

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

## **STUDIUL MARKERILOR PROANGIOGENICI IMPLICAȚI ÎN PROGRESIA CARCINOAMELOR SCUAMOASE LINGUALE**

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

**Student Doctorand:**  
**MĂRĂȘESCU PETRE COSTIN**

**CRAIOVA 2015**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>1</b>
<b>STADIUL CUNOAȘTERII</b>	
<b>CAPITOLUL I. ETIOPATOGENIA CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE</b>	<b>4</b>
I.1. FACTORII ETIOLOGICI AI CARCINOAMELOR SCUAMOASE	4
I.2. PATOGENIA CARCINOAMELOR SCUAMOASE	11
<b>CAPITOLUL II. FACTORII PRO- SI ANTIANGIOGENI IMPLICAȚI ÎN CARCINOGENEZA ORALĂ</b>	<b>27</b>
II.1. DATE GENERALE DESPRE ANGIOGENEZA TUMORALĂ	27
II.2. FACTORII PROANGIOGENI IMPLICAȚI ÎN CARCINOGENEZA ORALĂ	28
II.3. FACTORII ANTIANGIOGENI IMPLICAȚI ÎN CARCINOGENEZA	35
<b>CAPITOLUL III. ANGIOGENEZA CA ȘI FACTOR DE PROGNOSTIC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ORALE</b>	<b>41</b>
III.1. DATE GENERALE	41
III.2. VALOAREA PROGNOSTICĂ A ANGIOGENEZEI ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ORALE	44
<b>CONTRIBUȚII PROPRII</b>	
<b>SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII</b>	<b>46</b>
<b>CAPITOLUL IV. MATERIAL ȘI METODE</b>	<b>48</b>
IV.A. MATERIALUL CERCETAT	48
IV.B. METODE UTILIZATE	49
<b>CAPITOLUL V. REZULTATE</b>	<b>58</b>
V.1 STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC AL BOLNAVILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LINGUALE	58
V.2 STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL BOLNAVILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LINGUALE	64
V.3 STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL ANGIOGENEZEI DIN CARCINOAMELE SCUAMOASE LINGUALE	90
<b>CAPITOLUL VI. DISCUȚII</b>	<b>132</b>
VI.1 DISCUȚII ASUPRA DATELOR CLINICO-EPIDEMIOLOGICE ALE BOLNAVILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LINGUALE	132
VI.2 DISCUȚII ASUPRA DATELOR HISTOPATOLOGICE ALE BOLNAVILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LINGUALE	137
VI.3 DISCUȚII ASUPRA DATELOR IMUNOHISTOCHIMICE ALE ANGIOGENEZEI DIN CARCINOAMELE SCUAMOASE LINGUAL	145
<b>CAPITOLUL VII. CONCLUZII</b>	<b>160</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>166</b>

## INTRODUCERE

În prezent cancerul oral este cea de-a 8 cea mai frecventă neoplazie malignă la nivel mondial, respectiv cea de-a 12 cauză de deces prin cancer la bărbat. În ultimul deceniu s-a remarcat tendința de creștere a incidenței în rândul femeilor și tinerilor, rata mortalității prin cancer oral continuând să crească într-o serie de state membre ale Europei de Est. Particularizat pentru localizarea linguală tendința manifestată în ultimii ani este de creștere a incidenței mai ales în rândul tinerilor de sex feminin și din rasa albă. Totodată cancerurile dezvoltate în porțiunea mobilă a limbii sunt asociate cu o rată mai mare de mortalitate consecință a faptului că aceste tumori au o predilecție de metastazare în limfoganglionii locoregionali încă din stadiile incipiente.

Studiul nostru a investigat din punct de vedere epidemiologic, histopatologic, imunohistochimic și statistic un număr de 54 de bolnavi diagnosticați cu carcinoame scuamoase linguale de-a lungul unui interval de 3 ani, între 2012 – 2014.

Studiul epidemiologic a scos în evidență prevalența carcinoamelor scuamoase linguale la persoanele de sex masculin, provenind din mediul rural, expuse cronic la fumat și alcool, în decada a VI-a de viață și afectând cu precădere cele 2/3 anterioare ale limbii.

Studiul histopatologic a dus la conturarea unui fenotip agresiv cu predominanța formelor nekeratinizate, cu grad moderat de diferențiere, cu pattern de invazie îndeosebi de tip discoeziv (3 și 4), cu invazie musculară în peste 2/3 din cazuri și cu invazie vasculară și diseminare limfoganglionară locoregională într-o treime din cazurile investigate. Câte o treime din aceste cazuri au fost stadializate în stadiile II și III pTNM.

Analiza imunohistochimică a vizat îndeosebi particularitățile procesului de angiogeneză din aceste și a arătat:

➤ existența unui proces intens de angiogeneză în frontul de invazie certificat prin valori ridicate ale lui MVD-CD105, marea majoritate a vaselor fiind de tip imatur și de tip intermediar și având și un index de proliferare ridicat;

➤ indexul proliferativ și gradul de maturitate vasculară a fost mai mare pe măsură ce tumorile au fost mai nediferențiate, au avut un pattern de invazie din ce în ce mai discoeziv și pe măsură ce stadiul tumoral a fost mai avansat.

➤ existența unui profil angiogen particular în formele agresive de carcinom scuamos lingual (slab diferențiate, cu pattern invaziv ridicat și în stadiu avansat) VEGF-/VEGFR1+/VEGFR2+; scorurile de imunoreactivitate pentru cei 2 markeri corelându-se cu MVD-CD105, indexul de maturitate și indexul de proliferare

➤ implicarea în progresia carcinoamelor scuamoase orale a factorilor de creștere VEGF, TGFβ1 și a angiopietinei-2, dovadă fiind imunoreactivitatea tumorală a acestor tumori pentru acești markeri și a receptorilor acestora, scorurile de imunoreactivitate cel mai ridicate fiind semnalate în tumorile cele mai agresive histologic.

**Cuvinte cheie:** carcinom scuamos, limbă, angiogeneză, microdensitate vasculară, factori de creștere, factori prognostici,

**CAPITOLUL I. ETIOPATOGENIA CARCINOAMELOR SCUAMOASE ORALE-** prezintă cele mai noi date despre factorii etiologici ai carcinoamelor scuamoase și modul în care aceștia sunt implicați în carcinogeneza de la acest nivel.

**CAPITOLUL II. FACTORII PRO- SI ANTIANGIOGENI IMPLICAȚI ÎN CARCINOGENEZA ORALĂ-** oferă mai întâi date generale despre procesul de angiogeneză tumorală și implicațiile sale în carcinogeneza umană, după care sunt descriși principalii factori proangiogeni și antiangiogeni și funcțiile lor în carcinogeneza de la nivelul mucoasei orale.

**CAPITOLUL III. ANGIOGENEZA CA ȘI FACTOR DE PROGNOSTIC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ORALE** prezintă mai întâi implicațiile procesului de angiogeneză în inițierea, progresia și diseminarea proceselor canceroase, după care sunt oferite informații cu privire la valoarea prognostică a angiogenezei în carcinoamele scuamoase orale.

### **OBIECTIVELE STUDIULUI**

I. Evaluarea caracteristicilor epidemiologice și histopatologice ale carcinoamelor scuamoase ale buzelor din punct de vedere al prognosticului, pentru o perioadă de timp de 3 ani, prin cuantificarea următorilor parametri:

- epidemiologici: sexul și vârsta pacienților, mediul de proveniență, factorii de risc, localizarea tumorilor;

- histopatologici: varianta histopatologică; gradul de diferențiere; cuantificarea infiltratului inflamator asociat; aprecierea patternului invaziei tumorale; prezența/absența invaziei vasculare, perineurale, muculare; aprecierea statusului limfoganglionar, prezența/absența invaziei microscopice la nivelul marginilor de siguranță chirurgicală, prezența leziunilor asociate.

II. Stabilirea imunoprofilului angiogenic al acestor tumori prin investigarea:

- microdensității vasculare folosind markerul endotelial CD105;

- gradului de maturitate al vaselor tumorale cu ajutorul dublei imunohistochemice CD105/ $\alpha$ -SMA;

- gradului activității proliferative a vaselor de neoformație cu ajutorul dublei imunohistochemice CD105/Ki-67;

- reactivității tumorale, a endoteliilor vasculare și a celorlalți parteneri celulari stromali (fibroblaști și celule inflamatorii) la o serie de factori cunoscuți cu efect proangiogen (VEGF, TGF $\beta$ 1 și angiopietină 2) și a receptorilor acestora (VEGFR1, VEGFR2 și TGF $\beta$ 1R1);

- selectarea datelor semnificative statistic, în urma analizei parametrilor amintiți, cu realizarea unor corelații statistice semnificative în vederea relevării factorilor cu valoare prognostică.

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

MATERIALUL CERCETAT- din cazistica Laboratorului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Urgență, Nr. 1, Craiova și a fost reprezentat de blocurile de parafină arhivate. Studiul s-a întins pe durata a 3 ani, cazurile fiind selectate în intervalul de timp 2012-2014 un număr de 54 de cazuri de tumori linguale ce au constituit obiectul studiului histopatologic.

#### METODE UTILIZATE

Studiul epidemiologic a urmărit colectarea următoarelor date despre bolnavii incluși în studiu: sexul, vârsta, mediul de proveniență, mediu de proveniență, factori de risc și localizarea tumorilor.

ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ a urmărit următoare variabile morfologice: variantele histopatologice, gradul de diferențiere; amploarea infiltratului inflamator; patternul invaziei tumorale; prezența/absența invaziei vasculare sanghine și limfatice; prezența/absența a invaziei perineurale, prezența/absența invaziei musculare; prezența/absența adenopatiei metastatice, prezența/absența celulelor maligne reziduale la nivelul marginilor de siguranță chirurgicale; prezența leziunilor asociate: displazii.

STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC a cuprins un număr de 20 de cazuri selectate, pentru care au fost analizate microdensitatea vasculară (CD105), gradul de maturitate al vaselor (CD105/ $\alpha$ -SMA), gradul de proliferare vasculară și tumorală (Ki67/CD105), precum și expresia unor factori de creștere și a receptorilor acestora (VEGF și VEGFR1/VEGFR2, TGF $\beta$ 1 și TGF $\beta$ 1R1, 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 (pentru-CD105 monoclonal), dezvoltarea realizându-se cu cromogen DAB (culoare brună). Cea de-a doua parte a reacțiilor duble ( $\alpha$ -SMA; CD105- policlonal), după blocare cu avidină biotină, am utilizat sistemul de vizualizare LSAB2-AP și cromogenul Vulcan Fast Red (culoare roșie).

Prin metoda morfometrică am analizat microdensitatea vaselor marcate cu CD105 și  $\alpha$ - SMA folosind tehnica "hot spot", care a constat în cuantificarea manuală a vaselor din trei arii cu maximum de marcaj la obiectiv x20. 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+.

În studiul imunohistochimic am utilizat anticorpi concentrați ale căror principale caracteristici sunt redată în tabelul de mai jos:

Anticorp	Clona/ Producător	Diluția	Demascare antigenică	Control pozitiv
<b>CD105 (endoglină)</b>	SN6h/ Dako	1:1000	-	Rinichi
<b>CD105 (endoglină)</b>	Policlonal/ Thermo Scientific	1:50	Citrat, pH 6	Rinichi
<b><math>\alpha</math>-SMA (smooth muscle actin)</b>	1A4/ Dako	1:50	Citrat, pH 6	Colon
<b>Ki67</b>	MIB 1/ Dako	1:200	Citrat, pH 6	Carcinom Mamar
<b>VEGF</b>	C1/ Dako	1:100	Citrat, pH 6	Rinichi
<b>VEGFR1 (Flt-1)</b>	CL0344 / Sigma-Aldrich	1:150	Citrat, pH 6	Tegument

<b>VEGFR2 (KDR/Flk-1)</b>	Policlonal/ Abcam	1:300	Citrat, pH 6	Rinichi
<b>ANG 2</b>	F1/ SantaCruz Biotechnology	1:50	Citrat, pH 6	Placentă
<b>TGFβ1</b>	3C11/ SantaCruz Biotechnology	1:250	Citrat, pH 6	Rinichi
<b>TGFβ RI</b>	H-100/ SantaCruz Biotechnology	1:50	Citrat, pH 6	Rinichi

### **Anticorpi utilizați în studiul carcinoamelor scuamoase linguale**

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 Nikon Eclipse 55i și softul Image-Pro Plus.

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

**Analiza epidemiologică** a relevat prevalența cazusiticii în rândul persoanelor de sex masculin cu circa 64,81%, raportul pe sexe fiind de circa 1:1,2 în favoarea bărbaților. Topografia lezională a arătat că cele mai frecvente cazuri de carcinom scuamos lingual s-au dezvoltat în cele 2/3 anterioare ale limbii (33,33%), marea majoritate a bolnavilor noștri provenind din mediul rural (57,41%), iar principalul factor de risc incriminat în etiopatogenia acestor carcinoame a fost expunerea mixtă la alcool și fumat (76%). Potrivit datelor furnizate de Programul pentru Supraveghere, Epidemiologie și a Rezultatelor Finale (SEER) între anii 1975 -2007 s-a înregistrat o creștere a incidenței carcinoamelor orale îndeosebi în rândul femeilor tinere, în special ca urmare a creșterii incidenței cancerelor lingual [366]. Potrivit datelor din literatura de specialitate cel mai frecvent tumorile linguale s-ar dezvolta pe marginile limbii [378] și mult cele 2/3 anterioare ale limbii [379]. În literatură cei mai frecvent incriminați factori în etiologia cancerului oral sunt tutunul (fumatul și mestecatul tutunului) și alcoolul [381-383]. La care se mai pot adăuga ocazional deficiențele nutriționale, dențiția proastă și virusurile [381, 384, 385].

**Studiul histopatologic** a evidențiat faptul că cele mai multe tumori au corpus variantei nekeratinizat (44,44%), fiind urmate îndeaproape de formele keratinizate (37%) și la o anumită distanță de varianta acantolitică (13%). Tendința manifestată ultima vreme este de a grupa carcinoamele scuamoase orale în 3 mari categorii: I. nekeratinizat, având în etiopatogenie infecția cu HPV și cu localizare predominantă la nivelul orofaringelui; II. keratinizat, fără legătură etiopatogenică HPV și III. keratinizat cu diferențiere scuamoasă, ariile de keratinizare nedepășind 10% din tumoră și în care legătura etiopatogenică cu infecția HPV nu este atât de evidentă [390]. Din punct de vedere al gradului de diferențiere cele mai multe cazuri ale cazusiticii noastre au fost diagnosticate în categoria celor moderat diferențiate (57,4%), aici fiind încadrate toate cazurile de tumori acantolitice, majoritatea cazurilor de carcinoame necheratinizate și 5 cazuri de carcinom scuamos keratinizat care au prezentat rare perle keratozice. Acest sistem histologic de gradare a malignității deși este destul de frecvent folosit în clinică, totuși are o utilitate prognostică redusă în cazul carcinoamelor scuamoase orale în general și respectiv carcinoamelor cu localizare linguală în particular [401-403].

Referitor la patternul invaziei tumorale, investigarea cazuisticii noastre a evidențiat prevalența cazurilor cu pattern invaziv de tip 3 (42,59%), cazuri în care invazia s-a realizat sub formă de grupuri celulare mici sau cordoane de celule infiltrative. Marea majoritate a studiilor au confirmat faptul că tumorile scuamose orale cu pattern de invazie de grad înalt se asociază și cu un prognostic prost [409, 410]. În raport cu prezența invaziei limfoganglionare am consemnat faptul că acest aspect a fost prezent în doar 27,77% din totalul cazuisticii investigate. Datele din literatură indică invazia limfoganglionară ca un factor de prognostic nefavorabil în carcinoamele scuamoase linguale, având în vedere asocierea mai frecventă a acestora cu metastazele limfoganglionare cervicale și/sau cu recidivele locoregionale [414, 415]. Referitor la invazia tumorilor în musculatura proprie a limbii în studiul nostru am consemnat faptul că acest aspect a fost observat în mai mult de jumătate din cazuri (62,96%). Datele din literatură indică invazia musculară ca fiind un aspect morfologic destul de frecvent întâlnit, indicându-se un procent de 85% de tumori invazive în musculatura proprie a limbii, iar în 91% din recidive acest aspect a fost prezent [419]. În cadrul cazuisticii noastre am consemnat prezența de margini pozitive (invadate tumoral) în aproximativ 1/3 din cazuri (31,48%), cel mai adesea depistând invazia unei singure limite (24,7% din totalul cazuisticii investigate, respectiv 76,47% din totalul cazurilor cu invazia limitelor). Consensul general este că prezența unor margini de rezecție clare este un important factor de prognostic, dar rămâne încă controversată problema ce înseamnă cu adevărat o margine de rezecție adecvată. Câțiva cercetători au recomandat margini adecvate pe cele care aveau până la 2cm, în timp ce alții au sugerat 3mm ca fiind suficienți [424], deși tendința manifestă astăzi este să se considere 1cm tridimensional ca fiind o margine adecvată [425]. Analiza cazuisticii noastre în raport cu stadializarea pTNM a evidențiat faptul că 2/3 din cazuri (circa 70,38%), au fost diagnosticate în stadiile II și III în procente egale (35,18%). Marea majoritate a datelor din literatură indică diagnosticarea cazurilor de cancer lingual în stadiile I și II, și mult mai puține în stadii avansate [413].

**Analiza imunohistochimică.** Utilizând markerul CD105 am vizualizat în principal vasele tumorale care au avut o morfologie aberantă, fiind tortuoase, cu ramificări, deseori colabate și de dimensiuni mici ( $<15\mu\text{m}$  în diametru) sau am observat prezența unor arhitecturi vasculare mult mai complexe cu numeroase puncte de înmugurire, precum și celule endoteliale izolate CD105 reactive, îndeosebi în frontul de invazie tumoral. Cuantificarea MVD-CD105 a evidențiat existența unui proces de angiogeneză mult mai activ la nivelul frontului de invazie comparativ cu ariile intratumorale, procesul fiind mult mai evident în formele slab diferențiate, respectiv în stadiile II-IV pTNM. Studii care au utilizat CD105 ca și marker endotelial și au cuantificat MVD în carcinoamele scuamoase ale capului și gâtului au arătat valoarea sa prognostică, tumorile cu valori mari ale MVD-CD105 asociindu-se cu un prognostic prost [349, 445, 446].

Pe cazuistica investigată evaluarea MVD-  $\alpha\text{SMA}$  a arătat prevalența vaselor  $\alpha\text{SMA}+$  la nivelul frontului de invazie comparativ cu aria intratumorală, existând diferențe semnificative statistice. Am mai consemnat existența unor corelații semnificativ statistice ale MVD-  $\alpha\text{SMA}$  și gradul de diferențiere, atât intratumoral cât și la nivelul frontului de invazie. Studii din literatură indică existența unor grade variate de acoperire

cu pericite a noilor vase tumorale (CD34+/ $\alpha$ SMA+) și prin urmare și grade variate de maturitate vasculară în diverse tumori umane [455].

În studiul efectuat de noi am remarcat o corelație a indexului de proliferare tumorală cu gradul de diferențiere tumorală, valorile cele mai mari fiind înregistrate în tumorile linguale slab diferențiate. În plus am mai consemnat: (1) variații ale acestui index cu gradul patternului invaziv, valori mari fiind înregistrate în patternurile 3 și 4; (2) IP-Ki67 a avut valori mai mari în tumorile cu invazie vasculară și musculară comparativ cu tumorile noninvazive; (3) tumorile cu stadiu evolutiv avansat au avut valori mai mari ale indexului de proliferare tumorală. Studii efectuate asupra indexului de proliferare pentru Ki-67 în carcinoamele scuamoase orale, incluzând carcinoamele cu localizare linguală au arătat că valorile mari ale acestui index sunt semnificativ mai mari la bolnavii cu metastaze limfoganglionare cervicale, constituind un factor de prognostic independent în evaluarea supraviețuirii unor astfel de bolnavi [456].

Analiza cazisticii investigate de noi a evidențiat existența unor corelații ale imunomarcajului pentru VEGF și gradul de diferențiere tumorală, scorurile imunoreactivității pentru VEGF fiind mai mari în formele bine diferențiate comparativ cu cele slab diferențiate. Spre deosebire de noi, date din literatură privind reactivitatea pentru VEGF indică existența unor diferențe semnificative statistice de reactivitate a fontului de invazie versus periferie, cea mai mare expresie înregistrându-se la frontul de invazie al carcinoamelor scuamoase orale [213].

În ceea ce privește reactivitatea tumorală la receptorii factorului de creștere VEGF am consemnat faptul că VEGFR1 a fost exprimat în 60% din cazurile investigate, în timp ce VEGFR2 a fost reactiv în 55% din cazuri. Ambele scoruri de imunoreactivitate ale celor doi receptori s-au corelat semnificativ cu gradul diferențierii tumorale și stadiul evolutiv al bolii. Date din literatură indică expresia receptorilor factorului proangiogen VEGF atât la nivelul celulelor tumorale cât și la nivelul celulelor endoteliale vasculare tumorale din carcinoamele scuamoase orale [470-472]. Acest fapt ar indica implicarea axului VEGF-VEGFR1,2 în progresia tumorală atât direct via unor mecanisme de reglaj autocrin și paracrin cât și indirect prin stimularea angiogenezei tumorale [470, 473].

Investigația cazisticii noastre a evidențiat faptul că imunoreactivitatea tumorală pentru TGF $\beta$ 1 a fost cea mai mare în carcinoamele scuamoase moderat diferențiate, predominând în frontul de invazie. În plus am mai consemnat corelația scorului IHS pentru TGF $\beta$ 1 cu indexul de proliferare tumorală. Într-o serie de studii efectuate asupra carcinoamelor scuamoase ale capului și gâtului s-a evidențiat faptul că în peste 80% din tumori a fost exprimat TGF $\beta$ 1 și că expresia acestui factor de creștere se corelează cu stadiile avansate de boală și reducerea ratei de supraviețuire [481, 482].

În studiul nostru circa 80% din cazurile investigate au exprimat receptorul TGF $\beta$ R1. Imunoreactivitatea cea mai mare a fost observată în formele moderat diferențiate, cazuri în care a existat și o corelație a sa cu factorul de creștere TGF $\beta$ 1. Investigarea expresiei receptorilor TGF $\beta$  în carcinoamele scuamoase ale capului și gâtului a arătat o subexpresie a receptorilor TGF $\beta$ R2 și TGF $\beta$ R3, aproximativ 35% din speciunile tumorale orale prezentând o slabă reactivitate sau absența expresiei TGF $\beta$ R2, iar 53% absența sau o reactivitate mică în cazul receptorului TGF $\beta$ R3 [486]. În plus această scădere de reactivitate a fost asociată cu progresia carcinoamelor scuamoase orale, acest eveniment având loc precoce încă din faza preneoplazică de leucoplazie orală.



Ang2 pe cazusitica investigată de noi s-a pozitivat în 65% din speci­me­nele tumorale linguale. Imunoreactivitatea tumorală a prezentat variații cu gradul de diferențiere și stadiul tumoral. Într-un studiu recent efectuat asupra carcinoamelor scuamoase orale s-a găsit un procent destul de ridicat (circa 54%) de tumori care au exprimat Ang2 și VEGF, iar parametrii angiogeni investigați (microdensitatea tumorală și indexul de maturitate vasculară) s-au corelat semnificativ cu expresia acestui factor proangiogen [454].

**Capitolul VII.- Concluzii** scoate în evidență cele mai importante rezultate ale studiului nostru:

- Profilul epidemiologic general al acestor bolnavi arată prevalența cazuisticii la persoanele de sex masculin (64,81%), în decada a VI-a de viață (33,33%), cu dezvoltare cel mai frecvent la nivelul celor 2/3 anterioare ale limbii (33,33%).

- Studiul histopatologic a evidențiat prevalența formelor nekeratinizate de carcinom scuamos (44,44%), a formelor moderat diferențiate (57,4%), cu pattern de invazie cel mai frecvent de tip 3 (42,59%), prezentând invazie vasculară în 27,77%, perineurală în 33,33% din cazuri, invazie musculară în 62,96%, iar 31,48% din cazuri și invazia microscopică a marginilor de rezecție. Totodată 27,78% au prezentat diseminare limfoganglionară în momentul diagnosticului, iar 71% din cazuri au fost diagnosticate în stadiile II și III pTNM.

- MVD-CD105 a evidențiat un proces de angiogeneză mult mai activ la nivelul frontul de invazie comparativ cu ariile intratumorale, îndeosebi în formele slab diferențiate și respectiv în stadii avansate de boală.

- La nivelul frontului de invazie am mai consemnat accentuarea imaturității vasculare pe măsură ce patternul de invazie a devenit mai discoeziv, în cazul prezenței invaziei vasculare, perineurale, musculare, precum și în cazul tumorilor aflate într-un stadiu tumoral avansat.

- Indexul de proliferare pentru Ki-67 a prezentat valori semnificativ superioare în cazul carcinoamelor slab diferențiate, cu pattern de invazie discoeziv (3 și 4), invazie vasculară și musculară, aflate în categoria T3-T4, cu metastaze ganglionare și în stadii tumorale avansate.

- Imunoreactivitatea tumorală pentru VEGF a avut valori semnificativ mai mari în formele bine diferențiate și a avut o tendință de creștere la periferia insulelor tumorale comparativ cu centrul acestora. În plus am mai consemnat existența unei corelații cu microdensitatea vasculară, indexul de proliferare pentru Ki67 și densitatea vaselor marcate cu  $\alpha$ SMA, indiferent de topografia tumorală.

- Deși expresia celor 2 receptori nu s-a corelat cu cea a factorului VEGF, între ei au existat corelații slabe și ambii receptori s-au corelat cu indexul de proliferare la Ki-67, rata cea mai înaltă de imunoreactivitate obținând-o în tumorile cu cea mai mare rată de proliferare

- Reactivitatea vaselor tumorale pentru TGF $\beta$ 1, mai ales a celor din frontul de invazie sugerează implicare directă a acestui factor de creștere în procesul de angiogeneză

- Implicare activă a Ang2 în procesul de angiogeneză tumorală este dovedită pe de o parte prin expresia acestuia la nivelul celulelor endoteliale cât și prin faptul că imunoreactivitatea sa tumorală s-a corelat cu cea pentru VEGF.

- Valoarea prognostică a investigării markerilor VEGF, MVD-CD105 și a IP-Ki67 în carcinoamele scuamoase linguale, permițând selectarea tumorilor cu caracter agresiv.

- Participarea la procesul de angiogeneză tumorală din carcinoamele scuamoase orale au unor bucle de reglaj autocrin ca urmare a coexpresiei markerilor investigați la nivelul celulelor endoteliale și au unor bucle de reglaj paracrin cu participarea atât a celulelor tumorale cât și a partenerilor lor celulari stromali.

#### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:**

213. Kim SH, Cho NH, Kim K, Lee JS, Koo BS, Kim JH, Chang JH, Choi EC. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol.* 2006;93(4):330-7.

349. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, Staffieri C, Mariuzzi ML, Violino E, De Filippis C. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2006;126(6):633-9.

366. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, Hayes DN, Shores C, Chera BS. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1488-94.

378. Ong CK, Chong VF. Imaging of tongue carcinoma. *Cancer Imaging.* 2006;6:186-93.

379. McGurk M, Goodger NM. Head and neck cancer and its treatment: historical review. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38(3):209-20.

381. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(4):340-4.

382. Sanghvi LD, Rao DN, Joshi S. Epidemiology of head and neck cancers. *Semin Surg Oncol.* 1989;5(5):305-9.

383. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res.* 1998;18(6B):4779-86.

384. Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health.* 1996;50(6):636-9.

385. Preston-Martin S, Henderson BE, Pike MC. Descriptive epidemiology of cancers of the upper respiratory tract in Los Angeles. *Cancer.* 1982;49(10):2201-7.

390. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkans K, Soini Y, Alho OP, Salo T. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer.* 2000;83(5):614-9.

401. Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A, Al-Amro A. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol.* 2000;36(6):508-14.

402. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2003;39(4):386-90.

403. Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M, Konishi N. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(4):227-33.

409. Chang YC, Nieh S, Chen SF, Jao SW, Lin YL, Fu E. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010;57(2):295-303.

410. Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Apr;113(4):518-25.

413. Rodrigues PC, Miguel MC, Bagordakis E, Fonseca FP, de Aquino SN, Santos-Silva AR, Lopes MA, Graner E, Salo T, Kowalski LP, Coletta RD. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Jul;43(7):795-801.

414. Chen YW, Yu EH, Wu TH, Lo WL, Li WY, Kao SY. Histopathological factors affecting nodal metastasis in tongue cancer: analysis of 94 patients in Taiwan. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37(10):912–6.
415. Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CA, Kowalski LP, Graner E. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. *Oral Dis* 2008;14(4):376–82.
419. Sharma P, Shah SV, Taneja C, Patel AM, Patel MD. A prospective study of prognostic factors for recurrence in early oral tongue cancer. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(11):2559-62.
424. Nason RW, Binahmed A, Pathak KA, Abdoh AA, Sándor GK. What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(5):625-9.
425. McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, Gardiner S, Junor E. Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003;41(4):224-31
445. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2006;448(6):768-75.
446. Schimming R, Marmé D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* 2002;24(2):151-6.
454. Li C, Fan J, Song X, Zhang B, Chen Y, Li C, Mi K, Ma H, Song Y, Tao X, Li G. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor receptor-3 correlates with lymphangiogenesis and angiogenesis and affects survival of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(9):e75388.
455. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000;60(5):1388-93.
456. Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(11):1005-10.
470. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol.* 2005;18(4):485-94.
471. Lalla RV, Boisoeneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(8):882-8.
472. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Steiner GE, Rockwell P, Gedlicka C, Burian M. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope.* 2001;111(10):1834-41.
473. Mărgăritescu C, Pirici D, Simionescu C, Mogoantă L, Raica M, Stîngă A, Ciurea R, Stepan A, Stîngă A, Ribatti D. VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50(4):527-48.
481. Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res.* 2004;64(13):4405-10.
482. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(1-2):41-58. [486].
486. Meng W, Xia Q, Wu L, Chen S, He X, Zhang L, Gao Q, Zhou H. Downregulation of TGF-beta receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts. *BMC Cancer.* 2011;11:88.