 6	Carcinom mamar
VEGF	C1/ Dako	1:100	Citrat, pH 6	Rinichi
VEGFR1 (Flt-1)	C17/ Dako	1:150	Citrat, pH 6	Tegument
VEGFR2 (KDR/Flk-1)	Policlonal/ Abcam	1:300	Citrat, pH 6	Rinichi
ANG 2	F1/ SantaCruz Biotechnology	1:50	Citrat, pH 6	Placentă

Panelul anticorpilor utilizați

Pentru **analiza statistică** au fost utilizate testele t Student, Anova, chi pătrat și Pearson utilizând softul SPSS 10, iar imaginile au fost achiziționate cu ajutorul microscopului Nikon Eclipse E600 și softului Lucia 5.

CAPITOLUL V- Rezultate și **CAPITOLUL VI- Discuții** redau rezultatele studiului, care sunt raportate la datele clasice și recente din literatura de specialitate.

Analiza clinico-epidemiologică a relevat că procentul cel mai ridicat de carcinoame scuamoase cu localizare la nivelul buzelor s-a înregistrat la pacienți de sex masculin (78,5%), în decada a șaptea de viață (34,6%), predominant din mediul rural (63,5%). Localizarea leziunilor a fost în procent de 96,2% la nivelul buzei inferioare și doar 2,8% dintre tumori s-au localizat la nivelul buzei superioare. Rezultatele concordă cu datele din alte publicații, care găsesc o incidență mult mai mare în rândul bărbaților, având o rată de 6:1 față de cazurile diagnosticate la femei, afectând în primul rând bărbații peste 50 de ani [273]. Din studiul factorilor de risc incriminați în apariția carcinoamelor scuamoase de buză, am constatat frecvent asocieri ale acestora, pe primul loc fiind asocierea fumatului cu consumul cronic de alcool. Din numărul total de pacienți studiați, majoritatea (71%) erau fumători și doar 28,9% s-au declarat nefumători. Datele concordă cu cele din literatură, consumul de alcool și fumatul fiind factori cu rol cert în etiopatogenia CSB [119, 206, 309]. În ceea ce privește rata de metastazare, carcinoamele scuamoase cu localizare la nivelul buzelor, în special cele de mici dimensiuni, se asociază cu cea mai redusă incidență de metastazare cervicală dintre toate cancerelor orale [336, 364]. Rata de supraviețuire a pacienților cu CSB este mai mare de 5 ani [204], această neoplazie având și un prognostic mai bun în comparație cu alte cancere ale tractului aerodigestiv [153, 6], iar în ceea ce privește rata de supraviețuire în funcție de sex, nu se constată diferențe semnificative la bărbați față de femei [204].

Studiul histopatologic a evidențiat faptul că cele mai multe tumori au fost bine diferențiate, reprezentând 48,5% din cazurile analizate, urmate în ordinea frecvenței de formele moderat diferențiate (37,3%) și slab diferențiate (13,9%). Un studiu de analiză multivariată a arătat faptul că gradul tumoral a fost semnificativ legat de prezența metastazelor ganglionare în momentul diagnosticului [185], cele mai multe studii

raportând că acest sistem de clasificare este un bun indicator al evoluției bolii și răspunsului la tratament [264, 352, 265]. Am observat prezența infiltratului inflamator cu amploare diferită, predominând cel cu intensitate crescută. Răspunsul inflamator peritumoral de tip limfo-plasmocitar a fost corelat direct cu rata de supraviețuire și invers proporțional cu frecvența metastazelor [316]. Invazia musculară este descrisă ca fiind destul de frecventă în carcinoamele scuamoase ale buzelor, cel mai probabil datorită superficialității mușchiului orbicular. În studiul nostru, aspectul a fost identificat în 56 de cazuri, din cele 107 investigate, indiferent de gradul histologic al tumorilor. Analiza invaziei vasculo-limfatice, a relevat prezența acesteia în 36 de cazuri (33,6%), asociată carcinoamelor scuamoase slab și moderat diferențiate. În unele studii, incidența invaziei perineurale a fost raportată la 3,7% din cazuri, asociată semnificativ statistic cu riscul de metastazare [284]. Invazia perineurală a fost identificată în 33 de cazuri, care au reprezentat 30,8 % din cazistică. În 92 de cazuri, la nivelul limitelor de rezecție laterale neinvadate tumorale, au existat o serie de modificări asociate. Astfel, în 16 cazuri au fost prezente aspecte de displazie, în 7 cazuri cheilită actinică și elastoza solară în 59 de cazuri. În 10 cazuri, leziunile au fost asociate, de tipul displazie- cheilită actinică și elastoza solară- cheilită actinică. Elastoza solară și cheilita actinică care se observă adiacent tumorilor constituie argumente ale relației semnificative între aceste boli [232]. Încadrarea tumorilor în sistemul pTNM a indicat faptul că cele mai multe cazuri din acest studiu s-au încadrat în stadiul I de boală (60,7%), 9,3% cazuri în stadiul II de boală, 19,4% în stadiul III și în stadiul IV, 10,2%. Predominanța tumorilor în stadiile clinice precoce este invariabil însoțită de rate mari ale supraviețuirii generale la 5 ani, indiferent de modalitatea terapeutică.

Analiza imunohistochimică s-a realizat în raport cu parametrii clinicopatologici de interes: vârstă, sex, factori de risc asociați, aspect macroscopic, grad de diferențiere tumorală, gradul inflamației asociate, patternul invaziei, invazia vasculară, invazia perineurală, invazia musculară, dimensiunea și extensia tumorală (categoria T), prezența metastazelor ganglionare (categoria N), stadiul tumoral. Expresia markerilor la nivelul carcinoamelor incluse în lot a fost analizată comparativ cu leziunile displazice asociate, respectiv cu metastazele corespunzătoare. Imunomarcajul pentru CD105 a fost identificat în citoplasma celulelor endoteliale, atât în carcinoame cât și în displaziile asociate. În raport cu gradul de diferențiere, în acest studiu, carcinoamele slab diferențiate au prezentat medii valori superioare ale MVD CD105 la nivel intratumoral ($p=0.030$) și la nivelul frontului de invazie ($p=0.045$), comparativ cu carcinoamele moderat sau bine diferențiate. Numărul vaselor cu marcaj α -SMA+ a fost superior la nivelul frontului de invazie comparativ cu aria intratumorală, cu relații statistice cu diferite categorii ale parametrilor clinico-patologici analizați ($p<0.05$). La nivel intratumoral, numărul vaselor marcate a avut o valoare medie a MVD α -SMA+ de 3.7 ± 2.0 , comparativ cu frontul de invazie unde aceasta a fost MVD α -SMA+ de 6.1 ± 2.4 , diferență semnificativă statistic ($p<0,01$). Comparativ cu tumorile primitive, metastazele au prezentat valori medii MVD α -SMA semnificativ superioare la compararea cu frontul de invazie ($p=0.003$). Marcajele Ki67 au prezentat diferențe semnificative în raport cu gradul de diferențiere al carcinoamelor analizate, valorile medii cele mai înalte fiind observate în carcinoamele slab diferențiate, urmate de formele moderat și bine diferențiate, fără diferențe semnificative în raport cu compartimentele intratumoral și respectiv frontul de invazie. În ceea ce privește corelarea IP Ki67 cu stadiul tumoral, studiul nostru a indicat diferențe

semnificativ superioare ale IP Ki67 în cazul carcinoamelor cu pattern de invazie discoeziv ($p=0.040$), cu invazie vasculară ($p<0.001$), perineurală ($p<0.001$), musculară ($p<0.001$), aflate în categoria T3-T4 ($p<0.001$) și în stadiile tumorale III-IV ($p<0.001$). Aceste rezultate indică prezența unei activități proliferative vasculare reduse în cazul leziunilor displazice, care devine consistentă în cazul leziunilor invazive. În studiul efectuat, am constatat pozitivitatea VEGF în 80% din CSB aflate în diferite stadii tumorale și cu grade variate de diferențiere. Cu toate că scorul mediu VEGF a fost superior în carcinoame comparativ cu leziunile displazice asociate, nu am constatat diferențe semnificative statistic; nu au existat diferențe semnificative ale marcajelor în raport cu gradul displaziei. Datele din literatură privind corelația VEGF cu parametrii clinici și histopatologici nu sunt omogene. În timp ce unii autori au demonstrat existența unei corelații semnificative între expresia VEGF și parametrii clinici pentru carcinoamele scuamoase cu diferite localizări la nivelul mucoasei orale [151, 169, 301, 332], alții nu au găsit nici o astfel de corespondență [196, 213, 178, 179, 9, 330]. Imunoreacția pentru ANG-2 a fost prezentă la nivel citoplasmatic în 62.5% din leziunile analizate, cazurile negative aparținând unor carcinoame cu grade de diferențiere variabile și aflate în diferite stadii tumorale. Date similare au comunicat și alte studii, rata pozitivității Ang-2 fiind semnificativ mai mare în aria tumorală comparativ cu țesutul adiacent netumoral sau cu mucoasa orală normală (51.22% vs 26.67% și 0, $P < 0,05$) [195]. Analiza scorurilor medii ale ANG-2 în raport cu parametrii clinicopatologici analizați a indicat diferențe semnificative statistic în raport cu gradul de diferențiere ($p=0.014$), categoria T ($p=0.018$) și stadiul tumoral ($p=0.037$). În ceea ce privește expresia ANG-2, VEGF și a receptorilor acestuia R1 și R2, nu am constatat relații statistice semnificative ale imunoexpresiei ANG-2 cu alți markeri analizați.

Capitolul VII.- Concluzii prezintă concluziile studiului:

- Procentul cel mai ridicat de carcinoame scuamoase cu localizare la nivelul buzelor s-a înregistrat la pacienți de sex masculin (78,5%), în decada a șaptea de viață (34,6%), predominant din mediul rural (63,5%).
- Localizarea leziunilor a fost în procent de 96,2% la nivelul buzei inferioare și doar 2,8% dintre tumori s-au localizat la nivelul buzei superioare.
- Majoritatea pacienților, 71%, erau fumători; consumul de alcool a fost de asemenea frecvent întâlnit, 83% dintre participanții la studiu, însumând cele două obiceiuri vicioase.
- Aspectul macroscopic al neoplaziilor a determinat încadrarea lor în următoarele forme clinice: ulcerată (44,8%), vegetantă (33,6%), ulcero-vegetantă (18,6%) și forma infiltrantă, în 2,8% din cazuri.
- Cele mai multe cazuri au fost forme bine diferențiate ale carcinoamelor scuamoase, dintre care 46,7% au corepus aspectului convențional și doar în 1,8% din cazuri am diagnosticat carcinoame verucoase; formele moderat diferențiate au corepus în 34,5% din cazuri formelor convenționale și în 2,8% din cazuri carcinoamelor scuamoase acantolitice; carcinoamele scuamoase slab diferențiate, în 13% din cazuri au corepus aspectelor conventionale și doar în 0,9% unui carcinom bazaloid.

- Analiza invaziei vasculo-limfatice a relevat prezența acesteia în 33,6% din cazuri, iar invazia perineurală a fost identificată în 30,8% din cazuistica analizată.

- Limitele de rezecție chirurgicală au prezentat invazie tumorală în 13,9% din cazuri: la nivelul unei singure margini de siguranță chirurgicală pentru 11,1% cazuri și pentru 2,8% la nivelul ambelor margini de siguranță chirurgicală.

- Leziunile asociate de la nivelul marginilor de rezecție chirurgicală au fost prezente în 85,9% din cazuri, din care displazia în 16 cazuri, cheilita actinică în 7 cazuri și elastoza solară în 59 de cazuri. În 10 cazuri, leziunile au fost asociate, de tipul displazie- cheilită actinică și elastoza solară- cheilită actinică.

- Încadrarea tumorilor în sistemul pTNM a indicat faptul că cele mai multe cazuri s-au încadrat în stadiul I de boală (60,7%), în stadiul II de boală am încadrat 9,3% cazuri, în stadiul III am găsit 19,4% dintre cazuri și în stadiul IV 10,2%.

- În cadrul lotului analizat imunohistochimic, tumorile au prezentat un aspect vegetant (35%), cele mai multe dintre leziuni fiind bine diferențiate (40%), cu diferite grade de inflamație asociată și respectiv patternuri invazive. În 9 cazuri (22,5%), au fost identificate leziuni displazice de grad înalt (3 cazuri) sau scăzut (6 cazuri) asociate la nivelul mucoasei adiacente carcinoamelor.

- MVD CD105 a fost superior la nivelul frontului de invazie comparativ cu aria intratumorală, indiferent de parametrii clinico-patologici analizați.

- La nivelul frontului de invazie am constatat o corelație liniară negativă a MVD CD105/ MVD α -SMA, aspect care indică cel puțin pentru compartimentul invaziv tumoral o creștere a imaturității vaselor de neoformație.

- IP Ki67 a prezentat valori semnificativ superioare în cazul carcinoamelor slab diferențiate, cu pattern de invazie discoeziv, invazie vasculară, perineurală și musculară, aflate în categoria T3-T4, cu metastaze ganglionare și în stadii tumorale avansate.

- Imunoreacția pentru VEGFR1 și VEGFR2 a fost prezentă la nivel citoplasmatic în 67,5%, respectiv 75% din leziunile analizate, tumorile slab diferențiate, aflate în categoria T3/T4, în stadii avansate și IP Ki67 înalt, prezentând scoruri semnificativ superioare, în acest sens existând o corelație liniară pozitivă între cei doi markeri și liniară negativă în raport cu VEGF

- Imunoreacția pentru ANG-2 a fost prezentă la nivel citoplasmatic în 67,5% din leziunile analizate, tumorile moderat diferențiate, aflate în categoria T3 și stadii avansate având scorurile cele mai înalte.

- Analiza marcajelor CD105, α -SMA și Ki67 indică frontul de invazie ca fiind zona tumorală cu un grad de imaturitate accentuat și o activitate proliferativă considerabilă. Existența unor vase de calibru mediu cu activitate proliferativă în cazul carcinoamelor analizate, pledează mai degrabă pentru existența a două tipuri de vase de neoformație, unele cu activitate proliferativă, cu un grad de maturitate variabil (α -SMA \pm) și altele imature, fără activitate proliferativă (α -SMA-).

- Rezultatele obținute în urma analizei imunoexpresiei VEGF, VEGFR1 și VEGFR2 indică un imunofenotip VEGF-/VEGFR1+/VEGFR2+ în cazul tumorilor agresive aflate în stadii avansate, precum și relații ale receptorilor R1 și/sau R2 ai VEGF cu MVD CD105 și MVD α -SMA. În acest sens, tumorile agresive, cu scoruri VEGFR1 și VEGFR2 înalte au prezentat un proces de neoformare vasculară consistent și un grad de imaturitate vasculară accentuat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

273. Rama RV, Minicucci EM, Marques MEA, et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2012;87(1):105-14.
119. Guha N, Boffetta P, Wunsch VF, et al. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies, *Am J Epidemiol* 2007;166:1159–73.
206. Lopez PM, Minarro-Del Moral RM, Martinez-Garcia C. et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. 2003, *Br J Cancer* 88(11): 1702-7.
309. Souza LR, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos CC, et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bu-cal.* 2011 Sep 1;16 (6):e757-62.
336. Vartanian JG, Carvalho AL, de Araújo Filho MJ et al. Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. *Oral Oncol.* 2004;40:223-7.
364. Zitsch RP 3rd, Lee BW, Smith RB. Cervical lymph node metastases and squamous cell carcinoma of the lip. *Head Neck.* 1999;21:447-53.
204. Listl S, Jansen L, Stenzinger A, et al. Survival of Patients with Oral Cavity Cancer in Germany. 2013; *PLoS ONE* 8(1): e53415. doi:10.1371/journal.pone.0053415.
153. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ et al. Squamous cell carcinoma of the lip and oral cavity in The Netherlands; an epidemiological study of 740 patients. *J Craniomaxillofac Surg.* 1993;21:149-52.
6. Antoniadis DZ, Styaniadis K, Papanayotou P, et al. Squamous cell carcinoma of the lips in a Northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate-I. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(5):333-9.
185. Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, et al. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009, 38(8):657-62.
264. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, et al. World Health Organisation histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd edition. Springer, New York; 1997.
352. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42:229-39.
265. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck* 2002, 24(6):513-20.
316. Syrjanen K, Nuutinen J, Karja J. Tumor differentiation and tumor-host interactions as prognostic determinants in squamous-cell carcinoma of the lip. *Acta Otolaryngol (Stockholm)* 1986;101:152-60.
284. Rowe DE, Carroll RJ, Day LL. Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip: implications for treatment modality selection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992;26:976–90.
232. Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, et al. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol* 1998;37:677-81.

151. Joo YH, Jung CK, Kim MS, et al. Relationship between vascular endothelial growth factor and Notch1 expression and lymphatic metastasis in tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;140:512–8.
169. Kim SH, Cho NH, Kim K et al. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol* 2006; 93:330–7.
301. Shang ZJ, Li JR. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:134–9.
332. Uehara M, Sano K, Ikeda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40:321–5.
196. Li C, Shintani S, Terakado N, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34: 559–65.
213. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, 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* 1998; 51:771–5.
178. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol.* 2004 Oct;40(9):941-7.
179. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou 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*, 2005, 18(4):485–94.
9. Artese L, Rubini C, Ferrero G, et al. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:689–95.
330. Tse GM, Chan AW, Yu KH, et al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3558–65.
195. Li C, Feng HC, Chen JC, et al. Expression and significance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Ai Zheng.* 2005 Nov;24(11):1388-93.