



ARTIGO ORIGINAL

## Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx<sup>☆,☆☆</sup>

Rodrigo Gonzalez Bonhin\*, Vanessa Brito Campoy Rocha, Guilherme Machado de Carvalho, Alexandre Caixeta Guimarães, Agrício Nubiato Crespo, Carlos Takahiro Chone, Eliane M.I. Amstalden

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Recebido em 15 de junho de 2013; aceito em 24 de agosto de 2014

### KEYWORDS

Squamous cell carcinoma of larynx;  
VEGF;  
Immunohistochemistry;  
Cervical lymphatic metastases

### Abstract

**Introduction:** Squamous cell carcinoma is the most common neoplasm of the larynx, and its evolution depends on tumor staging. Vascular endothelial growth factor is a marker of angiogenesis, and its expression may be related to increased tumor aggressiveness, as evidenced by the presence of cervical lymphatic metastases.

**Objectives:** To evaluate the expression of the vascular endothelial growth factor marker in non-glottic advanced squamous cell carcinoma of the larynx (T3/T4) and correlate it with the presence of cervical lymph node metastases.

**Methods:** Retrospective clinical study and immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor through the German scale of immunoreactivity in products of non-glottic squamous cell carcinomas.

**Results:** This study analyzed 15 cases of advanced non-glottic laryngeal tumors (T3/T4), four of which exhibited cervical lymphatic metastases. There was no correlation between vascular endothelial growth factor expression and the presence of cervical metastases.

**Conclusion:** Although vascular endothelial growth factor was expressed in a few cases, there was no correlation with the spread of cervical lymph metastases.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.08.016>

\* Como citar este artigo: Bonhin RG, Rocha VBC, de Carvalho GM, Guimaraes AC, Crespo AN, Chone CT, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81:58-62.

\*\* Instituição: Departamento de Otorrinolaringologia, Cabeça e Pescoço, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: bonhin@yahoo.com (R.G. Bonhin).

**PALAVRAS-CHAVE**

Carcinoma epidermoide de laringe; VEGF; Imunohistoquímica; Metástase

**Correlação entre expressão do fator de crescimento endotelial e presença de metástase linfática nos carcinomas epidermóides avançados de laringe****Resumo**

**Introdução:** O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais frequente da laringe e seu prognóstico depende do estadiamento. A progressão da doença está relacionada a fatores intrínsecos celulares do câncer, não conhecidos. O VEGF (vascular endothelial growth factor) é um marcador de angiogênese e sua expressão pode estar relacionada a uma maior agressividade tumoral, evidenciada pela presença de metástases linfáticas cervicais.

**Objetivos:** Avaliar a expressão do marcador VEGF em carcinoma de células escamosas da laringe avançados (T3/T4), não glóticos e correlacionar quanto à presença de metástases linfáticas cervicais.

**Método:** Estudo clínico retrospectivo de análise imunohistoquímica do VEGF através da escala Germânica de imunorreatividade em produtos de carcinomas epidermóides não glóticos.

**Resultados:** Analisados 15 casos de tumores avançados de laringe (T3/T4) não glóticos, sendo sete com presença de metástases linfáticas cervicais. Não houve correlação entre a expressão do VEGF e a presença de metástases cervicais.

**Conclusão:** O VEGF foi pouco expressado nos casos estudados e não foi observada sua correlação com a disseminação de metástase linfática cervical.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

**Introdução**

A angiogênese é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos capilares, originados de uma vasculatura pré-existente. Este processo é essencial para prover nutrientes e oxigênio, assim como fatores de crescimento que sustentem a função celular e sua sobrevivência. Assim sendo, ela está relacionada com o crescimento tumoral e com o desenvolvimento de metástases.<sup>1,2</sup>

Na angiogênese ocorre uma interação complexa entre as células endoteliais, a matriz extracelular proteica e os fatores solúveis existentes no plasma. As células endoteliais saem do seu estado quiescente quando estimuladas pelo fator VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e iniciam os seguintes passos: dissolução da membrana basal; migração e proliferação das células endoteliais; formação de tubos capilares; maturação; e sobrevivência dos novos vasos formados. Dessa forma, garante-se o aporte sanguíneo necessário para a evolução neoplásica.<sup>1,2</sup>

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais frequente da laringe, e seu prognóstico depende do tamanho da lesão, do nível de invasão local, disseminação cervical linfática e existência de metástases à distância.<sup>1,3</sup>

Histologicamente, os carcinomas epidermóides da laringe e da hipofaringe são semelhantes aos de outras regiões, sendo classificados em diferentes graus de diferenciação pela proliferação neoplásica de células escamosas e pelo caráter infiltrativo. Na dependência do poder de queratinização e atipias celulares são graduados em bem, moderadamente ou pouco diferenciados.<sup>3</sup>

O sistema linfático da região glótica é escasso, o que diminui a característica metastática dos tumores que se desenvolvem nesta região. As regiões supraglótica e infraglótica apresentam drenagem linfática rica, sendo a drenagem da região supraglótica principalmente para linfonodos da cadeia júbulo-carotídea alta e para linfonodos da cadeia júbulo-

lo-carotídea média (em menor quantidade), e a infraglótica tende a ser isolada para um único lado, para os linfonodos júbulo-carotídeos médio e inferiores, podendo drenar para a cadeia do mediastino anterossuperior.<sup>3</sup> Por tal motivo, optamos por excluir deste estudo os tumores glóticos.

Em busca de tratamento para estes tumores, estudos de terapias-alvo e novos quimioterápicos crescem e ganham importância na literatura. Assim como o cetuximab, anticorpo monoclonal que bloqueia o fator de crescimento endotelial (EGFR), em uso para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, o bevacizumab e outros anticorpos monoclonais recombinantes anti-VEGF vêm demonstrando resultados promissores.<sup>4,5</sup>

Estes anticorpos ligam-se às isoformas do VEGF com alta afinidade, e impedem que a citocina faça ligação com o receptor das células endoteliais e desencadeie o processo de angiogênese. O uso dos anticorpos monoclonais inibidores da angiogênese para tratamento de câncer colorretal, de rim e de pulmão já está aprovado pelo FDA. Para câncer de laringe/cabeça e pescoço encontra-se em estudo.<sup>4,5</sup>

Considerando que o VEGF tem um importante papel na angiogênese tumoral e que este fator está relacionado com a formação, progressão e metástase tumoral, sua expressão pode estar relacionada a uma maior agressividade tumoral, evidenciada por uma disseminação metastática cervical.<sup>2</sup>

Este estudo teve por objetivo de avaliar a expressão do marcador VEGF em carcinoma de células escamosas da laringe não glóticos avançados (T3/T4) e correlacionar quanto à presença ou ausência de metástase linfática cervical.

**Método**

Trata-se de um estudo clínico retrospectivo, realizado com uma amostra obtida por um corte transversal em uma coorte histórica, usando materiais provenientes (peças cirúrgi-

cas) de cirurgias de ressecção de carcinoma de células escamosas de laringe não glótica em hospital universitário terciário especializado, durante um período determinado de 10 anos. Os procedimentos realizados pelos pacientes foram hemi-laringectomias ou laringectomias totais, com respectivas linfadenectomias.

Os pacientes foram divididos pela presença ou ausência de metástases cervicais e pelo estadiamento clínico-cirúrgico. Os casos de tumores de carcinoma de células escamosas de laringe não glótica e hipofaringe foram obtidos no banco de tumores do Depto. de Anatomia Patológica de um hospital terciário. Destes, foram selecionados 15 casos de tumores avançados de laringe não glóticos, sendo três casos de tumores da base da língua, dez de tumores da supraglote e dois de hipofaringe/seio piriforme.

### Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa os tumores cujos blocos de parafina foram localizados e continham material suficiente para novos cortes; e existência dos dados necessários para estadiamento da lesão quanto aos critérios de topografia do tumor, tamanho da lesão, nível de invasão em tecidos adjacentes, comprometimento linfonodal e metástase à distância. Os dados clínicos e do estadiamento tumoral foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes.

Todos os casos que não estavam de acordo com o citado acima foram excluídos.

### Análise imuno-histoquímica

Para os exames imuno-histoquímicos foi utilizado o método avidinabiotinaperoxidase e o anticorpo VEGF (tipo IgG1, diluição 1:100, marca Santa Cruz, pré-tratado com tampão de citrato).

Foram feitos controles positivos e negativos do marcador, com a finalidade de compará-los com os casos estudados. Como controle positivo, utilizou-se tecido linfoide (orientação do fabricante).

A leitura das lâminas foi feita de forma randomizada, por um investigador que não tinha o conhecimento do diagnóstico prévio dado pelo patologista, nem o conhecimento do status clínico do paciente, de forma comparativa com os controles positivos e negativos. Fotografias digitalizadas em grande aumento (400x) foram feitas das áreas altamente reativas (*hot spots*), com a utilização de máquina fotográfica Nikon COOLPIX Câmera 995. Após isso, as imagens foram enviadas ao computador para análise histológica, que utilizou o software Imagelab 2000.

Todos os parâmetros foram avaliados de forma cega.

Finalmente, os achados histológicos e imuno-histoquímicos foram correlacionados com o estadiamento TNM [Classificação TNM- UICC-AJCC (2010)].<sup>6</sup>

A graduação da expressão do VEGF foi baseada na Escala Germânica de Imunorreatividade. Esta consiste na multiplicação do coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador vs. o coeficiente de porcentagem de células positivas.

O coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador foi graduado de 0-3, assim caracterizado: 0 - ausência de coloração; 1 - fracamente corado; 2 - moderadamente corado; 3 - fortemente corado.

Para a obtenção do coeficiente de porcentagem de células positivas, foi seguida a seguinte sequência: foram contados o número de células positivas (coradas) e negativas (não coradas), em um espaço amostral de no mínimo 500 células, e estratificado da seguinte forma: coeficiente 0 se ausência de coloração, coeficiente 1 se 1%-10% de positividade, coeficiente 2 se 11%-50% de positividade, coeficiente 3 se 51%-80% de positividade e coeficiente 4 se 81%-100% de positividade.

O valor final da Escala Germânica de Imunorreatividade (coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador X coeficiente de porcentagem de células positivas) varia de 0-12, sendo estratificado: 0 (negativa), 1-4 (fraca), 5-8 (moderada) e 9-12 (forte). Para facilitar a análise os casos negativos/fracos, foram considerados como grupo 1, e os casos moderados/fortes como grupo 2.

### Análise estatística

Após agrupamento dos dados, foram feitas as análises estatísticas com o software IBM SPSS Statistics® utilizando teste de Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher.

Para simplificação e melhor analisar os dados, estes foram agrupados da seguinte forma:

- Escala Germânica de Imunorreatividade:  
Negativa e fraca - Grupo 1  
Moderada e Forte - Grupo 2
- Índice de proliferação celular:  
Baixa e leve proliferação celular - Grupo 1  
Moderada e alta proliferação celular - Grupo 2
- TNM (Classificação TNM- UICC-AJCC - 2010)<sup>6</sup>  
T1 e T2 - Grupo 1 / T3 e T4 - Grupo 2  
N0 - Grupo 0 / N1, N2 e N3 - Grupo 1

### Aspectos éticos

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (485/11).

### Resultados

Foram avaliados 15 casos, sendo quatro com metástases cervicais presentes.

O estadiamento destes pacientes, através do TNM (2010), está descrito na tabela 1. Observa-se que apenas quatro dos 15 casos apresentavam metástases cervicais presentes. Na tabela 1 ainda encontra-se detalhada a distribuição dos quatro casos com metástase cervical, de acordo com o T.

A tabela 2 mostra a expressão do VEGF nos casos estudados, sendo considerados como grupo 1 os que tiveram expressão negativa ou fraca, e grupo 2 os com moderada ou

**Tabela 1** Distribuição dos 15 pacientes de acordo com o estadiamento TNM

	T3	T4
N0	4	7
N1/N2/N3	2	2

**Tabela 2** Tabela com a distribuição dos grupos 1 e 2 (expressão do VEGF) nos 15 casos, sua correlação com as presença de metástases cervicais e análise estatística realizada

	n	NO	N1/N2/N3
Grupo 1 (negativo/fraca expressão VEGF)	11	7	4
Grupo 2 (moderada/forte expressão VEGF)	4	4	0
VEGF vs NO ou N1/N2/N3			
Qui-quadrado	0,159		
Teste Exato de Fisher	0,516		

VEGF, vascular endothelial growth fator.

forte expressão, de acordo com a Escala Germânica. A superexpressão do VEGF em células epiteliais de carcinomas escamosos foi observada em apenas 26,6% dos casos estudados.

A tabela 2 ainda aponta a correlação da expressão do VEGF, nos grupos 1 e 2, de acordo com a presença ou ausência de metástase linfática cervical, com p de 0,363.

Não houve correlação entre a superexpressão deste marcador com a presença de metástase linfonodal cervical ( $p = 0,159$ ).

## Discussão

Na literatura, trabalhos que avaliaram tumores de cabeça e pescoço, que incluíram não somente carcinomas de células escamosas de laringe (glóticos e não glóticos), mas também de cavidade oral e faringe, relatam haver um aumento de VEGF correlacionado com aumento da angiogênese, com a progressão neoplásica e com o prognóstico, sendo que as análises levaram em consideração a positividade do marcador, independentemente da sua intensidade.<sup>1,2,7-9</sup> Há apenas um estudo recente que aborda especificamente o câncer de laringe e sua relação com VEGF. Nesse caso, a positividade deste marcador foi superior a 72%,<sup>10</sup> diferentemente do resultado aqui encontrado, talvez pelo pequeno número de casos de nossa amostra.

Há divergências entre os autores quanto à correlação entre expressão de VEGF com a presença de metástases linfonodais e de metástases a distância. Uma vertente encontrou em seus estudos resultados positivos entre expressão de VEGF, presença de metástases linfonodais cervicais e metástases a distância.<sup>2,8,9,11</sup>

Já a meta-análise de Panayiotis A. et al. afirma que o VEGF tem correlação com pior sobrevida em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; porém, a correlação da superexpressão de VEGF com a presença de metástases linfonodais/metástases a distância está longe de ser bem estabelecida.<sup>12</sup> Boonkitticharoen V. também não encontrou correlação entre este marcador e metástases.<sup>13</sup>

Um estudo asiático recente demonstrou que há íntima relação da expressão VEGF-C/VEGFR-3 com metástases linfonodais em carcinomas espinocelulares de laringe. A expressão desses marcadores apenas foi positiva na análise de metástases cervicais, e não se relacionaram com a idade, sexo, estágio T ou localização primária da lesão laringea.<sup>14</sup>

O anticorpo contra receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR) já é aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration) há alguns anos para a terapia do carcinoma de cabeça e pescoço. Entretanto, seu uso em pacientes com recorrência tumoral e/ou doença metastática tem demonstrado pouca eficácia. O VEGF tem sido implicado como um possível mecanismo de resistência para a terapia anti-EGFR. Dessa forma, ensaios clínicos recentes buscam estudar o uso de drogas anti-EGFR em associação com anticorpos anti-VEGF (bevacizumab), combinação esta que tem sido bem tolerada pelos pacientes (estudos de fase I/II).<sup>15-17</sup>

Atualmente, diversos ensaios clínicos em fase II estudam o papel do bevacizumab em tumores de cabeça e pescoço, incluindo a sua combinação com cetuximab, cisplatina e radioterapia para câncer não metastático em estadio III / IV; com erlotinib em doença locorregionalmente avançada e/ou metastática; e com cetuximab, docetaxel e cisplatina (indução) seguido por cetuximab, cisplatina e radioterapia na doença locorregionalmente avançada não tratada anteriormente.<sup>18</sup>

A emergência deste tratamento promissor traz consigo importantes questões. Com indicações amplas, o uso de indiscriminado do bevacizumab pode desenvolver resistência. Assim, estudos têm buscado definir e validar biomarcadores da sua eficiência. Até agora, os genótipos específicos do VEGF e a hipertensão arterial (agravada ou induzida pelo tratamento) parecem estar relacionados a uma melhor resposta.<sup>19</sup> Outros marcadores, como o CD105, CD34 e CD31, relacionados ao processo de angiogênese, podem ser úteis na identificação de pacientes candidatos a um tratamento antineoplásico mais agressivo, incluindo o uso dos anticorpos monoclonais.<sup>20</sup>

Há autores que acreditam na possibilidade de a regulação da expressão do VEGF ser modulada pelo microRNA-206, e esta via pode ser trabalhada no futuro para uma terapia anticâncer relacionada com esse marcador tumoral.<sup>21</sup>

Apesar de não termos observado a correlação do VEGF com metástase linfática cervical, a terapia-alvo vem demonstrando resultados promissores para tratamento de câncer em cabeça e pescoço.<sup>22</sup>

## Conclusão

O VEGF foi pouco expressado, e não foi observada sua correlação com a disseminação de metástases linfáticas cervicais em nossa amostra (15 casos).

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

- Nie D, Honn KV. Eicosanoid regulation of angiogenesis in tumors. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30:119-25.
- Sappayatosok K, Maneerat Y, Swadison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinicopathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14:E319-24.

3. Altemani AMAM, Amstalden EMI, Bogliolo. *Patologia*. 8ª ed. Guanabara Koogan; 2009. Diagnostic histopathology of tumors. 3ª ed. Elsevier; 2007. p. 158-65.
4. Mohamed A, El-Rayes B, Khuri FR, Saba NF. Targeted therapies in metastatic esophageal cancer: advances over the past decade. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;91:186-96, <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.01.010>.
5. Dorsey K, Agulnik M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs*. 2013;73:315-25.
6. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *Cancer staging manual*. Em: American Joint Committee on Cancer (AJCC). 7ª ed. New York: Springer; 2010.
7. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sard I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implication for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2001;3:53-61.
8. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2002;33:708-14.
9. Lim SC, Park SY, Do NY. Correlation of cyclooxygenase-2 pathway and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2003;10:1073-9.
10. Sullu Y, Gun S, Atmaca S, Karagoz F, Kandemir B. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Diagn Pathol*. 2010;5:35.
11. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;18:153-60.
12. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JPA. Factor immunohistochemical expression in head and neck prognostic significance of vascular endothelial growth squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1434-40.
13. Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphikul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, et al. Vascular endothelial growth factor A and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134:1305-11.
14. Wang Z, Chen Y, Li X, Xu L, Ma W, Chang L, et al. Expression of VEGF-C/VEGFR-3 in human laryngeal squamous cell carcinomas and its significance for lymphatic metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:27-31.
15. Cohen EE, Davis DW, Karrison TG, Seiwert TY, Wong SJ, Nattan S, et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol*. 2009;10:247-57.
16. Argiris A, Kotsakis AP, Hoang T, Worden FP, Savvides P, Gibson MK, et al. Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 2013;24:220-5.
17. Yoo DS, Kirkpatrick JP, Craciunescu O, Broadwater G, Peterson BL, Carroll MD, et al. Prospective trial of synchronous bevacizumab, erlotinib and concurrent chemoradiation in locally advanced head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:1404-14.
18. Cohen RB. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer Treat Rev*. 2014;40:567-77.
19. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol*. 2010;11:1172-83.
20. Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2012;132:574-82.
21. Zhang T, Liu M, Wang C, Lin C, Sun Y, Jin D. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. *Anticancer Res*. 2011;31:3859-63.
22. Argiris A, Kotsakis AP, Kim S, Worden FP, Savvides P, Gibson MK, et al. Phase II trial of cetuximab (C) and bevacizumab (B) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: final results. *J Clin Oncol*. 2011;29 Suppl, abstr 5564.