

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

CARLOS ALBERTO NASCIMENTO BERNARDES

A EXPRESSÃO DE ANGIOPOETINA 1 E TROMBOSPONDINA 1 EM
DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS E NO CARCINOMA
ESPINOCELULAR

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

CARLOS ALBERTO NASCIMENTO BERNARDES

A EXPRESSÃO DE ANGIOPOETINA 1 E TROMBOSPONDINA 1 EM
DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS E NO CARCINOMA
ESPINOCELULAR

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia de
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Bernardes, Carlos Alberto Nascimento

A expressão de Angiopoetina 1 e Trombospondina 1 em desordens potencialmente malignas bucais e no carcinoma espinocelular / Carlos Alberto Nascimento Bernardes. -- 2015.

45 f.

Orientador: Marcelo Lazzaron Lamers.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Angiopoetinas. 2. Trombospondina. 3. Displasia. 4. Microambiente Tumoral. I. Lamers, Marcelo Lazzaron, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À força do Universo que alguns chamam Deus pelas coisas que não entendemos.

Aos meus pais pela vida.

À minha esposa e filha pela compreensão, apoio e amor.

Aos meus amigos Valério e Anderson pelos momentos de Rock n' Roll

Ao meu orientador prof. Dr. e amigo Marcelo Lamers, pela oportunidade.

À todos da FO/UFRGS (colegas, professores, técnicos e funcionários) que de alguma forma colaboraram com esse trabalho.

Aos meus colegas da turma de mestrado de 2013 pela colaboração em todas as aulas.

À Grasieli Ramos, Alessandro Menna Alves pela imensa ajuda e paciência.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia pelo companheirismo e parceria.

Aos meus alunos pela motivação.

À FAPERGS Pelo projeto PICMEL por oportunizar aos meus alunos uma experiência única.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a CAPES que tornaram possível a realização desse curso de pós-graduação.

“Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles”.

Albert Einstein

RESUMO

BERNARDES, Carlos Alberto. A Expressão Angiopoetina 1 e Trombospondina 1 em desordens potencialmente malignas bucais e no Carcinoma Espinocelular. 2015. 45 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015.

O carcinoma espinocelular é responsável por 90% das lesões malignas na cavidade bucal, sendo o oitavo tipo de câncer em todo o mundo e apresenta uma taxa de sobrevivência de apenas 50% em 5 anos. Os carcinomas podem se desenvolver diretamente de células epiteliais normais ou a partir das desordens potencialmente malignas, as quais envolvem as hiperplasias e as displasias. Para que estas lesões se desenvolvam é necessário que nutrientes e oxigênio sejam disponibilizados, o que ocorre a partir da formação de uma nova vasculatura. Este processo, denominado angiogênese, é complexo e envolve a regulação de diferentes fatores indutores, como as moléculas Angiopoetina 1 (ANG1) e Trombospondina 1 (TSP1), cuja ação pode ser influenciada tanto pelas células de origem epitelial quanto pelos componentes do microambiente da lesão. O objetivo deste projeto foi descrever o perfil de expressão das moléculas angiopoetina 1 e trombospondina 1 em biópsias de desordens potencialmente malignas e em carcinoma espinocelular oral. A amostra foi composta por biópsias de pacientes que apresentaram diagnóstico de hiperplasia (n=6), displasia epitelial leve (n=7), displasia epitelial severa (n=15), carcinoma espinocelular oral grau 1 e 2 (n= 13) e 3 e 4 (n=13). As lâminas histológicas foram submetidas à reação de imunohistoquímica para ANG1 e TSP1, das quais foi realizada uma análise descritiva quanto ao perfil de marcação tanto em epitélio quanto em tecido conjuntivo subjacente à lesão. Angiopoetina apresentou uma marcação concentrada principalmente nas células endoteliais e com leve marcação nas células da camada basal do epitélio, sendo observada uma redução da intensidade de marcação de acordo com o grau de severidade da desordem epitelial, porém com um aumento de marcação em células do microambiente tumoral. Trombospondina apresentou marcação heterogênea tanto em tecido epitelial, endotelial e conjuntivo, com um aumento da marcação em macrófagos e fibroblastos de acordo com a severidade da lesão. Este perfil diferenciado de expressão destes marcadores do processo de angiogênese, tanto por células epiteliais modificadas quanto por células do microambiente celular, evidencia a necessidade de mais estudos que explorem a diversidade celular das lesões neoplásicas, com o objetivo de aprimorar as terapias anti-angiogênicas vigentes para o tratamento de desordens potencialmente malignas.

Palavras-Chave: Angiopoetina, Trombospondina, Displasia, microambiente tumoral.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma is the eight most common cancer and it accounts for 90% of malignant lesions in the oral cavity, presenting a survival rate of only 50% after 5 years. Carcinomas may develop directly from normal epithelial cells or from the potentially malignant disorders, such as hyperplasia and dysplasia. During the carcinogenesis process, it is necessary an increase on nutrients and oxygen supply, which occurs through the formation of new vasculature. This process, known as angiogenesis, is complex and involves the regulation of various inducing factors such as angiopoietin molecules 1 (ANG1) and Thrombospondin 1 (TSP1), whose action can be influenced both by epithelial cells or cells from the lesion microenvironment . The objective of this project was to describe the expression profile of molecules angiopoietin 1 and thrombospondin 1 in biopsies of potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. The sample consisted of biopsies from patients who were diagnosed with hyperplasia (n = 6), mild dysplasia (n=7), severe dysplasia (n=15), squamous cell carcinoma grade 1 and 2 (n=13) and 3 and 4 (n=13). The histological slides were submitted to immunohistochemical reaction to ANG1 and TSP1, which underwent a descriptive analysis of the staining profile in both epithelium and in the underlying connective tissue to injury. Angiopoietin showed staining mainly in endothelial cells and a subtle staining on cells at the basal layer of the epithelium, and it was observed a reduction in the intensity of the staining in accordance with the severity of epithelial disorder, but with an increase of staining of cells from the microenvironment. Thrombospondin presented a heterogeneous staining among epithelial, endothelial, and connective tissue, with an increase in the staining on macrophages and fibroblasts according to the severity of injury. This differential expression profile of these markers of angiogenesis process, which was observed in both epithelial cells and cells from the microenvironment, highlights the need for more studies exploring the cellular diversity of neoplastic lesions, in order to improve the existing anti-angiogenic therapies for the treatment of malignant disorders.

Keywords: Angiopoietin, Thrombospondin, Dysplasia, tumor microenvironment

Sumário

Referencial teórico	7
<i>Epidemiologia do Câncer</i>	7
<i>Carcinogênese</i>	7
<i>Organização do epitélio normal</i>	10
<i>Desordens Potencialmente Malignas</i>	11
<i>Carcinoma espinocelular</i>	13
<i>Microambiente tumoral</i>	13
<i>Angiogênese</i>	14
<i>Angiopoetinas</i>	17
<i>Trombospondina</i>	18
Objetivo geral	20
Objetivo Específico	20
Materiais e Métodos	21
<i>Imunoistoquímica</i>	21
Resultados	23
<i>Descrição da amostra</i>	23
<i>Angiopoetina 1</i>	24
<i>Trombospondina 1</i>	27
Discussão	30
Conclusão	36
Referências	37

Referencial teórico

Epidemiologia do Câncer

O carcinoma espinocelular é responsável por aproximadamente 90% de todas as lesões malignas na cavidade oral, sendo observada principalmente em regiões de lábios, língua, assoalho de boca, orofaringe e gengiva (Marocchio *et al.*, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou o carcinoma espinocelular oral (CEC oral) como o oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo em 2014 (Tsantoulis *et al.*, 2007). Anualmente mais de 500.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados, sendo 50.000 apenas nos Estados Unidos, sendo o sexto mais comum nesse país em 2013 (Arnaoutakis *et al.*, 2013). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam mais 15.290 novos casos de câncer de boca (11.280 em homens e 4.010 em mulheres) no Brasil no ano de 2014, sendo que, para o estado do Rio Grande do Sul, a previsão foi de 15,49 novos casos entre os homens e 3,4 entre as mulheres para cada 100.000 habitantes.

Carcinogênese

Os CEC orais podem se originar a partir de uma alteração direta das células epiteliais normais em tumorais, ou gradativamente, através das desordens potencialmente malignas. As razões que levam ao desenvolvimento destas lesões são multifatoriais e envolvem fenômenos químicos, físicos e/ou biológicos, os quais ocasionam inicialmente alterações proliferativas e tardiamente alterações invasivas. Um grande número de casos de CEC oral está associado ao consumo de tabaco e álcool onde os dois fatores possuem um efeito sinérgico, visto que o

álcool atua como agente permeabilizador da mucosa oral permitindo a penetração de carcinógenos contidos no cigarro, aumentando em até 7 vezes o risco recorrente (Hillbertz *et al.*, 2012). Esses agentes carcinogênicos do tabaco podem originar adutos no DNA, os quais são adição de substâncias resultantes da detoxificação celular nas bases que formam o ácido nucléico, alterando estrutura gênica e causando mutações (Loureiro *et al.*, 2002). Se a mutação resultar em perda da função de gene p53, o qual codifica uma proteína supressora de tumor, ocorrerá falhas na regulação do ciclo celular e na indução da apoptose, resultando em aumento da atividade proliferativa (Klozar *et al.*, 2010). Pelo menos 75% dos cânceres orais podem ser evitados com diminuição/cessação do uso do tabaco, sendo que o risco é diminuído proporcionalmente ao tempo de abandono do hábito (Warnakulasuriya *et al.*, 2010).

A exposição à radiação ultravioleta (UV), principalmente em regiões de lábio, é outro fator envolvido na carcinogênese, devido ao aumento da taxa de mutações no DNA causado pela transferência de energia para as células durante a duplicação do material genético no ciclo celular (Clydesdale *et al.*, 2001). Esta transferência de energia causa a formação de dímeros de pirimidinas, ou seja, duas bases iguais se unem lateralmente durante o processo de duplicação, fazendo com que essa fita se dobre, alterando a sequência e assim provocando uma mutação. Se a mutação não for corrigida pode ocorrer ativação do proto-oncogene RAS, induzindo a proliferação celular (Clydesdale *et al.*, 2001; Klozar *et al.*, 2010). Já entre os fatores biológicos, o papiloma vírus (HPV) é visto como principal desencadeador de câncer em não fumantes e não alcoolistas (Jerjes *et al.*, 2012; Rivera e Venegas, 2014) Durante o processo de infecção viral, o vírus

se utiliza do material genético do hospedeiro integrado ao seu para controlar seu ciclo celular. Quando existe uma infecção persistente, o próprio vírus pode perder controle sobre a expressão de seus genes e estes começam a produzir proteínas virais que irão degradar a proteína p53 e inativar a proteína retinoblastoma, o que leva a uma desregulação do ciclo celular e ao aumento da proliferação celular que pode levar à malignidade (Klozar *et al.*, 2010; Hillbertz *et al.*, 2012; Sasahira *et al.*, 2014).

A prevenção e o diagnóstico precoce são fundamentais visto que a taxa de sobrevivência de pacientes com carcinomas espinocelulares orais é de apenas 50% após 5 anos (Rivera e Venegas, 2014). Entretanto, o diagnóstico clínico geralmente é tardio, uma vez que ocorre quando as lesões malignas ou as desordens potencialmente malignas já apresentam um tamanho que permitem a sua visualização macroscópica. O desenvolvimento de estratégias moleculares que permitam o diagnóstico precoce e o rastreamento de populações com maior risco de desenvolver estas alterações é fundamental do ponto de vista preventivo. Entretanto, os caminhos moleculares que levam às alterações proliferativas e/ou invasivas de um epitélio normal em desordem potencialmente maligna e/ou carcinoma, ainda são pouco conhecidos (Vairaktaris *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013) Diversos pesquisadores têm se concentrado em estudos moleculares destas lesões tendo os distúrbios cromossômicos como principal alvo (William Jr, 2012). Fatores como alterações na regulação de oncogenes e genes supressores de tumor, polimorfismos gênicos, o processo inflamatório e os mecanismos de angiogênese também podem estar relacionados com o desenvolvimento e o avanço do câncer oral (Feinberg *et al.*, 2006). A investigação desses fatores tem

sido incentivada, pois pode levar a uma nova perspectiva tanto na prevenção quanto no tratamento destas lesões. Por exemplo, as terapias anti-angiogênicas visam a diminuir a vascularização das lesões o que, em teoria, levaria a uma diminuição das lesões orais (Giuliano e Pagès, 2013). Entretanto, muitas destas estratégias moleculares têm falhado principalmente devido à heterogeneidade celular observada nos diferentes estágios da lesão, o que torna necessário o entendimento da evolução destes marcadores de acordo com o nível de diferenciação da lesão.

Organização do epitélio normal

A cavidade oral é revestida por um epitélio, o qual é composto de células justapostas dispostas em múltiplas camadas e que se comunica entre si através de junções intercelulares. Estas células estão separadas do conjuntivo por uma lâmina basal, que tem a função de sustentar este epitélio e permitir a passagem seletiva de moléculas. A nutrição do epitélio é proveniente dos vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo subadjacente. Em condições fisiológicas, as células epiteliais da camada basal se multiplicam e se diferenciam mantendo a integridade e a funcionalidade do tecido, sendo que a espessura do epitélio é mantida pelo equilíbrio entre a taxa de proliferação e de perda de células da camada apical (Muthu Rama Krishnan *et al.*, 2010). Quando esse epitélio sofre agressões, agudas ou crônicas, pode acumular mutações gênicas que levam a um desequilíbrio nesta homeostase proliferativa, podendo se tornar uma desordem potencialmente maligna (Tanaka e Ishigamori, 2011; Lamouille *et al.*, 2014).

Desordens Potencialmente Malignas

Desordens potencialmente malignas orais são lesões que, se não tratadas e acompanhadas, podem evoluir para o câncer. Essas lesões são relativamente comuns e vêm sendo investigadas como um possível e importante fator a ser considerado na luta de prevenção e combate ao câncer bucal (Van Der Waal, 2014; Carreras-Torras e Gay-Escoda, 2015). Mais de 90% dos CEC orais evoluem de lesões potencialmente malignas ou de condições potencialmente cancerizáveis (Liu *et al.*, 2012). O diagnóstico precoce é importante, visto que as taxas de evolução para lesões malignas podem alcançar números de 17% (Amagasa *et al.*, 2011), valor que tem aumentado em um período de 7 anos (Carnelio *et al.*, 2011). Contudo os mecanismos envolvidos nessa transformação ainda não são bem compreendidos (William, 2012), o que dificulta o desenvolvimento de estratégias moleculares para diagnóstico precoce e o rastreamento destas lesões em populações de maior risco.

Clinicamente, entre as desordens potencialmente malignas, destacam-se as leucoplasias, as quais são lesões localizadas na mucosa oral, facilmente detectáveis através de diagnóstico clínico, e que apresentam uma cor predominantemente branca, podendo ter borda definida e um aspecto liso com fissuras na superfície de queratina (Carnelio *et al.*, 2011; Yardimci *et al.*, 2014). Algumas lesões mais vascularizadas podem apresentar sangramento (Zarei *et al.*, 2007).

Histologicamente, essas lesões podem apresentar diferentes níveis de alteração epitelial, as quais são classificadas em hiperkeratose, hiperplasia e displasia epiteliais e carcinoma *in situ* (Zarei *et al.*, 2007; Yardimci *et al.*, 2014). As

hiperceratoses e as hiperplasias epiteliais não-displásicas estão entre as ocorrências mais comuns entre os diagnósticos histológicos das leucoplasias e são caracterizadas por variações na forma, no tamanho e no número das células do tecido epitelial, ocasionando um espessamento do mesmo (Wenig, 2002). Já as displasias epiteliais, que estão mais susceptíveis a se transformar em um câncer oral, são caracterizadas por uma proliferação da camada epitelial seguida por uma subsequente degradação da lâmina basal (Rivera e Venegas, 2014). Devido às taxas de proliferação alteradas, podem ser observadas microscopicamente alterações no epitélio como: estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, projeções epiteliais em forma de gota, aumento do número de figuras mitóticas, perda da polaridade das células da camada basal, aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear, hipercromatismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, ceratinização de células isoladas ou em grupos na camada celular espinhosa e redução da aderência intercelular. De acordo com a graduação de alterações estruturais e citológicas causadas por esta proliferação descontrolada, as displasias são classificadas em (i) displasia leve: quando duas características histológicas estão presentes; (ii) displasia moderada: quando duas a quatro das características estão presentes; (iii) displasia severa: quando cinco ou mais das características citadas estão presentes (Rivera e Venegas, 2014; Dionne *et al.*, 2015). No carcinoma *in situ*, o epitélio apresenta todas as características celulares citadas anteriormente, porém sem o rompimento da lâmina basal e a invasão do tecido conjuntivo subjacente (Wenig, 2002).

Carcinoma espinocelular

O carcinoma espinocelular é caracterizado microscopicamente pela presença de todas as características histopatológicas citadas nas desordens potencialmente malignas, porém acompanhadas de uma invasão do tecido conjuntivo pelas células tumorais, a qual pode ocorrer sob a forma de lençóis, ninhos e/ou cordões celulares. A presença de eventos microscópicos como, por exemplo, as pérolas de queratina, são usadas para determinar o grau de diferenciação do tumor, sendo considerados os tumores mais diferenciados como menos agressivos (Bryne *et al.*, 1992; Sawazaki-Calone *et al.*, 2015). Os carcinomas são graduados em 4 níveis, sendo o parâmetro mais usual a graduação do fronte de invasão. De acordo com os critérios de Bryne, estabelecidos em 1992 (Bryne *et al.*, 1992) o carcinoma de grau I ou bem diferenciado contém menos de 20 % de células indiferenciadas; grau II ou moderadamente diferenciado com menos de 50% das células indiferenciadas; grau III ou pouco diferenciado com menos de 75% das células indiferenciadas e; grau IV ou pleomórfico com mais de 75% de células indiferenciadas (Akhter *et al.*, 2011). Também é utilizado o sistema TNM onde são levados em conta o tamanho do tumor (T), se existe ou não metástase nos linfonodos (N) e metástase a distancia (M). A partir do cruzamento destes parâmetros, origina-se a graduação dos carcinomas espinocelulares orais e desenha-se um possível prognóstico do paciente (Patel e Shah, 2005).

Microambiente tumoral

Durante muito tempo o câncer foi considerado como um processo em que células autônomas, com uma série de alterações genéticas e epigenéticas, se

desenvolvem e progridem independentes do meio em que estão inseridas (Li *et al.*, 2015). Contudo evidências mostram que o tumor se utiliza de todo o microambiente em que está inserido, onde além das células tumorais outros grupos celulares interagem formando o denominado microambiente tumoral (Koontongkaew, 2013). As principais células que irão formar esse microambiente tumoral são: fibroblastos; fibroblastos associados ao tumor; miofibroblastos, células de músculo liso; células endoteliais; pericitos; macrófagos entre outras células do sistema imune (Rivera e Venegas, 2014). O tumor explora seu ambiente tumoral fazendo com que ele libere citocinas que irão regular outras funções necessárias ao tumor (Weis e Cheresh, 2011). Alterações no microambiente podem ser observadas desde estágios iniciais das desordens potencialmente malignas e incluem um aumento da formação dos vasos sanguíneos, o qual é denominado angiogênese (Weis e Cheresh, 2011).

Angiogênese

Para um tecido sadio crescer são necessárias algumas condições favoráveis, entre elas demandas metabólicas como suprimento de oxigênio e suporte nutricional que são disponibilizados através de vasos sanguíneos (Bridges e Harris, 2011). O crescimento desses vasos é denominado angiogênese que é um termo comumente chamado para o processo que se refere ao crescimento de vasos ou a ramificação a partir de pré-existentes (Weis e Cheresh, 2011; El-Kenawi e El-Remessy, 2013; Gacche e Meshram, 2013). Em casos de lesões malignas, a angiogênese não só favorece o crescimento e a progressão do tecido tumoral, como também contribui para a invasão e metástase, sendo considerada como um importante indicador de prognóstico

(Weis e Cheresh, 2011; Kaur e Bajwa, 2014). Durante a progressão de tumores malignos, entre eles o CEC oral, ocorre um aumento significativo da densidade microvascular e do perfil de maturação de vasos, fazendo com que o perímetro e a forma desses vasos sejam diferentes dos encontrados em tecidos normais (Li *et al.*, 2013). A densidade de microvasos pode ser relacionada como um fator de expressão angiogênico, de crescimento tumoral e de ocorrência de metástase. A angiogênese tem papel muito importante, tanto no desenvolvimento do câncer, quanto na metástase (Carmeliet, 2005), assim como o aumento da microvascularização está relacionado com uma diminuição do tempo de vida livre de doença e de sobrevida global (Koh, 2013).

A angiogênese ou fenótipo angiogênico é o resultado do equilíbrio alterado entre os reguladores positivos e negativos gerando uma nova vascularização (Anisimov *et al.*, 2013). Os vasos sanguíneos são classificados em capilares, artérias e veias, os quais todos são revestidos internamente por uma camada de endotélio, sendo que as artérias e veias possuem uma camada subsequente de músculo liso e uma camada externa de tecido conjuntivo. Adicionalmente, os pericítos são células encontradas ao redor das células endoteliais, e têm a função principal de estabilizar o vaso sanguíneo, principalmente em capilares. Quando existe um estímulo angiogênico, ocorre um destacamento dos pericítos, seguido pela proliferação das células endoteliais e a formação de uma “*tip-cell*”, a qual é uma célula endotelial que desenvolve projeções de membrana (lamelipódios) e começa a migrar em direção ao estímulo angiogênico. A *tip cell*, através de junções célula-célula, traciona as células endoteliais remanescentes levando à formação de tubos (*stalk elongation*) contendo um lúmen central que pode sofrer

ramificações. Durante este processo, os pericítos e as células musculares lisas são recrutados para envolver esse novo vaso e estabilizá-lo (Carmeliet, 2005; Adams e Alitalo, 2007; Potente *et al.*, 2011; Welte *et al.*, 2013; De Lima *et al.*, 2014).

Assim que o tumor atinge poucos milímetros de tamanho, a concentração de oxigênio disponível diminui, levando a ativação do fator induzido por hipóxia (Weis e Cheresh, 2011). Após este estímulo, as células tumorais secretam diferentes fatores reguladores como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), FGF (fator de crescimento de fibroblasto), TGF β -1 (fator de crescimento transformante), PDGF (fator crescimento derivado de plaquetas), PlGF (fator de crescimento placentário), ANG-1 (angiopoetina 1), TSP-1 (trombospondina 1) e as MMPs (metaloproteases), que controlam as diferentes etapas da angiogênese. Dentre os fatores citados anteriormente o VEGF é o mais pesquisado em diversos tipos de tumor (Hoff e Machado, 2012; Welte *et al.*, 2013).

A aplicação experimental de terapias anti-angiogênicas, utilizando células endoteliais isoladas de capilares ou de vasos de maior calibre, têm trazido grandes esclarecimentos sobre a biologia celular e molecular da angiogênese, levando a descobertas sobre o potencial anti-angiogênico dos seus componentes (Yoo e Kwon, 2013). A principal ideia por trás das terapias anti-angiogênicas é deter o crescimento da neovascularização e promover a destruição o tumor por hipóxia (Zulato *et al.*, 2012; Giuliano e Pagès, 2013). O principal foco das investigações sobre terapias anti-angiogênicas foi fator de crescimento endotelial (VEGF), por este exercer um papel essencial entre a angiogênese fisiológica e patológica (Shojaei, 2012; Giuliano e Pagès, 2013). Entretanto, outros fatores

regulatórios desempenham papel importante neste processo, como as moléculas angiopoetinas e trombospondinas (Yao *et al.*, 2000; Monk *et al.*, 2014).

Angiopoetinas

As angiopoetinas são citocinas que atuam como fatores de crescimento endotelial específico, secretadas por células perivasculares, como pericítos e células de músculo liso (De Palma e Naldini, 2011), porém seu papel na angiogênese ainda é pouco descrito. Expressas em muitos tecidos adultos e durante o desenvolvimento, acredita-se que as angiopoetinas atuam na maturação vascular. A Angiopoetina 1 (Ang1) é um dos membros mais descritos desta família. A Ang1 atua nas células endoteliais através de interação com um receptor Tie 2 (Loughna e Sato, 2001; Brunckhorst *et al.*, 2014). É responsável pela sobrevivência, proliferação a maturação e formação do lúmen dos novos vasos e a quiescência das células endoteliais (Fagiani e Christofori, 2013; Alfieri *et al.*, 2014). Os receptores Tie são expressos em células endoteliais, sanguíneas e linfáticas bem como em determinados macrófagos e fibroblastos (Fagiani e Christofori, 2013; Brunckhorst *et al.*, 2014). Sua expressão aumenta durante a resposta inflamatória (Khan *et al.*, 2014) e na vascularização provocada pelo processo de angiogênese tumoral, o que sugere a sua participação na neovascularização deste tecido (Roodink e Leenders, 2010). Na presença da Ang1, os receptores Tie-2 se deslocam para as junções célula-célula, onde regulam complexos proteicos que atuam na sobrevivência, estabilidade e funções anti-inflamatórias promovidas pelas células endoteliais (Eklund e Saharinen, 2013).

Trombospondina

A trombospondina foi o primeiro inibidor endógeno de angiogênese descoberto (Rosca *et al.*, 2011). É uma glicoproteína multifuncional sintetizada por plaquetas, macrófagos, monócitos, células de músculo liso, endoteliais ou tumorais (Bonney *et al.*, 2008) e pode interagir com diversas estruturas, dentre elas outras proteínas e componentes da matriz extracelular, receptores de células, fatores de crescimento, citocinas e proteases (Resovi *et al.*, 2014). As trombospondinas do tipo 1 são potenciais inibidoras da angiogênese por atuarem de maneira direta na sobrevivência e apoptose de células endoteliais e como antagonista do VEGF (Lawler e Lawler, 2012). A TSP-1 contém muitos domínios funcionais e, devido a sua capacidade de ligação com várias estruturas, entre elas, proteínas de matriz e células de superfície, essas glicoproteínas participam de diversos processos biológicos, tais como: proliferação, crescimento e mobilidade celular, organização do citoesqueleto, cicatrização, desenvolvimento e diferenciação celular. Entretanto, desempenha um papel contraditório no desenvolvimento e na progressão do câncer (Yao *et al.*, 2000; Lawler e Lawler, 2012). A TSP-1 inibe a proliferação e migração das células endoteliais contribuindo para a quiescência vascular evitando o crescimento de uma neovasculatura e sua expressão está inversamente ligada à malignidade (Detmar, 2000). Entretanto, também pode estar associada à progressão e invasão de determinados tumores, pois ativa TGF-beta, que leva há um aumento na transição epitélio-mesênquima e em consequência a migração celular (Jayachandran *et al.*, 2014).

Uma vez que: 1- o processo de angiogênese envolve uma vasta gama de moléculas estimulatórias (ex.: ANG1) e inibitórias (ex.: TSP1) as quais são secretadas por diferentes tipos celulares e; 2- durante o desenvolvimento tumoral ocorre uma maior demanda de nutrientes e oxigênio, é possível que as células tumorais e/ou do microambiente tumoral adquiram características angiogênicas diferenciadas, cuja expressão varia de acordo com a agressividade da lesão.

Objetivo geral

Analisar a expressão das proteínas envolvidas na angiogênese em lesões potencialmente cancerizáveis e no carcinoma espinocelular.

Objetivo Específico

Descrever o perfil de expressão da molécula Angiopoetina 1 em amostras de hiperplasia, displasia leve, displasia severa e carcinoma espinocelular de grau I/II e III/IV.

Descrever o perfil de expressão da molécula Trombospondina 1 em amostras de hiperplasia, displasia leve, displasia severa e carcinoma espinocelular de grau I/II e III/IV.

Materiais e Métodos

Amostra

O protocolo de pesquisa está de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa (CONEP) para pesquisa em seres humanos e foi aprovado no comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número CAE 32321514.5.0000.5347.

A amostra foi composta de 54 pacientes que buscaram atendimento no Centro de Especialidade em Odontologia (CEO) da Faculdade de Odontologia da UFRGS ou que tiveram diagnóstico realizado pelo setor de Patologia da Universidade entre os anos de 1979 e 2009. Foram obtidas dos prontuários desses pacientes informações como: sexo, idade, etnia e localização da lesão. Os diagnósticos foram confirmados por dois patologistas experientes e quando houve divergência um terceiro realizou a avaliação. A classificação das desordens potencialmente malignas utilizou os critérios de Barnes et al (2005) (Barnes *et al.*, 2005), enquanto que os carcinomas espinocelulares orais foram classificados de acordo com Bryne et al 1992. (Bryne, 1992).

Imunoistoquímica

Os cortes parafinados de 3 μ m de espessura foram colocados em estufa (1h, 60°C) e, em temperatura ambiente (TA), imersos em xilol (2x 10 min), álcool (2x 5 min) e reidratados com PBS. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com metanol+H₂O₂ (9/1, 10 min) e lavado em PBS + triton X100 0,1% (3x5min) (PBST). O corte foi submetido a bloqueio dos sítios inespecíficos com soro de cabra (1:10, 1h), lavados em PBST e incubados com

anticorpo primário, *overnight* na geladeira diluído em PBST (anticorpos anti-Angiopoetina e anticorpos anti-Trombospondina, diluição 1:100, R&D System, Minneapolis, US). Após incubação, os cortes foram lavados em PBST (3x5 min), incubados com anticorpo secundário biotilado (1:200, 2h, TA), novamente lavados (PBST, 3x5min) e tratados com o complexo estreptavidina- peroxidase (Jackson Labs) por 1 h a TA. A atividade da peroxidase foi revelada usando Diaminobenzidina (DAB) 0,05% (Dako) diluído em Tris-HCl 50mM (pH 7,4) por 5 min. A amostra foi desidratada (etanol, 3x10min, xilol 3x10min) e montada em resina.

Análise das reações de imunoistoquímica

Foi considerada a marcação da expressão da Angiopoetina 1 e da Trombospondina1 em células endoteliais, tecidos epitelial e conjuntivo e em outros grupos celulares, como fibroblastos e células inflamatórias. De cada lâmina, foram obtidas 10 fotos, sendo 5 correspondentes à região de epitélio e 5 do conjuntivo adjacente. Todas as imagens foram obtidas com um aumento de 400x com uma câmera de 5 megapixels (CMOS Bioptika) e o software IScapture 3.6.7 e posteriormente passaram por uma edição linear de contraste e brilho com o auxílio do programa ImageJ para uma melhor análise da marcação dos anticorpos. A partir das imagens foram realizados painéis para cada lesão, os quais serviram como base para a descrição do perfil de marcação de cada anticorpo.

Resultados

Descrição da amostra

A maioria dos pacientes foi do sexo masculino, com idade entre 30 e 60 anos e de cor branca, sendo o sítio mais atingido foi a língua seguida pelo assoalho de língua e palato para todas as lesões analisadas. Os dados de consumo de álcool e hábito de fumar não foram informados na maioria dos prontuários. A amostra foi dividida de acordo com o tipo de lesão, como descrito na tabela 1.

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos pacientes participantes da pesquisa

		Displasia			Carcinoma	
		Hiperplasia n= 6	Leve n=7	Moderada ou severa n= 15	Grau I/II n= 13	Grau III/IV n= 13
Sexo	M	-	5	7	9	10
	F	6	2	7	4	3
	NI	-	-	1	-	-
Idade	< 30	1	0	2	0	0
	>30 <60	3	5	9	7	7
	>60	2	2	2	5	4
	N.I.	-	-	-	1	1
Etnia	branca	4	6	10	10	9
	negra	2	-	3	2	1
	N.I	-	1	2	1	3
	parda					
Álcool	Sim		1		2	1
	Não					2
	N.I.	6	6	15	11	10
Fumo	Sim			1	3	3
	Não	-		-	-	2
	N.I	6	7	15	10	8
Sítio da lesão	Língua	3	2	10	2	6
	M. jugal	1	0	0	0	0
	Gengiva	1	1	4	4	3
	Palato	-	1	1	2	2
	Outros	1	3	0	5	2

N.I = não informado; M = mucosa

Angiopoetina 1

Nas amostras de mucosa normal, foi observada leve marcação na camada basal do epitélio e em vasos sanguíneos. Nas lâminas de hiperplasia (n=8) pode-se observar uma marcação intensa da proteína angiopoetina 1 em 5 casos (60%). A marcação para a proteína foi observada principalmente em células endoteliais e com uma distribuição difusa na camada basal do tecido epitelial (Figura 1B). Não foi observada marcação significativa, no tecido conjuntivo (Figura 1H) subjacente nem em outros tipos celulares em todas as lâminas analisadas.

Na amostra de displasia leve (n= 4), observou-se marcação principalmente em células endoteliais e na camada basal do epitélio (Figura1C). Entretanto não houve marcação no tecido conjuntivo (Figura 1I) nem em outros grupos celulares.

Nas lâminas com o diagnóstico de displasia moderado-severa houve uma marcação irregular na amostra (n=13). Foi observada marcação intensa no endotélio e na camada basal do epitélio (Figura 1D) em seis casos (46%), enquanto que dois casos (15%) apresentaram leve marcação nestes tecidos. Em 5 casos (39%) foi observada marcação fraca nas células endoteliais, epiteliais, a qual foi acompanhada por uma marcação difusa no tecido conjuntivo, mais precisamente, em alguns nos fibroblastos (Figura 1J).

Nos casos de carcinoma de grau I/II (n=9), foi observada uma marcação intensa no tecido endotelial e no epitélio (Figura 1E) em 3 casos (33%), porém sem envolvimento do tecido conjuntivo (Figura 1K). Nas demais lâminas (6 casos,(66%) marcação fraca nas células do tecido endotelial, epitelial. Destes

casos com baixa intensidade de sinal, em 57% foi observado marcação em células inflamatórias presentes no microambiente tumoral.

Nas lâminas de carcinoma grau III/IV (n=6), em 3 casos foi observada marcação fraca em células endoteliais e epiteliais (Figura 1F) porém sem expressão em tecido conjuntivo (Figura 1L) nem em outros grupos celulares. Nas demais lâminas (3), foi observada uma marcação forte nas células endoteliais, no entanto 33% marcaram forte na camada basal do epitélio adjacente ao tumor e em 67 % isso não ocorreu. No conjuntivo, mais precisamente no centro do tumor encontramos marcação em células inflamatórias.

De acordo com os resultados, a distribuição da proteína angiopoetina 1 esteve concentrada principalmente nas células endoteliais e com leve marcação nas células da camada basal do epitélio. Nas células endoteliais, observou-se uma redução da intensidade de marcação de acordo com o grau de severidade da desordem epitelial. Em uma das situações (carcinoma grau I/II), foi observada marcação de células inflamatórias.

Padrão de expressão Angiopoetina 1

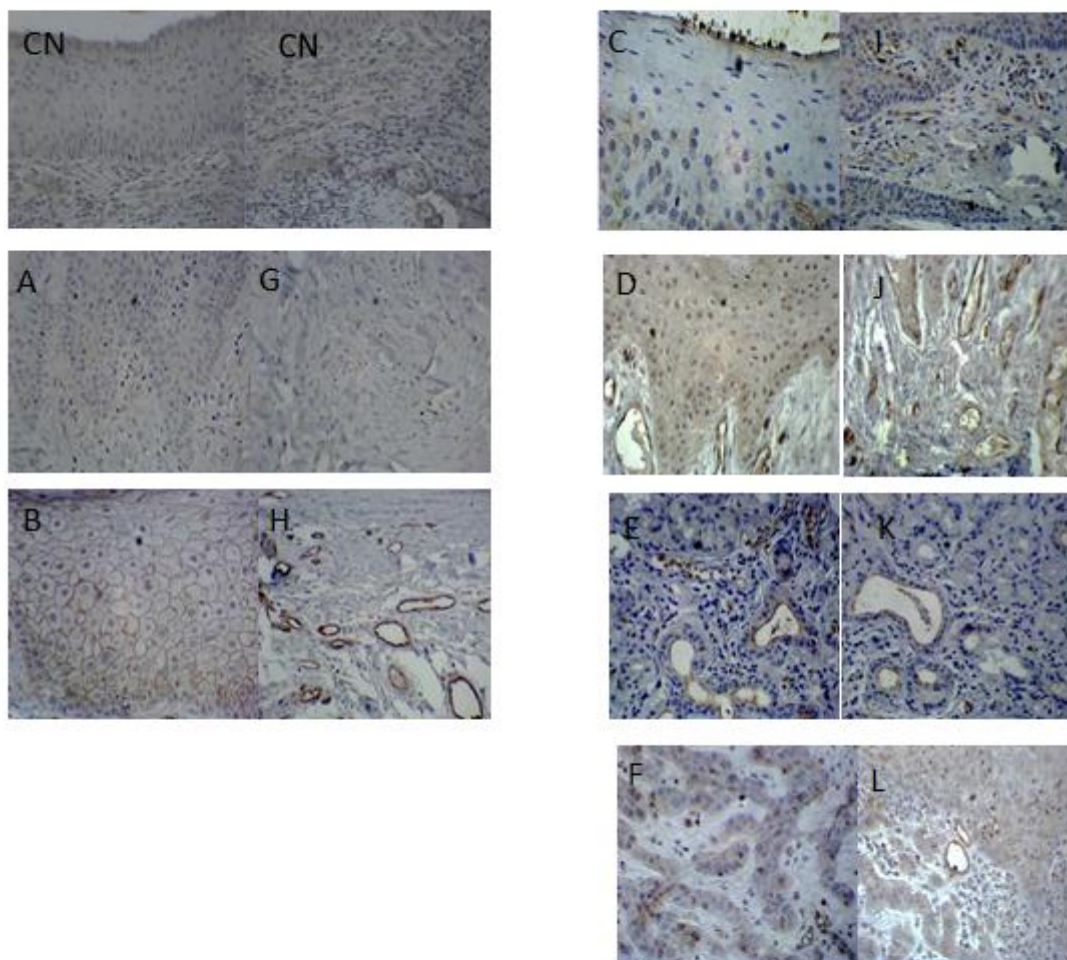


Figura 1. Marcação de imunistoquímica para Angiopoetina1. Figuras A-F tecido epitelial; Figuras G-L tecido conjuntivo. Biópsias de mucosa normal (A e G), hiperplasia (B e H), displasia leve (C e I), displasia moderada/severa (D e J), carcinoma espinocelular grau I/II (E e K) e III/IV (F e L). CN=Controle Negativo. Aumento = 400x.

Trombospondina 1

Nas amostras de mucosa normal, não foi observada marcação de trombospondina na camada basal, mas esteve presente em algumas células endoteliais. Nos casos de hiperplasia (n=5) foi observada uma marcação intensa em 4 casos (80%), sendo que estava espalhada pelas camadas do epitélio e no núcleo. No tecido conjuntivo ocorreu uma marcação em 60 % das amostra (3 lâminas), sendo observada principalmente em fibroblastos e macrófagos.

Nas lâminas de lesões epiteliais com displasia leve (n=7), foi observada marcação em epitélio em 100% da amostra, sendo mais intensa na camada basal. Já o endotélio apresentou marcação fraca em 6 casos (85%). A análise do tecido conjuntivo foi positiva para 4 casos (57%), sendo observada tanto em fibroblastos quanto em macrófagos.

Nos casos de displasia severa (n=7) tivemos marcação no tecido epitelial em 5 casos (70%), principalmente na camada basal. O endotélio e o tecido conjuntivo apresentou marcação em 3 casos (43%), sendo detectado em fibroblastos e macrófagos.

Na amostra referente aos casos de carcinomas de tipo I e II (n=13) a expressão de trombospondina foi detectada no tecido epitelial e conjuntivo em 100% dos casos, sendo a marcação mais fraca no conjuntivo que no epitélio. No tecido endotelial a expressão da proteína ocorreu apenas em 4 casos (30%). Os tipos celulares mais frequentes foram macrófagos (10 casos ou 77 %) e fibroblastos (46%).

A amostra de carcinomas tipo III/IV (n=11) a expressão da proteína no tecido epitelial foi detectada em 10 casos (91%), sendo que 1 caso (10%) apresentou marcação fraca; em 7 casos (70 %) apresentou marcação difusa em todo o tecido porém com mais intensidade na camada basal; e em 2 casos (20%) observou-se marcação homogênea intensa em todo o epitélio. No tecido conjuntivo, a marcação foi observada principalmente em macrófagos (39%), fibroblastos (30%) e outras células inflamatórias (23%).

De acordo com os resultados, trombospondina apresentou marcação evidente em células epiteliais com leve marcação em endotélio. Com o aumento da malignidade da lesão, observou-se marcação para trombospondina 1 tanto em fibroblastos quanto em macrófagos.

Padrão de expressão Trombospondina 1

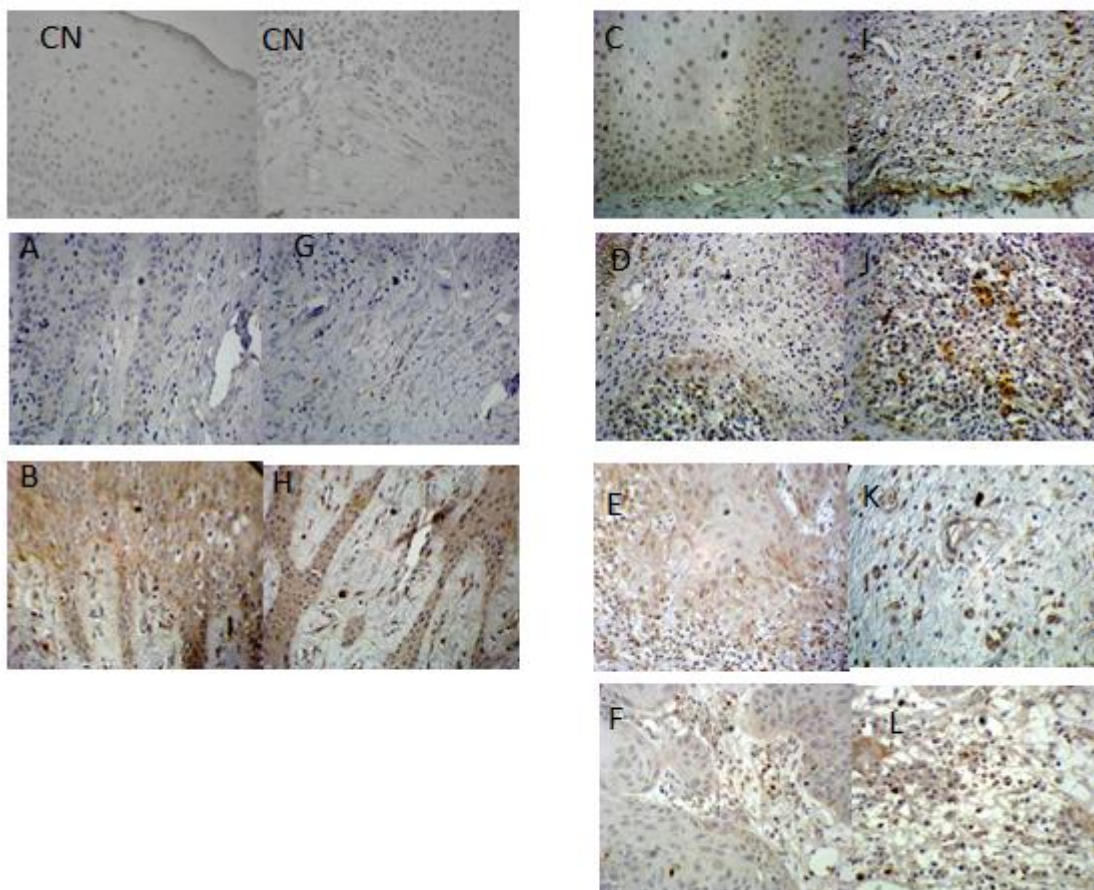


Figura 2. Marcação de imunistoquímica para Trombospondina1. Figuras A-F tecido epitelial; Figuras G-L tecido conjuntivo. Biópsias de mucosa normal (A e G), hiperplasia (B e H), displasia leve (C e I), displasia moderada/severa (D e J), carcinoma espinocelular grau I/II (E e K) e III/IV (F e L). Controle Negativo (CN) Aumento = 400x.

Discussão

O carcinoma espinocelular oral pode ser considerado um problema de saúde pública devido à alta incidência na população (Tsantoulis *et al.*, 2007). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam mais de 15.290 novos casos de câncer de boca no Brasil no ano de 2014, com uma predominância de casos em indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 e 60 anos sendo o sítio mais atingido a língua. Já as desordens potencialmente malignas, seguem o mesmo perfil, com a diferença de a mucosa jugal ser considerada o sítio anatômico mais comum. Em nosso estudo, foi observado que as desordens potencialmente malignas são mais recorrentes em indivíduos do sexo feminino e de etnia branca, tendo a língua como principal sítio, porém quando observamos apenas os carcinomas esse perfil muda, onde a maioria das lesões ocorre no sexo masculino. Em relação à faixa etária, a grande maioria dos pacientes tem entre 30 e 60 anos, tanto para as desordens potencialmente malignas quanto o carcinoma espinocelular, o que segue os padrões mundiais (Johnson *et al.*, 2011). O sítio mais afetado foi a língua, sendo o rebordo o local com mais incidência e em seguida o palato e o assoalho de boca, o mesmo demonstrado por Amagasa *et al.* (2011), entretanto o segundo sítio mais comum foi o assoalho de boca (Amagasa *et al.*, 2011) e não o palato.

O desenvolvimento do processo de carcinogênese está relacionado a fatores físicos, químicos e biológicos, sendo o fator etiológico mais comum o cigarro. Entretanto, os dados sobre tabagismo e consumo de álcool não foram considerados neste estudo, pois poucos prontuários tinham essas informações, o

que evidencia a necessidade de um maior cuidado por parte dos profissionais no momento da anamnese dos pacientes.

Além dos fatores etiológicos, alterações no microambiente em que as células se encontram, podem propiciar a indução e a propagação das alterações celulares observadas durante a carcinogênese. O microambiente tumoral é um processo controlado pelas células tumorais onde ele recruta uma série de outros grupos celulares para criar um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, dentre essas células endoteliais, fibroblastos e do sistema imune, principalmente macrófagos (Rivera e Venegas, 2014). Os fibroblastos associados ao tumor (CaFs, siglas em inglês) são as células mais abundantes no estroma tumoral e promovem a progressão do câncer por estimulação de crescimento, migração e invasão de células epiteliais e da remodelação da matriz extracelular (Rivera e Venegas, 2014; Li *et al.*, 2015). Já os macrófagos podem ter papéis distintos no microambiente tumoral, por apresentar duas variantes, o macrófago do tipo 1 (M1) que possui perfil pro-inflamatório, ou seja antitumoral e o macrófago tipo 2 (M2) que tem perfil anti-inflamatório e pró-tumoral (Hao *et al.*, 2012). Estudos já demonstraram que a angiopoetina tem a capacidade de regular a diferenciação de macrófagos (Seok *et al.*, 2013). No nosso estudo encontramos um aumento de células do sistema imune, mais precisamente macrófagos e também de fibroblastos à medida que as lesões aumentavam sua malignidade, como o que foi demonstrado por Joyce e Pollard em 2009 (Joyce e Pollard, 2009). É possível que a predominância de um destes subtipos celulares possa interagir e alterar o comportamento das células epiteliais e/ou tumorais, o que mostra a necessidade

de mais estudos para caracterização do perfil imunológico das células presentes neste microambiente.

Uma possível ação deste microambiente tumoral seria a indução da angiogênese. O processo de formação de vasos ocorre naturalmente no desenvolvimento embrionário do ser humano, onde recebe o nome de vasculogênese. Quando o desenvolvimento destes neovasos acontece a partir de vasos pré-existentes recebe o nome de angiogênese (Carmeliet, 2005). Para que o tumor possa se desenvolver ele necessita de uma demanda de oxigênio e nutrientes, e conseqüentemente de vasos sanguíneos para ter acesso a essa demanda. Diante desse quadro o tumor com o auxílio do microambiente estabelecido por ele, estimula a angiogênese (Weis e Cheresh, 2011).

Para que ocorre a formação de novos vasos, as células tumorais secretam uma série de fatores angiogênicos, dentre elas as angiopoetinas que se ligam em receptores Tie2 que estão presentes nas células endoteliais e também em fibroblastos (Brunckhorst *et al.*, 2014). Segundo Chien *et al.* (2008), a marcação de angiopoetina em carcinomas espinocelulares orais se apresenta de maneira intensa em células epiteliais o que vem de encontro aos nossos resultados (Chien *et al.*, 2008). Podemos observar no nosso estudo que as angiopoetinas estão presentes no endotélio das lesões mais iniciais do processo carcinogênico e isso acontece em outros tipos de tumor como glioblastomas, câncer de pulmão, carcinoma hepatocelular e gástrico, sarcoma de Kaposi, angiosarcoma, neuroblastoma e tumor de tireóide (Metheny-Barlow e Li, 2003). Essa marcação se torna menos evidente na medida em que as lesões se tornam mais graves, isso se deve provavelmente ao fato de angiopoetina atuar nos momentos iniciais

da angiogênese. No início do processo de malignização, quando analisados outros grupos celulares, como macrófagos e fibroblastos, temos uma crescente evidência dessa expressão, provavelmente relacionada com o papel da angiopoetina na manutenção do microambiente tumoral (Patel *et al.*, 2013; Brunckhorst *et al.*, 2014).

As terapias anti-angiogênicas tem como objetivo diminuir ou até eliminar o suprimento de nutrientes e oxigênio do tumor para que ele regreda seu desenvolvimento (Vasudev e Reynolds, 2014). Trombospondina foi o primeiro fator anti-angiogênico descoberto, por ser um antagonista de VEGF (Qin *et al.*, 2014), porém existem evidências de que pequenas quantidades podem resultar em um perfil pró-angiogênico (Szabo, 2015). Adicionalmente, trombospondina pode ajudar na progressão e invasão tumoral por ativar a transição epitélio-mesênquima em melanomas (Jayachandran *et al.*, 2014). Em nosso estudo observamos uma forte marcação nas células da camada basal do epitélio o que poderia indicar um início de transição epitélio-mesênquima. Também foi observada marcação em fibroblastos em muitos dos casos dos pacientes com carcinoma o que indica que as células desse tipo de câncer induzem fibroblastos a produzir trombospondina, o que poderia promover um aumento na malignidade do tumor (Hayashido *et al.*, 2003). Pacientes com câncer de pulmão, mama e colón apresentam grande quantidade de trombospondina em seu estroma, inclusive pacientes de câncer de cabeça e pescoço (Wang *et al.*, 1995). Os macrófagos, os quais são um dos principais componentes do microambiente tumoral, também apresentaram marcação para trombospondina, o que vai de encontro com o que já foi demonstrado em outros tumores (Gacche e Meshram,

2013; Emeus *et al.*, 2015). Contudo, o aparente papel antagônico desta proteína considerada anti-angiogênica fica mais evidenciada, pois está envolvida na ativação do fator de crescimento TGF β , o qual está relacionado com a proliferação e a migração celular(Lopez-Dee *et al.*, 2011). Portanto, existem evidências que trombospondina pode ter um papel antagônico no processo de carcinogênese, influenciada principalmente pelo microambiente tumoral.

O processo de angiogênese, em condições fisiológicas é complexo e envolve a ação coordenada de diferentes fatores os quais são secretados por uma grande quantidade de células (Carmeliet, 2005; Adams e Alitalo, 2007; Potente *et al.*, 2011). No processo de carcinogênese, este processo apresenta uma regulação alternativa. É possível que a angiopoetina (Figura 3 A) tenha um papel mais complexo no processo de carcinogênese do que previamente reportado. Ficou evidente que além de seu papel principal, que é o envolvimento com a angiogênese, essas proteínas também podem estar envolvidas em outros eventos do desenvolvimento tumoral, ente eles a formação e a manutenção do microambiente tumoral. Também fica evidente a relação da trombospondina (Figura 3B) com células do sistema imune, principalmente, tendo sua expressão aumentada proporcionalmente à malignidade da lesão. Entretanto, mais estudos são necessários para definir o papel destes reguladores de angiogênese na carcinogênese oral.

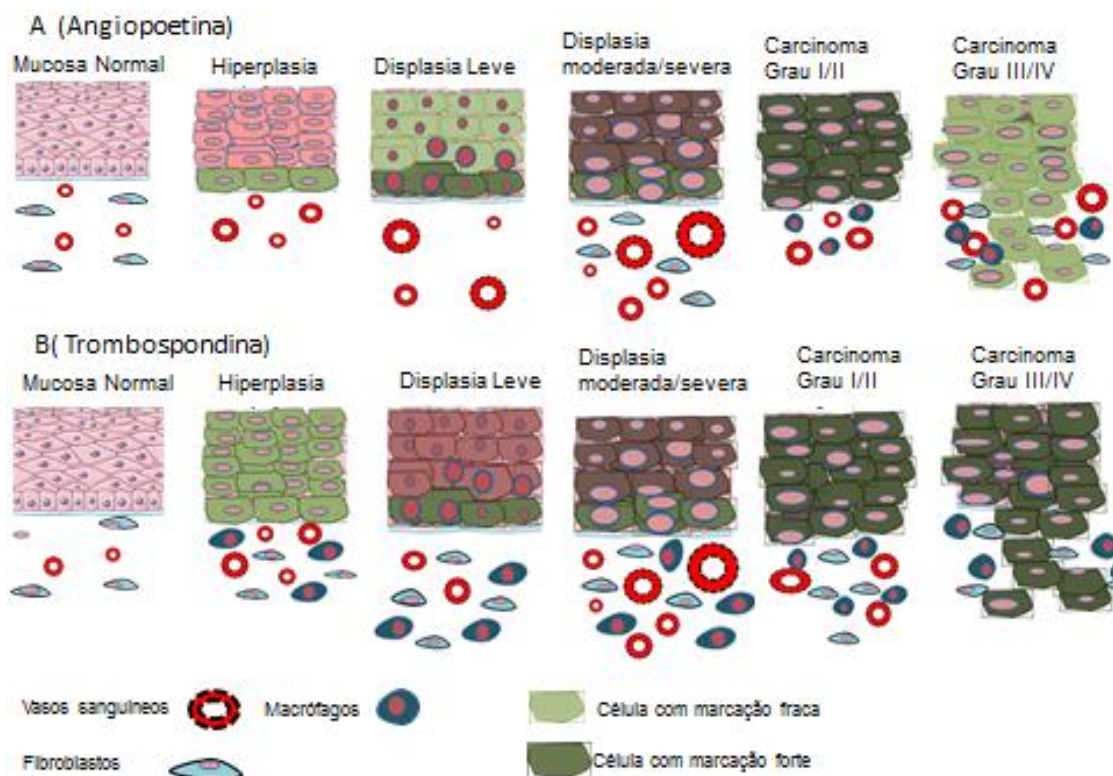


Figura 3 – Modelo proposto para o perfil de distribuição de Angiopoetina 1 (A) e Trombospondina 1 (B) em amostras de mucosa normal, desordens potencialmente malignas e carcinoma espinocelular oral. Observamos a mucosa normal e as estruturas presentes no conjuntivo. A partir das hiperplasias observamos o que apresentou marcação no epitélio e no conjuntivo.

Conclusão

A Angiopoetina 1 é observado em endotélio e em camada basal do epitélio. De acordo com o aumento da malignidade de lesão, ocorre um aumento de expressão pelas células de origem epitelial, bem como por células do microambiente tumoral, como fibroblastos e macrófagos.

A Trombospondina1 é expressa principalmente em tecido epitelial, com leve intensidade em endotélio e em fibroblastos. Com o aumento da malignidade da lesão, torna-se menos evidenciada no endotélio, porém mais intensa em células do microambiente tumoral.

Referências

ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 6, p. 464-478, 2007.

AKHTER, M. et al. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, India, v. 15, n. 2, p. 168-176, 2011.

ALFIERI, A. et al. Angiopoietin-1 regulates microvascular reactivity and protects the microcirculation during acute endothelial dysfunction: Role of eNOS and VE-cadherin. **Pharmacological Research**, v. 80, p. 43-51, 2014.

AMAGASA, T.; YAMASHIRO, M.; UZAWA, N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 1, p. 5-14, 2011.

ANISIMOV, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor-Angiopoietin Chimera With Improved Properties for Therapeutic Angiogenesis. **Circulation**, v. 127, n. 4, p. 424-434, 2013.

ARNAOUTAKIS, D. et al. Recurrence patterns and management of oral cavity premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 49, n. 8, p. 814-817, 2013.

BARNES, L.; ORGANIZATION, W. H.; CANCER, I. A. F. R. O. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. IARC Press, 2005.

BONNEFOY, A.; MOURA, R.; HOYLAERTS, M. F. Thrombospondins: from structure to therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 713-727, 2008.

BRIDGES, E. M.; HARRIS, A. L. The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 10, p. 1183-1191, 2011.

BRUNCKHORST, M. K. et al. Angiopoietins Promote Ovarian Cancer Progression by Establishing a Procarcinogenic Microenvironment. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 8, p. 2285-2296, 2014.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375-381, 1992.

BRYNE, M., KOPPANG, HS, LILLEN R, KJERHEIM A. MALIGNANCY GRADING OF THE DEEP INVASIVE MARGINS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS HAS HIGH PROGNOSTIC

VALUE. **JOURNAL OF PATHOLOGY**, v. vol 166, p. 375-381, 1992.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-936, 2005.

CARNELIO, S. et al. A Brief Review of Common Oral Premalignant Lesions with Emphasis on Their Management and Cancer Prevention. **The Indian Journal of Surgery**, India, v. 73, n. 4, p. 256-261, 2011.

CARRERAS-TORRAS, C.; GAY-ESCODA, C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 20, n. 3, p. e305-e315, 2015.

CHIEN, C.-Y. et al. Angiopoietin-1 and -2 expression in recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Journal of Surgical Oncology**, v. 97, n. 3, p. 273-277, 2008.

CLYDESDALE, G. J.; DANDIE, G. W.; MULLER, H. K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. **Immunol Cell Biol**, v. 79, n. 6, p. 547-568, 2001.

DE LIMA, P. O. et al. Hypoxic Condition and Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 34, n. 2, p. 605-612, 2014.

DE PALMA, M.; NALDINI, L. Angiopoietin-2 TIEs Up Macrophages in Tumor Angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 16, p. 5226-5232, 2011.

DETMAR, M. Tumor Angiogenesis. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 5, n. 1, p. 20-23, 2000.

DIONNE, K. R. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 3, p. 503-515, 2015.

EKLUND, L.; SAHARINEN, P. Angiopoietin signaling in the vasculature. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 9, p. 1271-1280, 2013.

EL-KENAWI, A. E.; EL-REMESSY, A. B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 4, p. 712-729, 2013.

EMEUS, I. et al. Adenosine stimulates angiogenesis by up-regulating production of thrombospondin-1 by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 1, p. 9-18, 2015.

FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. Angiopoietins in angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 328, n. 1, p. 18-26, 2013.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.

GACCHE, R. N.; MESHAM, R. J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, n. 2, p. 333-354, 2013.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1110-1119, 2013.

HAO, N.-B. et al. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 948098, 2012.

HAYASHIDO, Y. et al. Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. **International journal of molecular medicine**, v. 12, n. 4, p. 447-452, 2003.

HILLBERTZ, N. S. et al. Viral and Molecular Aspects of Oral Cancer. **Anticancer Research**, v. 32, n. 10, p. 4201-4212, 2012.

HOFF, P. M.; MACHADO, K. K. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 7, p. 825-833, 2012.

JAYACHANDRAN, A. et al. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5782-5797, 2014.

JERJES, W. et al. The effect of tobacco and alcohol and their reduction/cessation on mortality in oral cancer patients: short communication. **Head & Neck Oncology**, v. 4, p. 6-6, 2012.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. H. K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology** 2000, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.

KAUR, S.; BAJWA, P. A 'tête-à-tête' between cancer stem cells and endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 2, p. 115-121, 2014.

KHAN, A. A. et al. Signaling Network Map of Endothelial TEK Tyrosine Kinase. **Journal of Signal Transduction**, v. 2014, p. 173026, 2014.

KLOZAR, J. et al. Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 160, n. 11-12, p. 305-309, 2010.

KOH, G. Y. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2013.

KOONTONGKAEW, S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Journal of Cancer**, Sydney, v. 4, n. 1, p. 66-83, 2013.

KUMAR, A. et al. How should we manage oral leukoplakia? **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 5, p. 377-383, 2013.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.

LAWLER, P. R.; LAWLER, J. Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 5, p. a006627, 2012.

LI, C. et al. Angiopoietin-2 expression is correlated with angiogenesis and overall survival in oral squamous cell carcinoma. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, p. 1-10, 2013.

LI, H. et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 13, p. 198, 2015.

LIU, Y.-T. et al. Polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene is related to oral cancer and lymph node metastasis in male betel quid chewers. **Oral Oncology**, v. 48, n. 12, p. 1257-1262, 2012.

LOPEZ-DEE, Z.; PIDCOCK, K.; GUTIERREZ, L. S. Thrombospondin-1: Multiple Paths to Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 296069, 2011.

LOUGHNA, S.; SATO, T. N. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. **Matrix Biology**, v. 20, n. 5–6, p. 319-325, 2001.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Exocyclic DNA adducts: Implications in mutagenesis and carcinogenesis. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

MAROCCHIO, L. S. et al. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 2, p. 267-273, 2010.

METHENY-BARLOW, L. J.; LI, L. Y. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. **Cell Res**, v. 13, n. 5, p. 309-317, 2003.

MONK, B. J. et al. Anti-angiopoietin therapy with trebananib for recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 8, p. 799-808, 2014.

MUTHU RAMA KRISHNAN, M. et al. Structural markers for normal oral mucosa and oral sub-mucous fibrosis. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 312-320, 2010.

PATEL, A. S. et al. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. **EMBO Molecular Medicine**, Weinheim, v. 5, n. 6, p. 858-869, 2013.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. TNM Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 4, p. 242-258, 2005.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873-887, 2011.

QIN, Q. et al. Effect and Mechanism of Thrombospondin-1 on the Angiogenesis Potential in Human Endothelial Progenitor Cells: An In Vitro Study. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 9, n. 2, p. e88213, 2014.

RESOVI, A. et al. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. **Matrix Biology**, v. 37, p. 83-91, 2014.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 2014.

ROODINK, I.; LEENDERS, W. P. J. Targeted therapies of cancer: Angiogenesis inhibition seems not enough. **Cancer Letters**, v. 299, n. 1, p. 1-10, 2010.

ROSCA, E. V. et al. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1101-1116, 2011.

SASAHIRA, T.; KIRITA, T.; KUNIYASU, H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 431-436, 2014.

SAWAZAKI-CALONE, I. et al. The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. **Oral Diseases**, v. 21, n. 6, p. 755-761, 2015.

SEOK, S. H. et al. Angiopoietin-1 elicits pro-inflammatory responses in monocytes and differentiating macrophages. **Molecules and cells**, v. 35, n. 6, p. 550-556, 2013.

SHOJAEI, F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: Current challenges and future perspectives. **Cancer Letters**, v. 320, n. 2, p. 130-137, 7/28/ 2012.

SZABO, C. Editorial: Old dog, new tricks: proangiogenic effect of adenosine via stimulation of thrombospondin-1 in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 1, p. 3-5, 2015.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. **Journal of Oncology**, v. 2011, p. 603740, 2011.

TSANTOULIS, P. K. et al. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 43, n. 6, p. 523-534, 2007.

VAIRAKTARIS, E. et al. Angiotensinogen polymorphism is associated with risk for malignancy but not for oral cancer. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3 A, p. 1675-1679, 2008.

VAN DER WAAL, I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 19, n. 4, p. e386-e390, 2014.

VASUDEV, N.; REYNOLDS, A. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 471-494, 2014.

WANG, T. N. et al. The effect of thrombospondin on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. **The American Journal of Surgery**, v. 170, n. 5, p. 502-505, 1995.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. **International Dental Journal**, v. 60, n. 1, p. 7-30, 2010.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1359-1370, 2011.

WELTI, J. et al. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3190-3200, 2013.

WENIG, B. M. Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract: Precursors and Problematic Variants. **Mod Pathol**, v. 15, n. 3, p. 229-254, 2002.

WILLIAM JR, W. N. Oral premalignant lesions: Any progress with systemic therapies? **Current Opinion in Oncology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2012.

WILLIAM, W. N. J. Oral premalignant lesions: any progress with systemic therapies? **Current Opinion in Oncology**, v. 24, n. 3, p. 205-210, 2012.

YAO, L. et al. Thrombospondin-1 expression in oral squamous cell carcinomas: correlations with tumor vascularity, clinicopathological features and survival. **Oral Oncology**, v. 36, n. 6, p. 539-544, 2000.

YARDIMCI, G. et al. Precancerous lesions of oral mucosa. **World Journal of Clinical Cases : WJCC**, v. 2, n. 12, p. 866-872, 2014.

YOO, S. Y.; KWON, S. M. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 127170, 2013.

ZAREI, M. R.; CHAMANI, G.; AMANPOOR, S. Reactive hyperplasia of the oral cavity in Kerman province, Iran: A review of 172 cases. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 4, p. 288-292, 2007.

ZULATO, E. et al. Metabolic effects of anti-angiogenic therapy in tumors. **Biochimie**, v. 94, n. 4, p. 925-931, 2012.