

MARCOS FERNANDO SANTOS MELLO

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A DENSIDADE
MICROVASCULAR LINFÁTICA E A EXPRESSÃO DE FATORES
LINFANGIOGÊNICOS (VEGF-C, HGF) ENTRE CARCINOMAS
SALIVARES, AGRUPADOS EM DUAS CATEGORIAS,
CONFORME O RISCO DE DAR METÁSTASES**

CAMPINAS

UNICAMP

2011

MARCOS FERNANDO SANTOS MELLO

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A DENSIDADE
MICROVASCULAR LINFÁTICA E A EXPRESSÃO DE FATORES
LINFANGIOGÊNICOS (VEGF-C, HGF) ENTRE CARCINOMAS
SALIVARES, AGRUPADOS EM DUAS CATEGORIAS,
CONFORME O RISCO DE METÁSTASES**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração Anatomia Patológica

ORIENTADOR: Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

CAMPINAS

UNICAMP

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

M489e

Mello, Marcos Fernando Santos

Estudo comparativo entre a densidade microvascular linfática e a expressão de fatores linfangiogênicos (VEGF-C, HGF) entre carcinomas de glândulas salivares, agrupados em duas categorias, conforme o risco de metástases. / Marcos Fernando Santos Mello - Campinas, SP: [s.n.], 2011

Orientador: Albina Messias de Almeida Milani Altemani
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glândulas salivares. 2. Câncer. 3. VEGF. 4. Metástase. 5. Gânglios linfáticos. I. Altemani, Albina Messias de Almeida Milani. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Lymphatic microvessel density and expression of lymphangiogenic factors (VEGF-C, HGF) in salivary carcinomas subdivided according to the risk for nodal metastasis.

Keywords:

- Salivary glands
- Cancer
- VEGF
- Metastasis
- Lymph Nodes

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de Concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Dias Demasi

Prof. Dr. Athanase Billis

Data da defesa: 23-02-2011

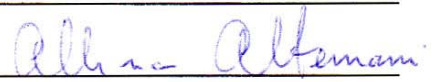
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Marcos Fernando Santos Mello

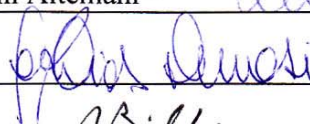
Orientador(a): Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Membros:

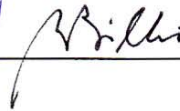
1. Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani -



2. Profa. Dra. Ana Paula Dias Demasi -



3. Prof. Dr. Athanase Billis -



Curso de pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/2011

A meus pais e
irmãos,
por tudo.

A Mariana Boscolo
que me inspirou
desde o momento que
entrou em minha vida.

Ao Vinicius, Caio, Camila e Bruno,
para sempre família.

Aos amigos que
partilharam e torceram pela
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Albina Altemani por aceitar a tarefa de orientar este trabalho e contribuir decisivamente com a qualidade do mesmo.

À Dra. Ana Flavia de Mattos Costa pelo seu grau de envolvimento no projeto e pela generosidade com que sempre compartilhou os seus conhecimentos.

Ao Dr. Leandro Luis L. Freitas pela ajuda em todas as etapas do processo, incentivo, camaradagem e companheirismo.

À Elizabeth Justi, Maria do Carmo e Adilson Piazza, sempre presentes nos momentos decisivos.

À Claudia, Maria Rita, Vanderlei, Aparecido, Geralda, Luzia, Carlinhos, Flavia, Verinha, Lucinha, Sergio, Gina, Zezé, Rogério e Divani.

À Fatima, Luisão, Ana Alzira, Ismael, Silvia Helena, Ivete, Malvina, Militão, Marcos Gongora e Alvaro.

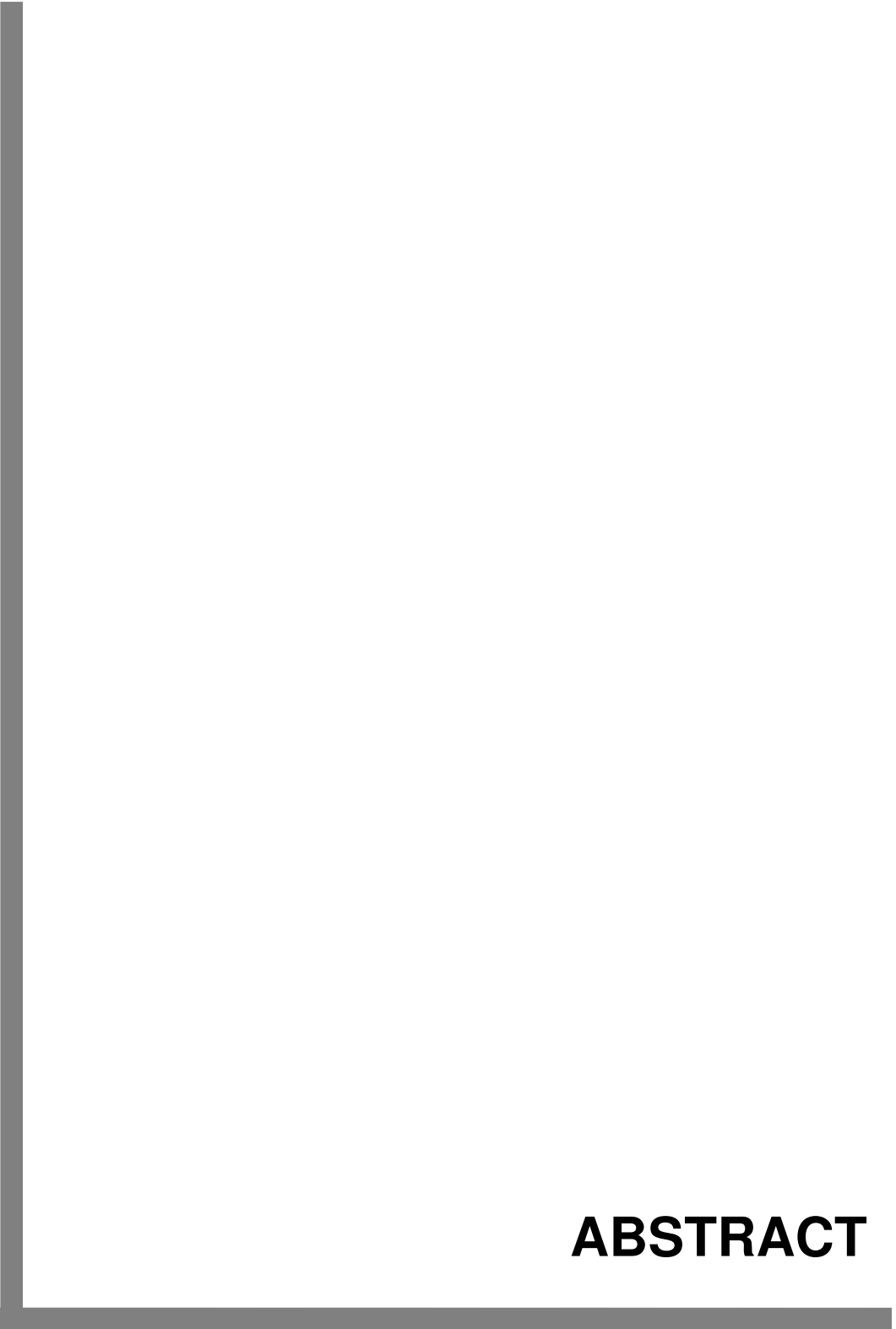
Ao grande amigo Renato Floras Vargas.

Aos Médicos Assistentes, Docentes e Médicos Residentes do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP.



RESUMO

Metástase em linfonodo é um importante indicador prognóstico em cânceres de cabeça e pescoço, incluindo carcinomas salivares. Nestes, o risco de metástases em linfonodos é variável e fortemente associado com o tipo histológico do tumor. O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade vascular linfática (DVL) e a expressão dos fatores de crescimento linfangiogênicos das células tumorais em diferentes tipos de carcinomas salivares subdivididos de acordo com o risco para metástases em linfonodos. Em 15 tumores de alto risco (indiferenciado, mucoepidermóide de alto grau e carcinomas de ducto salivar) e 60 de baixo/moderado risco (adenóide cístico, mucoepidermoide de grau baixo/intermediário, célula acinar, mioepitelial, carcinoma mioepitelial-epitelial e carcinoma polimórfico de baixo grau) foram examinadas as expressões do fator de crescimento do endotélio vascular-C (VEGF-C), fator de crescimento do hepatócito (HGF) e D2-40 (para avaliação da LVD). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre carcinomas de alto e baixo/moderado risco, em relação a DVL e a expressão de VEGF-C ou HGF. Além disso, a expressão destas proteínas não teve correlação com a DLV. Invasão vascular linfática foi encontrada principalmente em carcinomas de alto risco. A DLV intratumoral foi significativamente mais baixa do que a peritumoral, independentemente do risco para metástases e do sítio primário da lesão. Em conclusão, os tipos histológicos dos carcinomas salivares que estão associados com alto risco para metástase em linfonodos não apresentam aumento da DVL ou expressão do VEGF-C e HGF. A maior tendência para metástases nestes carcinomas parece estar relacionada com a sua capacidade para invadir os vasos linfáticos. Estudos adicionais sobre a interação das células tumorais com as células endoteliais são necessários para aumentar a nossa compreensão sobre o potencial metastático dos carcinomas salivares.



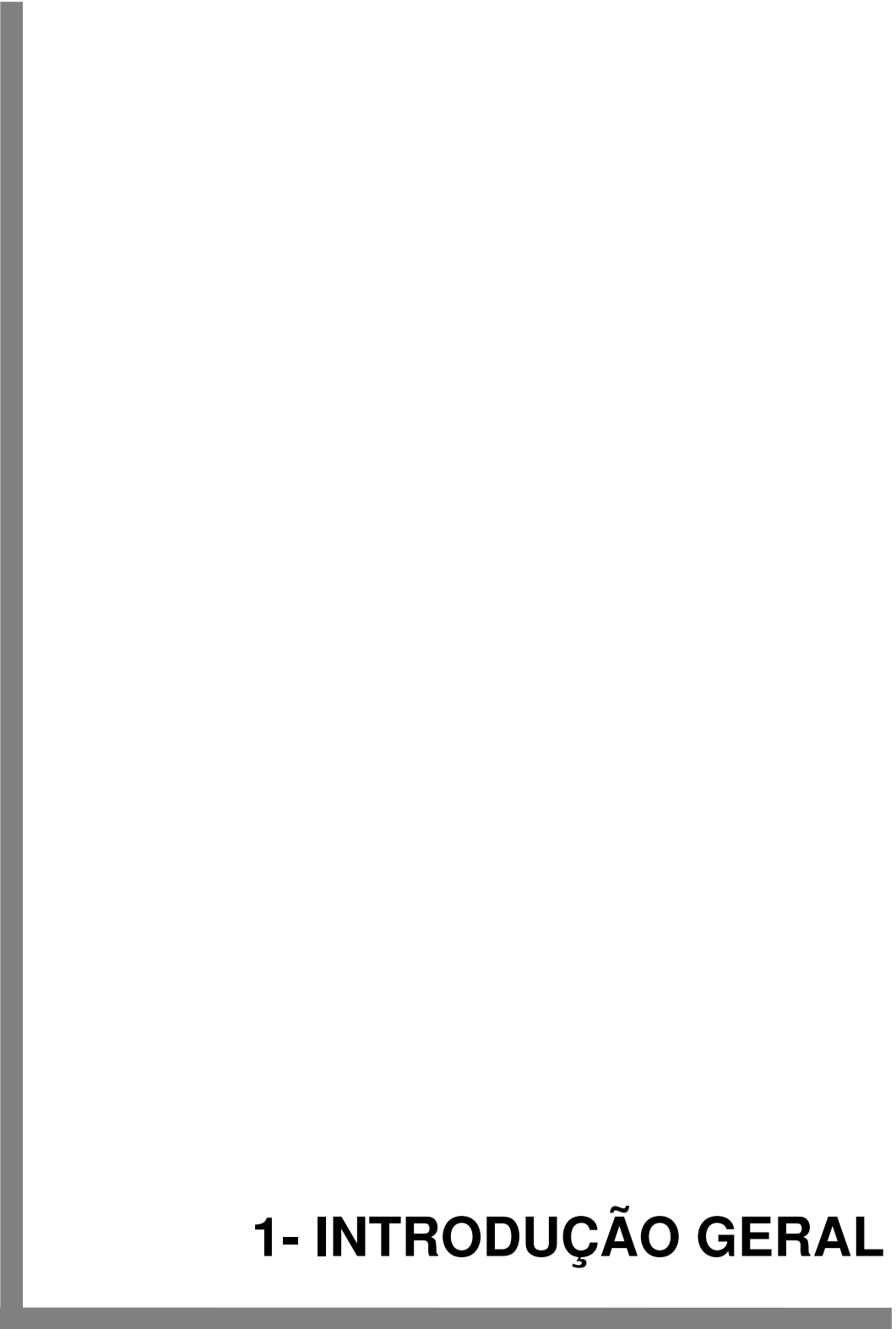
ABSTRACT

Nodal metastasis is an important prognostic indicator in head and neck cancers, including salivary carcinomas. In these, the risk for lymph node metastasis is variable and strongly associated with the tumor histologic type. The aim of the current study was to evaluate the lymphatic vessel density (LVD) and expressions of lymphangiogenic growth factors by tumor cells in different histologic types of salivary carcinomas subdivided according to the risk for nodal metastasis. In 15 high-risk (undifferentiated, high-grade mucoepidermoid and salivary duct carcinomas) and 60 low/moderate-risk tumors (adenoid cystic, low/intermediate-grade mucoepidermoid, acinic cell, myoepithelial, epithelial-myoepithelial and polymorphic low-grade carcinomas) the expressions of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), hepatocyte growth factor (HGF) and D2-40 (for assessing LVD) were examined. No significant differences were encountered between high and low/moderate/-risk carcinomas regarding LVD and VEGF-C or HGF expressions. Furthermore, the expression of these proteins did not correlate with LVD. Lymphatic vascular invasion was mainly found in high-risk carcinomas. Intratumoral LVD was significantly lower than peritumoral, regardless of the risk for metastasis and primary site of the lesion. The histologic types of salivary carcinomas which are associated with high-risk for nodal metastasis do not present increased LVD or VEGF-C and HGF expressions. The greater tendency for metastasis in these carcinomas seems to be related to their capacity to invade lymph vessels. Further studies on tumor cell interactions with lymphatic endothelial cells are needed to improve our understanding of the metastatic potential of salivary carcinomas.

LISTA DE ABREVIATURAS

DLV-	Densidade Vascular Linfática
HGF-	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
VEGF-	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
PLGF-	Fator de Crescimento Placentário
PDGFs-	Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas

	Pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1- Antecedentes na Literatura.....	13
1.2- Vasos linfáticos e linfangiogênese.....	14
1.3- D2-40 (Podoplanina).....	19
2- JUSTIFICATIVA.....	22
3- OBJETIVOS.....	24
3.1- Gerais.....	25
3.2- Específicos.....	25
4- ARTIGO.....	26
5- DISCUSSÃO.....	46
6- CONCLUSÃO.....	50
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Antecedentes na literatura

Os vasos linfáticos são a principal via de metástase para a maioria dos tipos de carcinoma (1), no entanto, pouco se sabe a respeito do mecanismo de linfangiogênese (formação de novos vasos linfáticos) e os meios através dos quais ocorrem as metástase. Um dos motivos da dificuldade de se estudar estas estruturas era a falta, até recentemente, de um anticorpo específico para o endotélio linfático. Entretanto, atualmente, há vários marcadores disponíveis comercialmente, sendo a podoplanina considerada a mais específica e a mais utilizada na pesquisa de vasos linfáticos tumorais (2).

Com o advento destes marcadores linfáticos, surgiram vários estudos sobre a rede linfática em vários tipos de tumores mostrando diferenças importantes entre eles. Em alguns deles, tais como o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e o melanoma cutâneo, os vasos linfáticos, tanto intra quanto peritumorais, são funcionantes e passíveis de invasão, além de ocorrer linfangiogênese dentro da massa tumoral (3, 4, 5). Em contrapartida, outras neoplasias como os carcinomas de mama, ovário e pulmão não evidenciaram linfáticos intratumorais, sendo funcionantes apenas os peritumorais (6, 7, 8, 9, 10).

Nos tumores de glândula salivar não há estudos sobre a rede vascular linfática, exceto um trabalho recente, em carcinomas originados em adenoma pleomórfico (11). Nestes carcinomas, a rede linfática era constituída principalmente por vasos pré-existentes e tanto os linfáticos peritumorais quanto os intratumorais eram condutores de células carcinomatosas.

Os carcinomas de glândula salivar são neoplasias que apresentam grande diversidade histológica, podendo ser classificados em pelo menos 18 tipos histológicos, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde - 1991 (OMS) (12). Do ponto de vista de comportamento biológico estes carcinomas podem ser agrupados em três categorias, conforme a probabilidade de dar metástases cervicais (13):

- a) **baixo risco (menos de 20%)**- carcinoma adenóide cístico, carcinoma mucoepidermóide de graus baixo e intermediário,
- b) **risco moderado (20 a 50%)**- carcinoma de células acinares, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial,
- c) **risco alto (maior que 50%)**- adenocarcinoma, carcinoma indiferenciado, carcinoma mucoepidermóide de alto grau e carcinoma do ducto salivar.

Entre os carcinomas originados no adenoma pleomórfico, que pertence à categoria dos tumores com risco moderado para metástases cervicais, foram encontradas diferenças entre os carcinomas com e sem diferenciação mioepitelial, sendo que êmbolos linfáticos carcinomatosos e metástases foram observados exclusivamente nos tumores sem diferenciação mioepitelial (11).

É possível que as diferenças em relação à rede linfática encontradas nos tumores reportados na literatura, assim como nos casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, possam refletir diferenças genuínas quanto ao comportamento maligno dos diversos tipos de cânceres humanos. Conhecimento sobre a vascularização linfática é importante para o entendimento da relação tumor/estroma e da carcinogênese. Além disso, o descobrimento de fatores de crescimento relacionados à linfangiogênese tem levantado a questão de como eles são expressos nos cânceres humanos e se contribuem para a habilidade metastática dos tumores.

1.2- Vasos linfáticos e linfangiogênese

O sistema linfático é um sistema circulatório de drenagem, constituído por vasos coletores, linfonodos, troncos e ductos que transportam a linfa de volta para a circulação sanguínea (14, 15, 16, 17, 18). Origina-se na periferia dos tecidos como uma rede de vasos em fundo cego, conhecidos como linfáticos

iniciais ou terminais, medindo de 10-60µm de diâmetro, revestidos apenas por uma camada contínua, não fenestrada de células endoteliais (17, 19, 20, 21). Este sistema, além de propiciar meios para o retorno do fluido intersticial para a circulação sangüínea e ter papel importante na resposta imune (transporta linfócitos e células apresentadoras de antígeno para os linfonodos), é uma excelente via de disseminação neoplásica que decorre dos seguintes aspectos: os linfáticos iniciais são bem mais largos que os capilares sanguíneos, não possuem membrana basal contínua, apresentam velocidade de fluxo bem menor que aquela do sistema sangüíneo e a linfa, por ter composição semelhante à do fluido intersticial, é capaz de promover a viabilidade celular (21, 22, 23, 24).

Apesar dos vasos linfáticos serem as principais vias de metástase para a maioria dos tipos de carcinoma (1), pouco se sabe a respeito do mecanismo de linfangiogênese (formação de novos vasos linfáticos) e os meios através dos quais ocorrem as metástases (14, 15, 16, 18, 21). O descobrimento dos marcadores das células endoteliais linfáticas (CEL) permitiu, pela primeira vez, caracterizar indubitavelmente, os linfáticos tumorais e a avaliação da linfangiogênese durante a progressão tumoral. Os conceitos, que até a pouco prevaleciam, que os vasos linfáticos estavam ausentes nos tumores e que a linfangiogênese não ocorria no câncer (25, 26, 27) foram revistos em decorrência da aplicação destes marcadores. Entre estes, a anti-podoplanina, o anti-Prox -1 e o anti-LYVE-1 são os anticorpos comercialmente existentes mais específicos para o endotélio linfático e destes a anti-podoplanina é considerada o mais específico e o mais utilizado na pesquisa de vasos linfáticos tumorais (2). A podoplanina é uma glicoproteína de membrana de 38-KDa que é intensa e seletivamente expressa em vasos linfáticos, não apresentando marcação em vasos sanguíneos (28, 29). Entretanto, também pode ser expressa em alguns tecidos e células normais, tais como osteócitos, condrócitos, podócitos do rim, leptomeninges, células alveolares tipo I do pulmão, ceratinócitos basais da pele, da cérvix uterina e do esôfago, miofibroblastos, células mioepiteliais da mama e das glândulas salivares, e nos brônquio (30).

Em relação aos fatores (moléculas) que têm papel importante em induzir a linfangiogênese, os dois mais estudados são membros da família VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). A família do VEGF dos mamíferos é formada pelos VEGFs-A, -B, -C -D e -E e também pelo fator de crescimento placentário (PlGF). A sinalização do VEGF nas células endoteliais ocorre por meio de três receptores tirosina kinase (VEGFRs): VEGFRs-1, -2 e -3. O VEGFR-1 liga-se ao VEGFs-A e -B e ao PlGF, o VEGFR-2 liga-se ao VEGFs-A, -C, -D e -E, enquanto que o VEGFR-3 liga-se apenas ao VEGFs-C e -D. Nos tecidos adultos, o VEGFRs-1 e -2 são predominantemente expressos pelas células endoteliais vasculares sanguíneas e sinalizam para promover a proliferação celular, migração e angiogênese. O VEGFR-3 é restrito às células endoteliais linfáticas no tecido adulto e em alguns vasos sanguíneos fenestrados (22). O VEGF-C e VEGF-D, que são ligantes do VEGFR-3, são considerados fatores indutores de linfangiogênese, embora alguns estudos experimentais tenham mostrado possível participação destas moléculas também na angiogênese (22).

Em relação à expressão destes dois fatores linfangiogênicos (VEGF-C e VEGF-D) em células neoplásicas do tumor primário e sua correlação com invasão linfática ou metástase linfonodal, o VEGF-C é o que, aparentemente, tem associação mais significativa (22). Correlação positiva entre níveis de VEGF-C e metástase foi reportada em vários tumores, entre eles, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (31), carcinoma colorretal (32), carcinoma cervical (33) e carcinoma gástrico (22, 34). Entretanto, no que se refere ao VEGF-D, a correlação entre sua expressão no câncer primário e metástase é, não raro, discordante entre os estudos e, em alguns, é descrita expressão diminuída de VEGF-D no tumor em comparação com o tecido normal (31, 35).

Até recentemente, o VEGF-C e o VEGF-D, através da interação com o receptor VEGFR-3, eram consideradas as únicas moléculas estimuladores da linfangiogênese, porém, vários estudos demonstraram que outros fatores podem participar da indução de linfáticos, entre estes, angiopoietina -2 (26), neuropilina -2 (37), Prox-1 (38), fator de crescimento de fibroblastos-2 (39, 40),

fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) (41) e membros da família dos fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs) (39). A família PDGF é composta por cinco proteínas: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD, cuja atividade biológica é mediada por três formas de receptores tirosina kinase (PDGFR alfa, PDGFR alfa/beta, PDGFR beta). A complexidade de interação dos vários ligantes receptores sugere que estes fatores de crescimento tenham funções fisiológicas distintas e importantes, sendo que, recentemente, foram encontradas evidências que apontam o PDGF-BB como fator linfangiogênico (39). Estudos *in vitro* mostraram que o PDGF-BB estimula a atividade MAP kinase e a motilidade de células endoteliais linfáticas e, *in vivo*, induz o crescimento de vasos linfáticos (42). Além disso, foi encontrada correlação positiva entre expressão de PDGF-BB em células de fibrossarcoma murino, na linfangiogênese e no aumento de metástases linfonodais (42). Em câncer humano, carcinomas mamários podem expressar altos níveis de PDGF-BB (43). Acredita-se que esta importante ação do PDGF em induzir a linfangiogênese seja independente da sinalização VEGF-C/-D/VEGFR-3 (39) e que a família dos PDGFs promova a progressão tumoral maligna agindo como fator de crescimento direto para as células tumorais, estimulando a angiogênese sanguínea e as metástases sanguíneas, a linfangiogênese e as metástases linfáticas (39).

Além das células tumorais, outras que fazem parte da reação inflamatória ao tumor, também podem expressar fatores indutores de linfangiogênese. Em câncer de mama foi descrito que macrófagos associados ao tumor expressavam VEGFs- C e -D, indicando assim, uma fonte adicional de fatores linfangiogênicos (2). Curiosamente, o VEGF-C também é quimiotático para macrófagos (44) e facilmente induzido por citocinas pró-inflamatórias (45), o que poderia explicar a correlação positiva entre resposta inflamatória tumoral e expressão de fator linfangiogênico relatada em carcinomas de mama e cervical (2, 46).

O HGF foi originalmente identificado como uma proteína liberada por plaquetas de ratos após hepatectomia parcial, atuando na aceleração da regeneração hepática (47). Pertence à superfamília do gene protrombina-

plasminogênio (48) e foi descrito inicialmente como fator com ação específica para o fígado. Atualmente sabe-se que o HGF tem ação mitogênica em vários tipos celulares, como melanócitos e células dos túbulos renais, na motilidade celular, angiogênese e atividade anti-apoptótica em células epiteliais normais e neoplásicas (49). O HGF é também necessário na morfogênese e homeostasia em vários estágios do desenvolvimento normal do corpo e durante o desenvolvimento fetal (50). A expressão do HGF tem sido reportada em tumores malignos e benignos originários de vários órgãos, incluindo medula óssea, mama, próstata, cólon, pulmão, fígado, rim, útero, colo e endométrio (24). A expressão estromal do HGF tem sido relacionada com metástases em carcinomas salivares (51).

O HGF tem um papel direto na promoção do crescimento da célula tumoral e invasão, além de estimular a linfangiogênese através de um mecanismo indireto e, em modelos experimentais, o aumento da expressão do HGF está relacionado com a indução do crescimento de vasos linfáticos peritumorais (41). Em carcinoma de células escamosas da cavidade oral há uma significativa correlação entre LVD e a expressão do HGF (51).

Quanto a análise da rede linfática nos diversos tumores, o método mais difundido é o estudo da microdensidade vascular linfática (MDVL), que pode ser verificada no interior e na periferia do tumor (10, 25, 52). Como já comentado anteriormente, trabalhos aplicando esta metodologia encontraram diferenças entre os tumores que, provavelmente, refletem diferenças biológicas da neoplasia e do sítio (tecidos com diferentes densidades linfáticas, por exemplo, orofaringe e prega vocal) onde elas ocorrem. Nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e nos melanomas cutâneos, os vasos linfáticos, tanto intra quanto peritumorais, são funcionantes e passíveis de invasão, porém, nos carcinomas de mama, de ovário e de pulmão não são detectados linfáticos intratumorais, sendo funcionantes apenas os peritumorais (6, 7, 8, 9,10).

1.3- D2-40 (Podoplanina)

O anti-D2-40 é um anticorpo monoclonal recente, que reconhece, especificamente, a podoplanina humana, originalmente produzido contra um antígeno gonadal fetal M2A (53), que é expresso nas células das neoplasias germinativas testiculares (54). Sua purificação demonstrou que este antígeno é uma sialoglicoproteína de superfície, de 40kd, que possui uma estrutura de carboidrato do tipo mucina simples, com extensa O-glicosilação, semelhante à podoplanina, necessária para a antigenicidade do anticorpo (54). Pelo fato de também corar os vasos linfáticos, levantou-se a hipótese de que o antígeno M2A poderia reconhecer a podoplanina humana, o que foi confirmado por estudos de Western blotting e ELISA (55).

A podoplanina humana, descrita por Wetterwald e colaboradores em 1996 (56), sob a designação de antígeno E11, é uma glicoproteína transmembrana tipo mucina, de 38kd, que apresenta extensa O-glicosilação e alto teor de ácido siálico. Estudos recentes demonstraram que sua regulação é feita pelo gene Prox 1, gene mestre que controla o desenvolvimento dos progenitores linfáticos das veias embrionárias (57). Inicialmente expressa nas células do endotélio linfático (28, 29), do plexo coróide, nas células alveolares tipo I, nos osteoblastos e nas células mesoteliais peritoneais, foi posteriormente identificada na superfície das células epiteliais glomerulares de camundongos (podócitos) e, pelo fato de estar envolvida nos processos podais na nefrose induzida por puromicina, recebeu a denominação de podoplanina (30). Trabalhos mais recentes demonstraram que a podoplanina é surpreendentemente expressa em alguns tipos celulares de tecidos normais que estão expostos ao fluido de interface, entre elas as células mioepiteliais das glândulas salivares e as células epiteliais dos ductos biliares hepáticos que estão expostas à bile alcalina (55, 58).

Numerosos homólogos desta proteína foram identificados, tais como o T1 alpha, expresso na superfície apical das células alveolares tipo 1 dos pulmões de rato (59), o OTS-8 (60), o RTI40 (61), o gp38 (62), o gp40 canino (63),

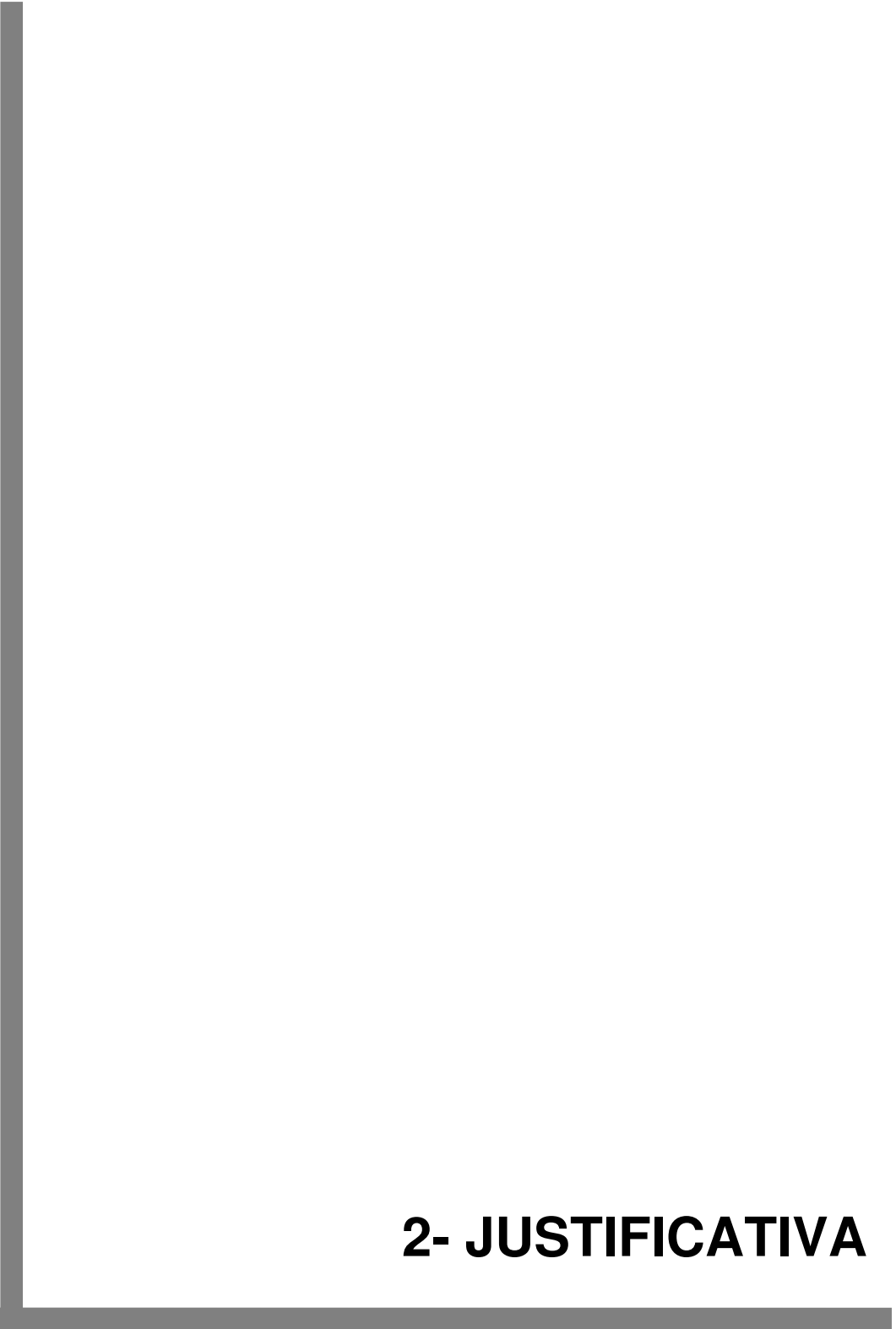
o gp36 humano (64) e o PA2.26 murino (65). A expressão da podoplanina/T1alfa nas células alveolares tipo I (55, 66) e nos podócitos glomerulares do rim, indicam que a extensa porção O-glicosilada da podoplanina com seu alto conteúdo de ácido siálico e sua estrutura negativa alterada podem ter função protetora nos compartimentos fluidos internos e externos.

Schacht e colaboradores (67), evidenciaram que a super-expressão da podoplanina nas células endoteliais vasculares cultivadas promoveu a formação de extensões celulares alongadas, aumento da adesão das células endoteliais, migração e formação de túbulos. Estes achados sugerem que a podoplanina pode ter importante papel na reorganização citoesquelética. Esta potencial função da podoplanina apóia-se nos resultados destes mesmos autores que observaram forte expressão nos miofibroblastos da próstata, nas células mioepiteliais da mama e das glândulas salivares, nos fibromiócitos dos testículos e nas células do peri-neuro, todas as células contráteis que apresentam freqüentes alterações na sua forma, mediada por miofilamentos (68). Portanto, a podoplanina pode ter importante papel, também, na mediação das propriedades contráteis celulares.

Ainda segundo estes autores, nos seus estudos em pele de ratos, a expressão da podoplanina foi fraca e focal nos queratinócitos basais da pele humana normal e negativa na maioria dos queratinócitos. No entanto, a maioria dos carcinomas escamosos da pele humana expressaram fortemente a podoplanina, particularmente os recorrentes e os pouco diferenciados, sendo esta ausente nos carcinomas escamosos bem diferenciados. A observação da super-regulação do homólogo da podoplanina PA2.26 durante a carcinogênese epidérmica nos murinos e os achados prévios de que a super-expressão da podoplanina promoveu a motilidade e a migração celular, indicam que esta proteína desempenhe significativo papel na progressão dos tumores epiteliais, possivelmente pelo aumento da disseminação das células tumorais via vasos linfáticos.

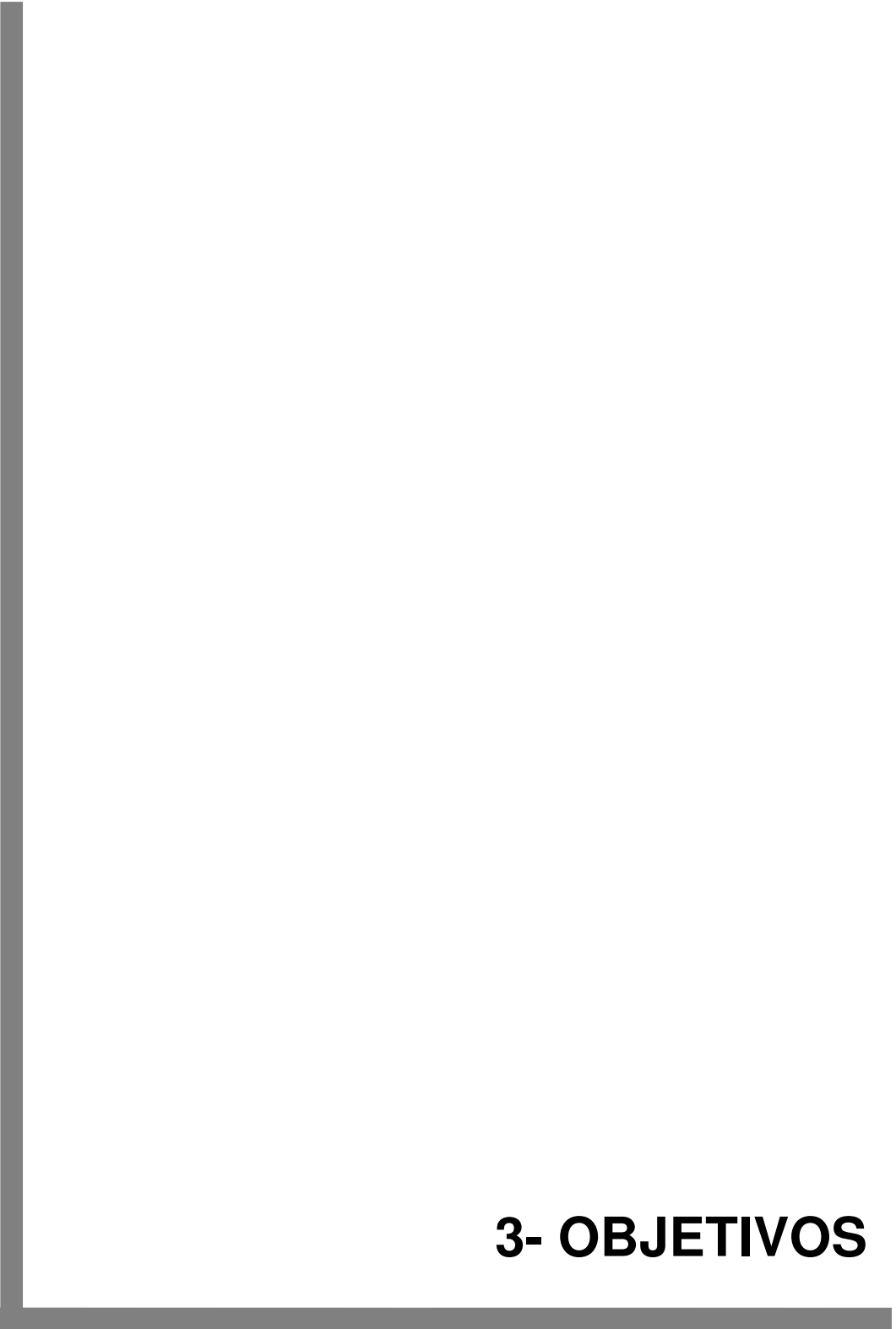
Estudo recente sobre o imuno-perfil das células mioepiteliais nas áreas intra-ductais do carcinoma ex-adenoma pleomórfico, demonstrou que a expressão do D2-40 foi mais forte nas células mioepiteliais benignas que circundam as células epiteliais malignas, do que nas células mioepiteliais benignas em áreas “ducto-like” do adenoma pleomórfico. Estes achados sugerem que no processo malignização, as células mioepiteliais benignas diferenciam-se e poderiam, possivelmente, produzir importantes proteínas relacionadas à supressão tumoral (69,70).

Ao contrário da maioria dos marcadores endoteliais utilizados na rotina da Patologia Cirúrgica, que são expressos em vasos linfáticos e sanguíneos, a podoplanina é uma proteína seletivamente expressa no endotélio linfático, sendo um marcador útil para determinar invasão linfática tumoral (29, 71, 72) e para demonstrar a diferenciação linfática de tumores vasculares benignos e malignos (29, 73, 74, 75). A podoplanina também tem se mostrado útil no diagnóstico diferencial de várias neoplasias não-vasculares como os mesoteliomas epitelíóides (74), os tumores de células germinativas gonadais e extra-gonadais (53, 54, 76, 77, 78), os hemangioblastomas (58) e os sarcomas sinoviais (30).



2- JUSTIFICATIVA

Em carcinomas de glândulas salivares há raros estudos sobre a vascularização linfática e sua correlação com a expressão dos fatores de crescimento linfangiogênicos nas células tumorais. O presente estudo corrobora com o entendimento da linfangiogênese induzida pelo tumor, a qual tem se revelado como um novo alvo para o controle do câncer metastático.



3- OBJETIVOS

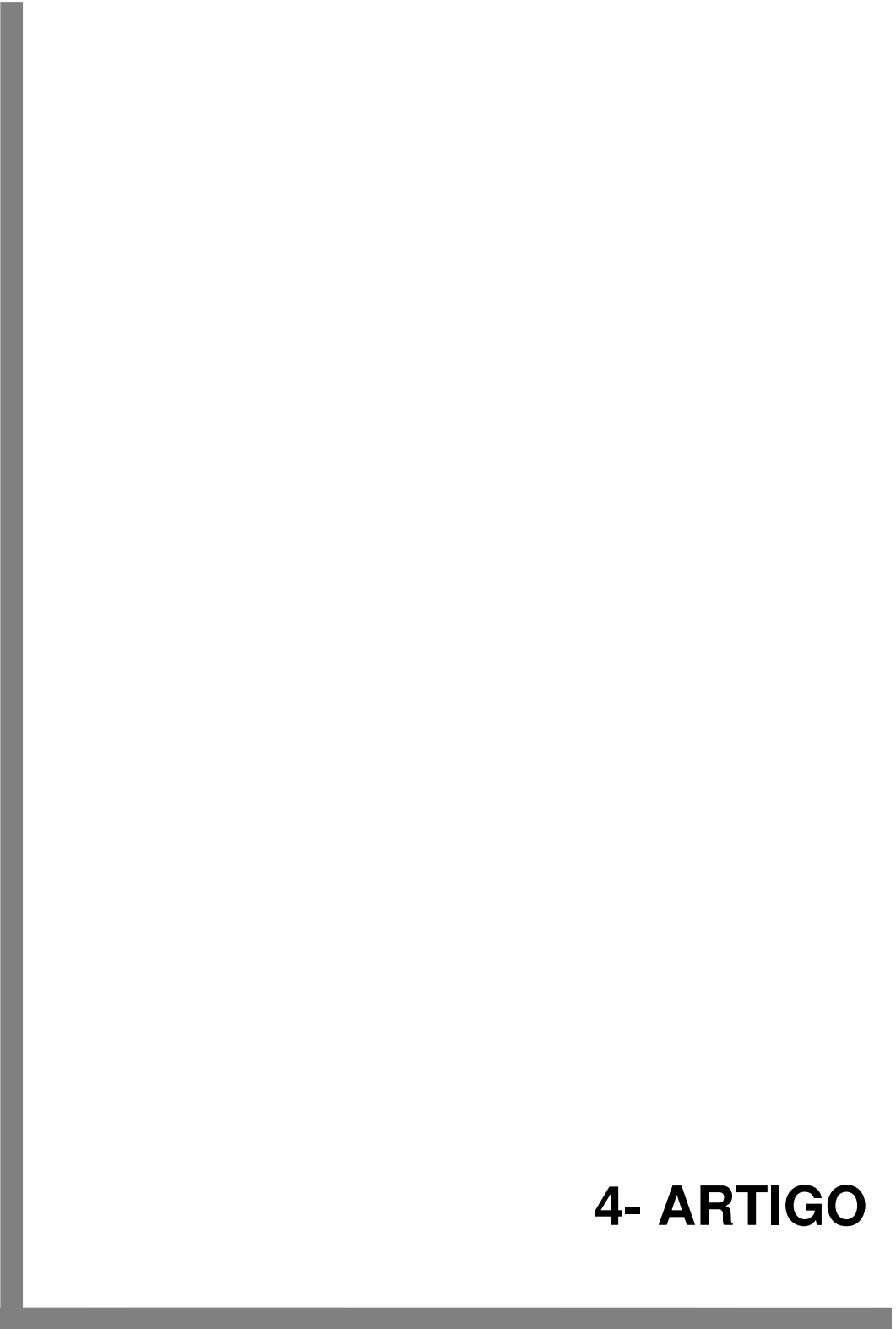
3.1- Objetivo geral

Comparar a densidade microvascular linfática e a expressão dos fatores linfangiogênicos entre carcinomas salivares agrupados em duas categorias, conforme a probabilidade de dar metástases cervicais (risco baixo/moderado e alto).

3.2- Objetivos específicos

Em carcinomas salivares, subdivididos quanto à probabilidade de dar metástases cervicais (riscos baixo/moderado e alto) iremos:

- Avaliar a microdensidade vascular linfática intratumoral e peritumoral;
- Analisar a frequência de êmbolos neoplásicos em linfáticos intra e peritumorais;
- Analisar a porcentagem de células carcinomatosas que expressam VEGF-C e HGF (fatores linfangiogênicos);
- Comparar as microdensidades vasculares linfáticas intra e peritumorais e a porcentagem de células tumorais que expressam fatores de crescimento associados à linfangiogênese (VEGF-C, HGF) entre os dois grupos de carcinomas.



4- ARTIGO

Lymphatic vessel density and expressions of lymphangiogenic growth factors in salivary carcinomas

MF Mello¹, AF Costa¹, LL Freitas¹, AB Soares², VC Araújo², AJTincani³, AS Martins³, A Altemani¹.

¹Department of Pathology, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

²Department of Oral Pathology, São Leopoldo Mandic Institute and Research Center, Campinas, São Paulo, Brazil.

³Head and Neck Service, Department of Surgery, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Albina Altemani,

Departamento de Anatomia Patológica

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Rua Tessália Vieira de Camargo 126,

Campinas, São Paulo 13084-971, Brazil;

E-mail: aaltemani@uol.com.br

Running title: Lymph vessels in salivary carcinomas

Abstract

Nodal metastasis is an important prognostic indicator in head and neck cancers, including salivary carcinomas. In these, the risk for lymph node metastasis is variable and strongly associated with the tumor histologic type. The aim of the current study was to evaluate the lymphatic vessel density (LVD) and expressions of lymphangiogenic growth factors by tumor cells in different histologic types of salivary carcinomas subdivided according to the risk for nodal metastasis. In 15 high-risk (undifferentiated, high-grade mucoepidermoid and salivary duct carcinomas) and 60 low/moderate-risk tumors (adenoid cystic, low/intermediate-grade mucoepidermoid, acinic cell, myoepithelial, epithelial-myoepithelial and polymorphic low-grade carcinomas) the expressions of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), hepatocyte growth factor (HGF) and D2-40 (for assessing LVD) were examined. No significant differences were encountered between high- and low/moderate/-risk carcinomas regarding LVD and VEGF-C or HGF expressions. Furthermore, the expression of these proteins did not correlate with LVD. Lymphatic vascular invasion was mainly found in high-risk carcinomas. Intratumoral LVD was significantly lower than peritumoral, regardless of the risk for metastasis and primary site of the lesion. The histologic types of salivary carcinomas which are associated with high-risk for nodal metastasis do not present increased LVD or VEGF-C and HGF expressions. The greater tendency for metastasis in these carcinomas seems to be related to their capacity to invade lymph vessels. Further studies on tumor cell interactions with lymphatic endothelial cells are needed to improve our understanding of the metastatic potential of salivary carcinomas.

Keywords: lymph vessels, salivary carcinoma, VEGF-C, HGF.

Introduction

Nodal metastasis is an important prognostic predictor in head and neck cancers, including salivary carcinomas. The risk for lymph node metastasis in these carcinomas is highly variable (9% - 85%) [1] and strongly associated with the tumor histologic type [1-5]. It is a general consensus that high-grade mucoepidermoid carcinomas, salivary duct carcinomas, undifferentiated carcinomas and squamous cell carcinomas are high-risk tumors for nodal metastasis [1, 3-5]. In these the risk for neck metastasis has been described to be >50% [1] and, thus, elective neck dissection is considered in their management [1-3].

Lymph vessels provide the main avenue for nodal metastasis and in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) it has been shown that tumors of different anatomic regions do not vary significantly in their lymphangiogenic properties [6, 7]. However, a high lymph vessel density (LVD) seems to be an indicator of the risk of lymph node metastasis in HNSCC [6-9]. Regarding salivary gland tumors, the lymphatic vessels have rarely been studied [10-12] and in a particular type of salivary carcinoma, i.e. in those arising in pleomorphic adenomas (CXPA) the lymphatic network was found to be mainly composed of pre-existing vessels [10].

The aim of the current study was to evaluate LVD in different histologic types of salivary carcinomas subdivided according to the risk for nodal metastasis. Furthermore we looked at the clinical follow up of the patients and analyzed expressions of lymphangiogenic growth factors by tumor cells. Lymphangiogenesis is regulated by multiple growth factors [13] in which vascular endothelial growth factor (VEGF)-C plays a key role as an essential and selective lymphangiogenic factor whereas hepatocyte growth factor (HGF) is a novel lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action [14]. The contribution of these proteins to tumor LVD and nodal metastasis in salivary carcinomas has yet to be investigated.

Materials and Methods

The present study was approved by the Committee of Ethics of the University of Campinas, Brazil and was performed in 75 cases of salivary carcinomas which were retrieved from the files of the Department of Pathology of the University of Campinas. The study population consisted of 30 men (40%) and 45 women (60%), the average age at the time of diagnosis was 52.71 years (ranged from 7 to 72 years). The tumors were classified according to Regis de Brito Santos et al (2001) in low/moderate-risk for nodal metastasis [1] - 60 cases (adenoid cystic carcinomas - 15 cases, low/intermediate-grade mucoepidermoid carcinomas - 8, acinic cell carcinomas - 13, myoepithelial carcinomas- 6, epithelial-myoepithelial carcinomas- 12 and polymorphic low-grade adenocarcinomas- 6 and high-risk - 15 cases (undifferentiated carcinomas - 3 cases, high-grade mucoepidermoid carcinomas - 5 and salivary duct carcinomas 7). Regarding tumor location 64.71% were in the major salivary glands and 35.29% in the minor ones. Demographic and clinical information was obtained from the patients' medical records. None of them had received preoperational chemotherapy or radiotherapy.

Tissue microarrays

Salivary carcinoma samples were selected for tissue microarray (TMA) studies to evaluate the expressions of VEGF-C and HGF in tumor cells by immunohistochemical method. Three tissue cores of 1mm diameter were punched (Tissue-Tek Quick-Ray™ Tissue Microarray System; Sakura; USA) as representative of the whole tumor in each case. Necrotic or hemorrhagic areas were avoided. The selected cores were placed into receptor blocks of TMA. Sections with 5µm thickness were obtained for the immunohistochemical studies.

Immunohistochemistry

The antibodies used in this study were D2-40 (for detection of lymph vessels), VEGF-C and HGF (Table 1). For immunohistochemical staining, 5µm sections from each paraffin block were deparaffinized, hydrated and endogenous peroxidase activity was quenched by immersion of the slides in

3% hydrogen peroxide. The antigen retrieval (AR) was achieved by boiling them in a steamer immersed in citrate buffer (pH 6.0), except for D240. For D240 AR was performed using TrisEDTA (pH 9.0). After washing, the sections were incubated at 4°C, with the primary antibody, overnight. Signal detection was performed using EnVision peroxidase system (DAKO, Carpinteria, CA, USA) for 1h at 37°C. Subsequently, sections were stained for 5 min at 37°C with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and counter-stained with Mayer's hematoxylin. The isotype-matched negative controls did not show colored-precipitate on the tissue, which indicates that artifactual staining was minimized.

Evaluation of staining

Assessment of LVD: Intratumoral LVD (3 hotspots were located within tumor mass) and peritumoral LVD (3 hotspots were located within an area 500µm from the tumor border) were assessed separately. In each tumor section stained for D2-40 the lymphatic vessels were manually counted at 200X (0.7386 mm² field) by two authors (MFM and LF) using a double-headed microscope. The mean number of lymphatics assessed was determined as LVD and the mean peritumoral LVD and intratumoral LVD were calculated for each case. Invasion of the D2-40 intratumoral or peritumoral lymphatic vessels by carcinoma cells (tumor emboli) was also evaluated.

Assessment of VEGF-C and HGF expressions: Brown staining of the cell cytoplasm was regarded as positive. The relative numbers of neoplastic VEGF-C + and HGF + cells were considered in relation to all neoplastic cells observed in each stained section. When the number of positive cells was more than 10%, the case was judged positive. The positive neoplastic cells were assessed regarding quantity using a three-tiered scale: >10% - 25%, >25% - 50% and >50% of positive cells.

Statistical analysis

A chi-square test or a Fisher exact test was used to assess the associations among categorical data. Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test were used for comparison of the numeric variables between the different groups as appropriate. Data were presented as mean + SD, and the results with $p < 0.05$ were considered significant. All the statistical procedures were performed using SPSS software for Windows, version 12.0 (SPSS® Inc. Illinois, USA).

Results

LVD

Peritumoral LVD was significantly higher than intratumoral LVD (Figure 1) in carcinomas with high-risk for nodal metastasis as well as in low/moderate-risk tumors. In the latter, peritumoral LVD means ranged from 15.83 to 71.83 and intratumoral from 0.50 to 12.40. No significant difference was found among the carcinomas of this group ($p = 0.130$ for peritumoral LVD and $p = 0.209$ for intratumoral). In high-risk tumors peritumoral LVD means ranged from 13.33 to 39.71 and intratumoral from 0.00 to 8.40 and no significant difference was found among these carcinomas either ($p = 0.311$ for peritumoral LVD and $p = 0.233$ for intratumoral). Furthermore, no correlation was detected between intratumoral and peritumoral LVD and risk for nodal metastasis or tumor site (Table 2).

Tumor emboli within lymph vessels were observed in 1 out of 60 cases (1.6%) in low/moderate-risk carcinomas and in 3 out of 15 (20%) in high-risk tumors. These emboli (Figure 1F) were found in intratumoral (4 cases) and peritumoral (1 case) lymphatics (one high-grade mucoepidermoid carcinoma presented intra and peritumoral emboli). Nodal metastasis at time of primary surgery was detected in 5 patients and their tumors did not show significant differences in terms of LVD when compared with those of patients without metastasis (Table 2).

VEGF-C and HGF expressions

No correlation was found between the amount of positive cells for VEGF-C and HGF (Figure 2) and intratumoral or peritumoral LVD (Table 2). The expression of these proteins did not correlate with the risk for nodal metastasis either (Table 3).

Discussion

To our knowledge, this is the first study in which LVD was assessed in a series of different histologic types of salivary carcinomas from diverse primary locations (major and minor salivary glands). We showed that high-risk tumors for nodal metastasis (high-grade mucoepidermoid carcinomas, salivary duct carcinomas, undifferentiated carcinomas) presented no significant difference in LVD when compared with low/moderate-risk carcinomas. These findings suggest that high- and low-risk salivary carcinomas are equally lymphangiogenic. Furthermore, despite the small number of patients with nodal metastasis, the absence of significant differences of LVD between salivary carcinomas with and without metastasis reinforces this assumption. Therefore, measurements of LVD seem to have no utility for estimation of metastatic risk for salivary carcinomas.

Our findings contrast with the observations for HNSCCs, particularly for SCC affecting the oral cavity, which is also a common site for salivary carcinomas [7, 8, 15]. In HNSCC, LVD measurements have been suggested as potential indicators of the risk of lymph node metastasis [6-9]. We believe that these discrepancies between SCC and salivary carcinomas regarding LVD and risk for nodal metastasis may reflect genuine differences between the malignant behaviors of these two types of carcinomas of the head and neck region. The mechanisms by which tumor cells leave the primary site, invade lymphatics and metastasize are complex. We speculate that in salivary carcinomas the main difference between

high- and low-risk tumors for nodal metastasis could be their capacity to invade lymph vessels in addition to the mere presence of these channels. In this sense, in the current series, the finding of tumor emboli mainly in high-risk carcinomas lends support to this hypothesis. The mechanisms that control tumor cell interactions with lymphatic endothelium are still poorly understood and further studies are needed to explore the genetic and biochemical determinants involved in tumor cell entry into lymphatics in salivary carcinomas.

In human cancers, LVD has been analyzed within the main neoplastic mass (intratumoral lymphatics) as well as at the tumor margin (peritumoral lymphatics). In certain types of neoplasms, such as breast, ovarian, endometrial and lung cancers [16-19], no intratumoral lymphatic network has been found. In contrast, in others such as cutaneous melanoma, HNSCC and SCC of uterine cervix [8, 20, 21] intratumoral lymphatics do exist and have been associated with nodal metastasis and adverse clinical outcome. In salivary carcinomas we detected lymph vessels in both intra- and peritumoral regions, although the latter was significantly higher regardless of the tumor site and metastatic risk. These findings suggest that the density of lymph vessels is governed by factors unrelated to histologic differentiation or primary tumor location. It has been postulated that growing tumor cells mechanically collapse or destroy the lymphatic network [22] and this could explain the significantly lower intratumoral LVD in salivary carcinomas. Low intratumoral LVD has also been found in HNSCC [7, 23]. It is of interest is that in our cases tumor emboli were detected mainly in intratumoral lymphatics, strengthening our previous suggestion that these can act as conduits for tumor cells in salivary carcinomas [10].

VEGF-C and VEGF-D are ligands for the receptor tyrosine kinase VEGFR-3 that is expressed on lymphatic endothelium. In experimental models, it has been shown that overexpression of VEGF-C or -D induces lymph vessel growth and lymph node metastases [24-27]. However, in human tumors this correlation has not always been found. There are contradictory results in different cancers or even in the same type of tumor with regard to VEGF-C expression and

lymphangiogenesis or nodal metastasis [6, 20, 28]. In the current series, carcinomas with high- and low/moderate-risk for nodal metastasis presented similar expressions of VEGF-C. Furthermore, no correlation between VEGF-C expression by carcinoma cells and number of intra/ peritumoral lymphatics was encountered. These findings suggest that in salivary carcinomas tumor-produced VEGF-C may not be functional or alternatively this protein is not the only vascular stimulator involved in tumor lymphangiogenesis. This process is regulated by multiple factors that are produced by various cell types, including tumor-associated macrophages and fibroblasts [20, 29, 30]. Moreover, in addition to VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 axis (the main signal transduction system in lymphatics), other lymphangiogenic factors (such as HGF and angiopoietin) have recently been described to influence this system (reviewed in Van der Auwera et al 2006).

HGF is a growth factor that belongs to the plasminogen-prothrombin gene superfamily that has a direct role in promoting tumor cell growth and invasion and stimulates lymphangiogenesis through an indirect mechanism [14]. In tumor model overexpression of HGF was found to induce lymphatic vessel growth in the peritumoral region [14] and in human oral SCC a significant correlation was detected between LVD and HGF expression [31]. In contrast, in high grade salivary carcinomas absence of correlation between HGF expression in tumor cells and regional lymph node and distant metastasis has been reported [32]. Our findings are in agreement with these data as we did not observe any significant relationship between HGF tumor expression and LVD. However, stromal expression of HGF, which was not studied in this work, has been described to be related to metastasis in salivary carcinomas [32]. Therefore, the role of HGF in metastasis of salivary carcinomas may involve mechanisms other than lymphangiogenesis that need to be better explored.

In conclusion, the histologic types of salivary carcinomas which are associated with high-risk for nodal metastasis do not present increased LVD or VEGF-C and HGF expressions. It is likely that the greater tendency for metastasis in these carcinomas depends on their capacity to invade lymph vessels.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brazil (grant number 473641/2008-2009) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - Brazil (Grant number 2007/55336-2).

Conflict of Interest Statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

- [1] Régis de Brito Santos I, Kowalski LP, Araujo VC, Logullo AF, Magrin J. Multivariate analysis of risk factors for neck metastases in surgically treated parotid carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 56-60.
- [2] Kelley DJ, Spiro RH. Management of the neck in parotid carcinoma. *Am J Surg* 1996; 172: 695-7.
- [3] Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A, Mondin V. Management of clinically negative cervical lymph nodes in patients with malignant neoplasms of the parotid gland. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001; 63: 123-6.
- [4] Stennert E, Kisner D, Jungehuelsing M, Guntinas-Lichius O, Schröder U, et al. High incidence of lymph node metastasis in major salivary gland cancer *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 720-3.
- [5] Lloyd S, Yu JB, Wilson LD, Decker RH. A prognostic index for predicting lymph node metastasis in minor salivary gland cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 169-75.
- [6] BEasley NJ, Prevo R, Baner JIS, Leek RD. Moore J, et al .Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1315-20.
- [7] FRanchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. A morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101: 973-8.
- [8] Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005; 206: 170-7.
- [9] Audet N, Beasley NJ, MacMillan C, Jackson DG, Gullane PJ, Kamel-Reid S. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131: 1065-70.

- [10] Soares AB, Ponchio L, Juliano PB, Araújo VC, Altemani A. Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumour progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Clin Pathol* 2007; 60: 995-00.
- [11] Soares AB, Araújo VC, Juliano PB, Altemani A. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38: 623-9.
- [12] Teymoortash A, Schrader C, Shimoda H, Kato S, Werner JA. Evidence of lymphangiogenesis in Warthin's tumor of the parotid gland. *Oral Oncol.* 2007; 43: 614-8.
- [13] Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 735-43.
- [14] Cao R, Björndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, et al. Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood* 2006; 107: 3531-6.
- [15] Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 1287-94.
- [16] Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer *J Pathol* 2003; 200: 195-06.
- [17] Schoppmann SF, Horvat R, Birner P. Lymphatic vessels and lymphangiogenesis in female cancer: mechanisms, clinical impact and possible implications for anti-lymphangiogenic therapies (Review). *Oncol Rep* 2002; 9: 455-60.
- [18] Schmid K, Birner P, Gravenhorst V, End A, Geleff S. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 324-8

- [19] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivrides E, Simopoulos C, Gatter KC, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 202-6.
- [20] Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162: 1951-60.
- [21] Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, ACS G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8364-71.
- [22] Padera TP, Kadambi A, Di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumoral lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-6.
- [23] Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 334-9.

Kubo H, Ylä-Herttuala S

- [24] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61:1786-90.
- [25] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-82.
- [26] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-8.

Thornton GE, Williams RA

- [27] Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-91.
- [28] Ohno F, Nakanishi H, Abe A, Kinoshita A, Hasegawa Y, et al. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 281-9.
- [29] Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161: 947-56.
- [30] Van Der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006; 95: 1611-25.
- [31] Ali MA. Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract* 2008; 17: 486-92.
- [32] Tsukinoki K, Yasuda M, Mori Y, Asano S, Naito H, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met immunoreactivity are associated with metastasis in high grade salivary gland carcinoma. *Oncol Rep* 2004; 12: 1017-21.

Table 1- Details of the antibodies used for immunohistochemistry

Antibody	Clone	Dilution	Source	Buffer (antigen retrieval)
D240	D240	1:200	*DAKO	Tris-EDTA
VEGF-C	H-190	1:100	# Santa Cruz	Citrate
HGF	N-19	1:500	# Santa Cruz	Citrate

*Dako Corporation Glostrup, Denmark; # Santa Cruz Biotechnology, USA

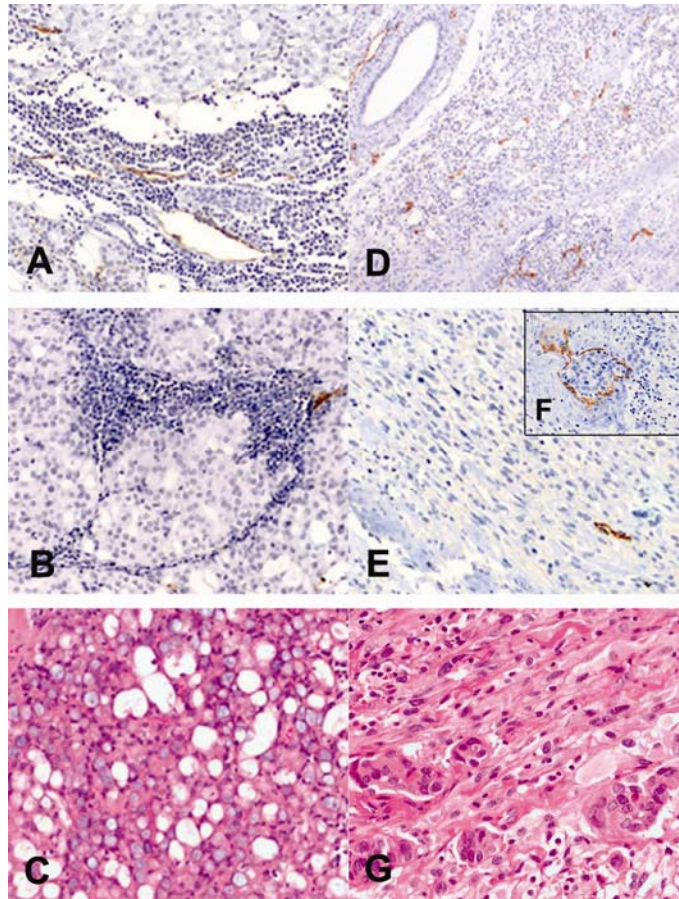
Table 2- Correlations of LVD with clinicopathological parameters and VEGF-C and HGF expressions

Factors	N	ILVD (mean±SD)	p	PLVD (mean±SD)	p	*p
Risk for metastasis			0.953		0.518	
Low/moderate	60	7.90±17.43		43.54±45.08		0.000
High	15	5.17±8.03		33.67±29.31		
Tumor location			0.766		0.927	
Major salivary glands	33	9.64±18.92		39.53±32.48		0.000
Minor salivary glands	24	7.38±16.76		49.46±60.14		
Nodal Metastasis			0.608		0.806	
With	5	9.40±18.82		46.00±51.73		0.000
Without	55	6.15±14.51		38.50±43.52		
VEGF-C expression by tumor cells			0.774		0.319	
≤ 25%	29	6.93±16.19		39.34±28.38		0.000
> 25%	16	4.50±10.75		34.75±38.12		
HGF expression by tumor cells			0.275		0.328	
≤ 25%	30	7.43±16.39		38.00±29.08		0.000
> 25%	13	4.00±11.82		34.69±39.82		

*Intratumoral versus peritumoral lymphatic vessel density. ILVD, intratumoral lymphatic vessel density; PLVD, peritumoral lymphatic vessel density.

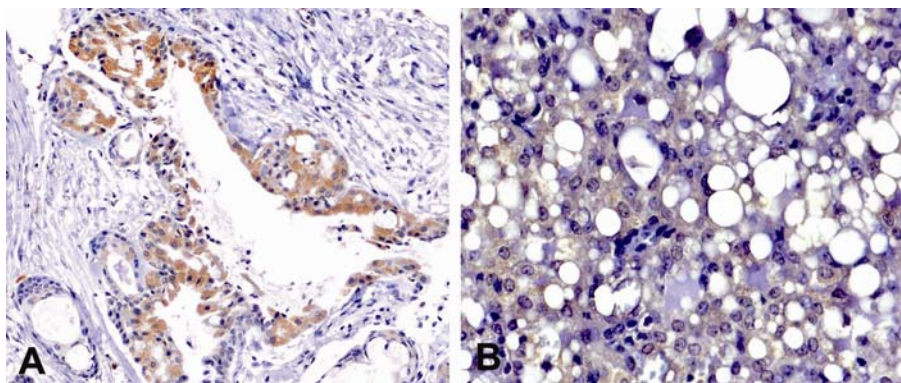
Table 3- Expressions of VEGF-C and HGF in salivary carcinomas subdivided according to the risk for nodal metastasis

Growth factor	Total cases	Low/moderate-risk	High-risk	p
VEGF-C expression				
by tumor cells				0.612
≤ 25%	13	20.0%	18.8%	
> 25%	53	80.0%	81.2%	
HGF expression by tumor cells				
≤ 25%	46	62.7%	81.8%	0.191
> 25%	24	37.3%	18.2%	



239x101mm (300 x 300 DPI)

Figure 1- Peritumoral and intratumoral lymphatic vessels stained for D2-40 (brown): A, B and C - acinic cell carcinoma (low/ moderate-risk tumor for nodal metastasis); D, E, F and G - salivary duct carcinoma with sarcomatoid component (high-risk tumor for nodal metastasis). The peritumoral lymphatic vessel density (A, D) is higher than the intratumoral one (B, E) in both types of carcinomas. Note the tumor embolus within an intratumoral lymphatic vessel in the salivary duct carcinoma (inset - F)



159x49mm (300 x 300 DPI)

Figure 2- VEGF-C (A) and HGF (B) expressions by tumor cells in mucoepidermoid and acinic cell carcinomas



5- DISCUSSÃO GERAL

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo no qual a DLV foi avaliada em uma série de diferentes tipos histológicos de carcinomas salivares de localizações primárias diversas (glândulas salivares maiores e menores). Nós demonstramos que tumores com alto risco para metástases em linfonodos (CME 3 de alto grau, carcinomas indiferenciados - CAI e carcinomas de ducto salivar - CDS) não apresentam diferença significativa em relação à densidade vascular linfática quando comparados com carcinomas de baixo risco. Estes achados sugerem que os carcinomas de baixo e alto risco são equivalentes quando à linfangiogênese. Além disso, apesar do pequeno número de casos com metástases em linfonodos, a ausência de uma diferença significativa da DLV entre os carcinomas salivares com e sem metástases reforça a consideração de que a DLV não tem implicações no risco para metástases. Portanto, a avaliação da DLV parece não ter nenhuma utilidade para a estimativa do risco de metástase nos carcinomas salivares.

Nossos achados contrastam com as observações dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, particularmente em relação aos carcinomas de células escamosas que afectam a cavidade oral, que também é um local comum para os carcinomas salivares (4, 79). Em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, a avaliação da DLV tem sido sugerida como um potencial indicador do risco de metástases linfonodais (3). Acreditamos que as discrepâncias entre os carcinomas de células escamosas e os carcinomas salivares quanto à DLV e ao risco para metástase em linfonodos possam refletir diferenças genuínas entre os comportamentos malignos destes dois tipos de carcinomas da região da cabeça e pescoço. Os mecanismos pelos quais as células tumorais deixam o sítio primário, para invadir os vasos linfáticos e dar metástase são complexas. Nós consideramos a possibilidade de que a principal diferença entre os carcinomas de baixo e alto risco para metástases em linfonodos seja a sua capacidade de invadir os vasos linfáticos, além da mera presença dos próprios vasos. Nesse sentido, o encontro de êmbolo tumoral principalmente em carcinomas de alto risco reforça essa hipótese. Os mecanismos que controlam as interações entre as células tumorais e o endotélio linfático ainda são pouco

compreendidos e estudos adicionais são necessários para investigar os determinantes genéticos e bioquímicos envolvidos na entrada das células tumorais em vasos linfáticos nos carcinomas salivares. Em cânceres humanos, a DLV tem sido analisada dentro da massa tumoral principal (linfáticos intratumorais), assim como na margem do tumor (linfáticos peritumorais). Em certos tipos de neoplasia, como carcinomas de mama, ovário, endométrio e pulmão, nenhuma rede linfática intramural foi encontrada. Em contraste, em outros tipos de tumores, como o melanoma cutâneo, carcinoma epidermóide e carcinoma epidermóide de colo uterino

(4, 71, 80) linfáticos intratumorais são observados e têm sido associados com metástases em linfonodos e evolução clínica adversa. Em carcinomas salivares, nós detectamos a presença de vasos linfáticos tanto na região intra como peritumoral, embora na região peritumoral a quantidade de linfáticos tenha sido significativamente mais alta, independentemente do sítio do tumor e do risco de dar metástases. Esses achados sugerem que a densidade vascular linfática é regida por outros fatores sem relação com o tipo histológico e o sítio tumoral. Tem sido postulado que o crescimento das células tumorais colapsa por pressão mecânica ou destrói a rede linfática (8) e isso poderia explicar a DLV intratumoral significativamente menor em carcinomas salivares. Baixa DLV intratumoral também foi encontrada nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (1, 79). É interessante destacar que nos nossos casos, os êmbolos carcinomatosos foram detectados principalmente em vasos linfáticos intratumorais, fortalecendo nossa sugestão anterior de que estes vasos possam atuar como vias de disseminação para as células tumorais em carcinomas salivares (11).

Os fatores VEGF-C e VEGF-D se ligam no receptor tirosina quinase VEGFR-3, que é expresso no endotélio linfático. Em modelos experimentais, foi demonstrado que a superexpressão de VEGF-C ou D induz o crescimento de vasos linfáticos e de metástases linfonodais (81-82). Todavia, em tumores humanos essa correlação nem sempre foi encontrada. Há resultados contraditórios em diferentes tipos de cânceres ou até no mesmo tipo de tumor no

que diz respeito à expressão do VEGF-C e à linfangiogênese ou metástase em linfonodo (3, 71, 83). Este processo é regulado por múltiplos fatores que são produzidos por vários tipos celulares, incluindo macrófagos associados ao tumor e fibroblastos (2, 71, 84). Além disso, paralelamente ao eixo VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 (o principal sistema de transdução de sinal nos vasos linfáticos), recentemente outros fatores linfangiogênicos (como o HGF e angiopoietina) têm sido descritos a influenciar este sistema (84).

O HGF é um factor de crescimento que pertence à superfamília do gen protrombina-plasminogênio, que tem um papel direto na promoção do crescimento da célula tumoral e invasão, além de estimular a linfangiogênese através de um mecanismo indireto (41, 85). Em modelos experimentais, o aumento da expressão do HGF está relacionado com a indução do crescimento de vasos linfáticos peritumorais (41), e em carcinomas de células escamosas da cavidade oral há uma significativa correlação entre DLV e a expressão do HGF (86).

Entretanto, alguns trabalhos não encontraram correlação entre carcinomas salivares de alto grau e a expressão de HGF em relação a metástases em linfonodos e em sítios distantes do tumor. Nossos achados estão de acordo com esses dados, uma vez que também não encontramos relação significativa entre a expressão tumoral do HGF e DLV. Entretanto, a expressão estromal do HGF, que não foi estudada neste trabalho, tem sido relacionada com metástases em carcinomas salivares (23). Portanto, o papel do HGF nas metástases dos carcinomas salivares pode envolver outros mecanismos que não a linfangiogênese e precisam ser melhor explorados.



6- CONCLUSÃO GERAL

- 1-** Carcinomas de glândulas salivares com alto risco para metástases em linfonodos não apresentam diferença significativa em relação à densidade vascular linfática quando comparados com carcinomas de baixo/moderado risco.
- 2-** Êmbolos carcinomatosos estão presentes principalmente em vasos linfáticos intratumorais, indicando esta localização como possível via de disseminação para as células neoplásicas.
- 3-** A expressão dos fatores linfangiogênicos VEGF-C e HGF não têm correlação com o risco para metástases em linfonodos, não havendo correlação entre a quantidade de células positivas para VEGF-C e HGF e a densidade vascular linfática intratumoral e peritumoral.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical colocalization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34:334-339.
- 2- Schoppman SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor - associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161:947-956.
- 3- Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1315-1320.
- 4- Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, et al. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005; 206:170-177.
- 5- Straume O, Jackson DG, Asklen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:250-256.
- 6- Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, et al. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1449-1455.
- 7- Clarijs R, Ruiter DJ, de Wall RMW. Lymphangiogenesis in malignant tumours: Does it occur? *J Pathol* 2001; 193:143-146.
- 8- Padera TP, Kandambi A, di Tomaso E, et al, Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296:1883-1886.
- 9- Schoppman SF, Bayer G, Aumayr K, et al. Austrian breast and colorectal cancer study group. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 2004; 240:306-312.
- 10- Williams CS, Leek RD, Robson AM, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol.* 2003; 200:195-206.

- 11- Soares AB, Ponchio L, Juliano PB, de Araujo VC, Altemani A. Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. J Clin Pathol 2007. 60(9):995-1000.
- 12- Seifert G, Sobin L. World Health Organization International Histological Classification of Tumours, Histological Typing of Salivary Gland Tumors. Berlin; Springer-Verlag, 1991.
- 13- Santos IRB, Kowalski LP, Araújo VC, et al. Multivariate Analysis of risk factors for neck metastases in surgically treated parotid carcinomas. Arch Otolaryngol Head Neck Surgical 2001; 127:56-60.
- 14- Jackson DG, Prevo R, Clasper S, et al. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. Trends Immunol. 2001; 22:317-321.
- 15- Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. Proc Natl Acad Sci USA. 2001b; 98:12677-12682.
- 16- Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. Semin. Cell Dev. Biol. 2002; 13:9-18.
- 17- Leak LV. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. Fed Proc 1976; 35:1863-1871.
- 18- Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? Clin Cancer Res. 2001; 7:462-468.
- 19- Auckland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. Physiol Rev. 1993; 73:1-78.
- 20- Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. Physiol Rev 1990; 70:987-1028.
- 21- Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? Microsc Res Tech. 2001; 55:61-69.

- 22- Pepper MS, Tille JC, Nisato R and Skobe M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 2003; 134:167-177.
- 23- Swartz MA .The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50:3-20.
- 24- Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech* 2001; 55:92-99.
- 25- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407:249-257.
- 26- Jain RK, Padera TP. Prevention and treatment of lymphatic metastasis by antilymphangiogenic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94:785-787.
- 27- Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, et al. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 2000; 60:4324-4327.
- 28- Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18:143-152.
- 29- Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82:1255-1257.
- 30- Ordonéz NG. Podoplanin: A Novel Diagnostic Immunohistochemical Marker; *Adv Anat Pathol.* 2006; 13:83-88.
- 31- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer.*2001; 92:556-568.

- 32- Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, et al. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology*. 2003; 64:61-73.
- 33- Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 2002; 98:335-343.
- 34- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Onco*. 2003; 33:21-27.
- 35- George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3:420-427.
- 36- Galé N, Thurston G, Hackett S, Renard R, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell*. 2002; 3:411-423.
- 37- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 2002; 129:4797-4806.
- 38- Wigle JT, Oliver G. Prox 1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. 1999; 98:769-778.
- 39- Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5:735-743.
- 40- Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8868-73.

- 41- Cao R, Bjorndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, et al. Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood* 2006; 107:3531-6.
- 42- Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Sem Cancer Biol* 2004; 14:139-45.
- 43- Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Res.* 1995;15;55(12):2703-8.
- 44- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001b; 7:192-198.
- 45- Narko K, Enholm B, Makinen T, et al. Effect of inflammatory cytokines on the expression of the vascular endothelial growth factor-C. *Int J Exp Pathol* 1999; 80:109-112.
- 46- Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn Cancer Res* 1999; 90:977-981.
- 47- Nakamura T, Nawa K, Ichiara A. Partial purification and characterization of 'injurin-like' factor which stimulates production of hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 16: 1450-1459.
- 48- Donnate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell LT. Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGFVMSP). *Protein Science* 1994; 3:2378-2394.
- 49- Haddad R, Lipson KE, Webb CP. Hepatocyte growth factor expression in human cancer and therapy with specific inhibitors. *Anticancer Res.* 200; 21:4243-52.

- 50- Zang YW, Vande WGF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003; 88:408-17.
- 51- Tsukinoki K, Yasuda M, Mori Y, Asanos S, Naito H, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met immunoreactivity are associated with metastasis in high grade salivary gland carcinoma. *Oncol Rep* 2004; 12:1017-21.
- 52- Ji RC. Characteristics of lymphatic endothelial cells in physiological and pathological conditions. *Histol Histopathol* 2005; 20:155-175.
- 53- Bailey D, Bauman R, Law J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for seminomas and dysgerminomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(14):5291-5.
- 54- Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999; 80:569-578.
- 55- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YH, Detmar M. Up-Regulation of the Lymphatic Marker Podoplanin, a Mucin-Type Transmembrane Glicoprotein, in Human Squamous Cell Carcinomas and Germ Cell tumors. *Am J Pathol*. 2005; 166:913-920.
- 56- Wetterwald A, Hfsteller W, Cecchini B, et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 1996; 18:125-132.
- 57- Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, et al. Prox 1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn*. 2002; 225:351-357.
- 58- Roy S, Chu A, Trojanowski JQ, Zhang P. D2-40, a novel monoclonal antibody against the M2A antigen as a marker to distinguish hemangioblastomas from renal cell carcinomas. *Acta Neuropathol*. 2005; 109:497-502.

- 59- Doobs LG, Williams MC, Gonzalez R. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat lung alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1988, 970:146-156.
- 60- Nose K, Saito H, Kuroki T. Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cell (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1990; 1:511-518.
- 61- Gonzalez RF, Doobs LG. Purification and analysis of RT140, a type I alveolar epithelial cell apical membrane protein. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1429:208-216.
- 62- Farr AG, Berry ML, Kim A, et al. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med* 1992; 176:1477-1482.
- 63- Zimmer G, Lottspeich F, Maisner A, et al. Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cell. *Biochem J* 1997; 326:99-108.
- 64- Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, et al. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J* 1999; 341:277-284.
- 65- Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, et al. Introduction of PA2.26, a cell surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997; 20:10-18.
- 66- Rish AK, Joyce-Brady M, Fisher J, et al. Cloning, characterization and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol* 1995; 167:294-306.

- 67- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1 alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBo J* 2003; 22:3546-3556.
- 68- Ross MH, Romerell LJ: *Histology; A text and Atlas*. Baltimore, Williams & Wilkins ,1989.
- 69- Altemani A, Martins MT, Freitas L, et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology* 2005; 46: 635-641.
- 70- Araújo VC, Altemani A, Furuse C, Matins MT, Araujo NS: Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 1011-1016.
- 71- Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162; 1951-1960.
- 72- Schmid K, Birner P, Gravenhorst V, et al. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29:324-328.
- 73- Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997/ 151:1141-1152.
- 74- Ordonéz NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:1407-1414.
- 75- Sinzelle E, Van Huyen JP, Breiteneder-Geleff S, et al. Intrapericardial lymphangioma with podoplanin immunohistochemical characterization of lymphatic endothelial cells. *Histopathology* 2000; 37:93-94.

- 76- Bailey D, Marks A, Straits M, Bauman R. Immunohistochemical staining of germ cell tumours and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to placental alkaline phosphatase and a monoclonal anti-seminoma antibody. *Mod Pathol* 1991; 4:167-171.
- 77- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol.* 1999; 154:385-394.
- 78- Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminomas from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene* 2004; 23:8552-8556.
- 79- Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. A morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101:973-8.
- 80- Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, ACS G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8364-71.
- 81- Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61:1786-90.
- 82- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7:186-91.
- 83- Ohno F, Nakanishi H, Abe A, Kinoshita A, Hasegawa Y, et al. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:281-9.

- 84- Van Der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. Br J Cancer 2006; 95:1611-25.
- 85- To CT, Tsao MS. The role of hepatocyte growth factor/scatter factor and Met receptor in human cancers. Oncol Rep 1998; 5:1013-24.
- 86- Ali MA. Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. Med Princ Pract 2008; 17:486-92.