

# Expressão imunoistoquímica da endogлина (CD105) e do fator de von Willebrand em carcinoma epidermoide oral e sua relação com parâmetros clinicopatológicos

## *Immunohistochemical expression of endoglin (CD105) and von Willebrand factor in oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinicopathological parameters*

Rodrigo Porpino Mafrá<sup>1</sup>, Marianna Sampaio Serpa<sup>1</sup>, Salomão Israel Monteiro Lourenço Queiroz<sup>1</sup>, Ruth Lopes de Freitas Xavier Lima<sup>2</sup>, Lélia Batista de Souza<sup>1</sup>, Leão Pereira Pinto<sup>1</sup>

### Resumo

**Contexto:** A angiogênese tem sido associada à progressão de neoplasias malignas e, embora haja estudos acerca de marcadores angiogênicos no carcinoma epidermoide oral (CEO), existem resultados conflitantes na literatura. **Objetivos:** Avaliar a expressão imunoistoquímica do CD105 e do fator de von Willebrand (FvW) em CEO e sua relação com parâmetros clínicos do tumor. **Métodos:** A imunoeexpressão dos referidos biomarcadores foi analisada em 30 casos de CEO e correlacionada a parâmetros clínicos do tumor (idade e sexo dos pacientes, localização anatômica e estadiamento clínico Tumor, Nodo e Metástase, TNM). **Resultados:** A imunomarcação com o anticorpo anti-FvW foi mais efetiva que a do CD105 no CEO. No que concerne à localização anatômica, o assoalho bucal e a região retromolar apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos índices angiogênicos ( $p = 0,004$ ), determinados pela técnica de contagem microvascular (MVC). Não houve relação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico TNM e os índices angiogênicos, com os dois biomarcadores. **Conclusões:** Com base nos achados deste estudo, sugere-se um envolvimento da neoformação vascular na carcinogênese oral, embora não tenha sido evidenciada associação significativa com o estágio clínico da lesão.

**Palavras-chave:** carcinoma de células escamosas; neovascularização patológica; patologia bucal.

### Abstract

**Background:** Angiogenesis has been linked with progression of malignant neoplasms and although studies have been conducted investigating angiogenic markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC), contradictory results are reported in the literature. **Objectives:** To evaluate immunohistochemical expression of CD105 and von Willebrand factor (vWF) in OSCC and their relationships with clinical parameters of the tumors. **Methods:** Immunoeexpression of these biomarkers was analyzed in 30 cases of OSCC and correlated with clinical parameters of the tumors (age and sex of patients, anatomic site and Tumor, Node and Metastasis clinical staging [TNM]). **Results:** In OSCC specimens, immunostaining was more effective using the anti-vWF antibody than using the anti-CD105 antibody. Angiogenic indices, determined by microvascular count (MVC) technique, were different for the floor of the mouth and the retromolar region, with statistical significance ( $p = 0.004$ ). There were no statistically significant relationships between results for the two biomarkers and TNM clinical staging or angiogenic indices. **Conclusions:** The findings of this study suggest that vascular remodeling is involved in oral carcinogenesis, although there was no evidence of a significant association with clinical stage of lesions.

**Keywords:** squamous cell carcinoma; pathological neovascularization; oral pathology.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Departamento de Odontologia, Natal, RN, Brasil.

<sup>2</sup> Hospital da Aeronáutica de Natal, Natal, RN, Brasil.

Fonte de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflito de interesse: Os autores declararam não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: Outubro 16, 2015. Aceito em: Dezembro 11, 2015.

O estudo foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma das neoplasias malignas mais frequentes em cabeça e pescoço<sup>1</sup>. O Brasil é um dos países com maior incidência, sendo estimados, para o ano de 2014, 11.280 novos casos em homens e 4.010 em mulheres<sup>2</sup>. Entre as diferentes formas de câncer oral, o carcinoma epidermoide oral (CEO) representa 90 a 95% dos casos, sendo considerado um problema de saúde pública devido aos seus altos índices de mortalidade, atribuídos principalmente à resposta variada ao tratamento e à falha no diagnóstico precoce<sup>3,4</sup>.

Em função disso, diversos estudos acerca do uso de biomarcadores vêm sendo conduzidos, visando a uma melhor compreensão do comportamento biológico do CEO. Nessa perspectiva, a angiogênese tem sido associada à progressão de neoplasias malignas, visto que contribui para o crescimento tumoral e permite uma propagação hematogênica das células malignas, por meio de mecanismos celulares regulados por fatores angiogênicos. Entre esses fatores, incluem-se a endogлина e o fator de von Willebrand (FvW)<sup>5,6</sup>.

A endogлина, também conhecida como CD105, consiste em uma proteína transmembranar componente do receptor do fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF $\beta$ R), que é altamente expressa em células endoteliais vasculares humanas. A superexpressão do CD105 tem sido demonstrada na vasculatura tumoral, sendo sugerido o papel da referida molécula como um marcador de células endoteliais em proliferação<sup>7,8</sup>. O FvW é uma glicoproteína produzida exclusivamente pelas células endoteliais e pelos megacariócitos, sendo a sua imunexpressão avaliada rotineiramente para a identificação de vasos sanguíneos em cortes histológicos. Tem sido relatado que, em muitos tumores sólidos, ocorre imunomarcção intensa para o FvW, que é correlacionada com prognóstico desfavorável<sup>9,10</sup>.

Embora haja estudos acerca de marcadores angiogênicos no CEO, existem resultados conflitantes na literatura<sup>8,11-15</sup>. Sendo assim, a presente pesquisa teve o objetivo de analisar a expressão imunistoquímica do CD105 e do FvW em uma série de casos de CEO, determinando se os índices angiogênicos apresentam correlação com parâmetros clinicopatológicos do tumor. Pretende-se com isso, contribuir para uma maior compreensão do comportamento biológico

do CEO, bem como avaliar o papel das proteínas estudadas como marcadores de progressão do tumor.

## MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram selecionados 30 espécimes de CEO, arquivados em um hospital de referência em oncologia da cidade de Natal, RN, Brasil. Todos os pacientes foram tratados por excisão cirúrgica, sem radioterapia ou quimioterapia prévia. As informações relativas a idade, sexo, localização anatômica das lesões, estadiamento clínico Tumor, Nodo e Metástase (TNM) e presença ou ausência de metástases nodais foram obtidas dos prontuários arquivados no referido serviço. Como grupo controle, foram selecionados 10 casos de granulomas piogênicos (GPs) com localização em gengiva. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da referida instituição (parecer nº 029/2007).

A partir dos espécimes selecionados e emblocados em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3  $\mu$ m de espessura, estendidos em lâminas preparadas com adesivo à base de organossilano. Posteriormente, foram submetidos ao método da imunistoquímica, pela técnica da estreptavidina-biotina, conforme os passos descritos a seguir: desparafinização; reidratação; recuperação antigênica; bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%; incubação com os anticorpos primários, conforme descrito na Tabela 1. Entre cada etapa da técnica, o material foi imerso em solução tampão Tris, pH 7,4.

Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário e o complexo estreptavidina-biotina (LSAB + System-HRP; Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 30 minutos, a temperatura ambiente. Foi feita a revelação da reação com diaminobenzidina a 0,03% (Liquid DAB + Substrate; Dako, Carpinteria, CA, EUA), seguida de contracoloração com hematoxilina de Mayer. Em seguida, procedeu-se a desidratação e diafanização dos cortes histológicos e, por fim, montagem das lamínulas em resina *Permount*<sup>®</sup>. Cortes histológicos de GPs orais foram utilizados como controle positivo das reações com os anticorpos anti-CD105 e FvW. Como controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por albumina de soro bovino em solução salina fosfatada tamponada (PBS).

Tabela 1. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.

| Especificidade | Clone | Fabricante | Diluição | Recuperação antigênica  | Incubação       |
|----------------|-------|------------|----------|---|-----------------|
| CD105          | SN6h  | Dako       | 1:500    | Sem recuperação   | Overnight (18h) |
| FvW            | F8/86 | Dako       | 1:50     | Tripsina 0,4% + CaCl <sub>2</sub> 0,1%<br>pH 7,9; 37 °C; 60 min | Overnight (18h) |

CD105 = endogлина; FvW = fator de von Willebrand.

### Análise imunoistoquímica

O índice angiogênico dos espécimes de CEO foi determinado através da imunoposição dos biomarcadores CD105 e FvW, empregando a técnica de contagem microvascular (MVC), seguindo o método proposto por Maeda et al.<sup>16</sup>. Em cada corte histológico examinado em microscopia de luz sob aumento de 40x, foram identificados os cinco campos com maior vascularização. Em seguida, sob aumento de 200x, os vasos foram quantificados nas áreas selecionadas. Para cada espécime, a MVC foi expressa como o número médio de vasos imunomarcados por campo microscópico. No processo de contagem, as células endoteliais isoladas e os arranjos celulares endoteliais, com ou sem lúmen conspicuo e corados positivamente, foram considerados vasos unitários.

Os espécimes foram classificados, de forma qualitativa, de acordo com as categorias: 1) ausência de marcação; 2) marcação fraca; 3) marcação intensa. Quanto ao padrão de distribuição dos vasos sanguíneos, foram atribuídos os escores: 1) ausência de marcação; 2) marcação focal; 3) marcação difusa.

### Análise estatística

Os resultados foram submetidos a testes estatísticos com o auxílio do software Action 2.7. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado com o propósito de verificar possíveis diferenças na MVC, com o uso dos biomarcadores CD105 e FvW, em relação a idade, sexo e estadiamento clínico TNM. Visando a avaliar a relação entre a MVC e a localização anatômica das lesões, foi realizado o teste H de Kruskal-Wallis, com posterior avaliação por pares pelo teste U de Mann-Whitney. Para verificar possíveis associações, foram utilizados os testes de qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher. Foi estabelecido um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes estatísticos.

## RESULTADOS

### Caracterização da amostra

Conforme os dados referentes aos 30 casos de pacientes portadores de CEO estudados, metade era do sexo masculino e metade do sexo feminino. As idades variaram entre 31 a 90 anos, com média de  $64,7 \pm 14,8$  anos. A faixa etária compreendida entre 51 e 70 anos foi a mais acometida, correspondendo a 46,7% dos casos. Foram analisados espécimes de CEO de assoalho bucal, língua e região retromolar, selecionados de forma intencional, seguindo uma proporção 1:1:1. Dessa forma, os indivíduos da amostra foram classificados, conforme a localização anatômica, em três grupos, cada um destes constituído

por 10 casos (33,3%) de CEO. Com relação ao estadiamento clínico TNM, predominaram as lesões nos estágios I e II (60%).

### Análise imunoistoquímica

A reatividade celular observada para ambos os marcadores foi restrita ao citoplasma das células endoteliais perivasculares, isoladas e em grupos proliferantes, com ou sem lúmen distinto. Com relação à imunoposição do CD105, em 36,7% dos casos foi classificada como ausente, em 23,3% como focal e em 40% como difusa. Na avaliação para o FvW, a maioria (80%) foi difusa, com 16,7% sendo focal e apenas 3,3% sendo ausente. Quanto à intensidade, para o CD105, em 26,7% dos casos foi classificada como intensa, em 36,7% como ausente e em 36,7% como fraca. Para o FvW, na maioria dos casos a intensidade se apresentou como fraca (66,7%), enquanto que em 30% como intensa e em apenas 3,3% como ausente (Figuras 1 e 2). Na avaliação da relação entre os índices angiogênicos e idade, sexo

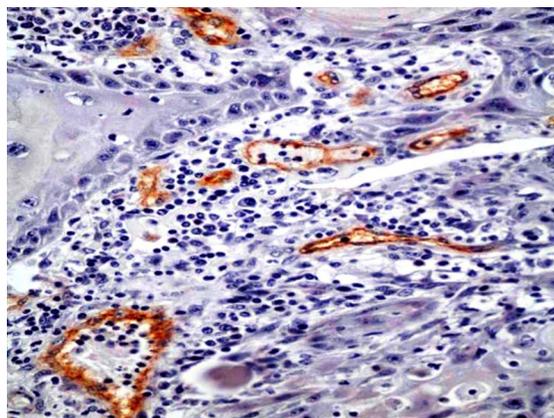


Figura 1. Fotografia demonstrando a imunoposição do CD105 nas células endoteliais do CEO. Marcação intensa e focal (LSAB, 400x).

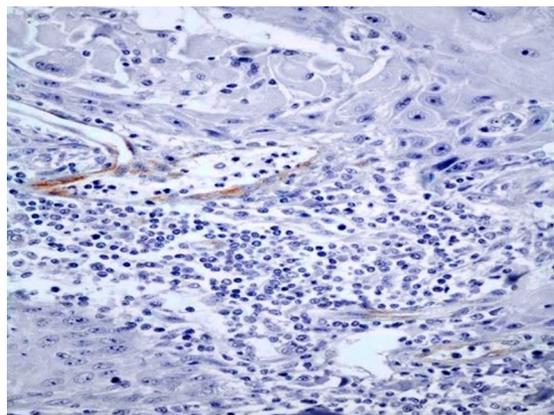


Figura 2. Fotografia demonstrando a imunoposição do FvW nas células endoteliais do CEO. Marcação fraca e focal (LSAB, 400x).

e estadiamento clínico TNM, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Na análise da localização anatômica das lesões estudadas, foi encontrada diferença significativa na imunomarcagem para o FvW (Tabela 2). Na avaliação por pares da MVC com o marcador FvW, foi verificada diferença significativa entre o assoalho bucal e a região retromolar ( $p = 0,004$ ). Contudo, nas comparações entre língua e região retromolar, bem como entre assoalho bucal e língua, não foi encontrada relação estatística ( $p = 0,151$  e  $0,112$ , respectivamente). A diferença referida na Tabela 2 é atribuída à comparação entre assoalho bucal e região retromolar. Quanto à expressão do CD105, não houve diferença significativa; porém, na avaliação por pares entre língua e região retromolar, tal diferença foi evidenciada ( $p = 0,042$ ). Não houve diferenças significativas nas comparações entre assoalho bucal e região retromolar, tampouco entre assoalho bucal e língua ( $p = 0,081$  e  $0,790$ , respectivamente).

## DISCUSSÃO

O fenômeno da angiogênese, também conhecido como neoformação vascular, consiste na formação de vasos sanguíneos a partir de outros vasos pré-existentes. Em razão desse fenômeno ser fundamental em diversos processos patológicos e fisiológicos, incluindo inflamação, reparo e crescimento tumoral, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de estimular ou inibir a angiogênese, ou mesmo quantificá-la<sup>17-19</sup>. Tendo em vista que os vasos neoformados oferecem um aporte nutricional para as células tumorais e estabelecem condições favoráveis para a disseminação metastática, alguns estudos têm buscado melhor esclarecer a relação entre a angiogênese e a progressão de neoplasias malignas<sup>6,20-22</sup>.

A respeito do CEO, considera-se que as lesões diagnosticadas em língua possuem prognóstico desfavorável, em decorrência de seu elevado potencial

de desenvolvimento de metástases linfonodais regionais, o que se deve, em parte, ao rico suprimento de vasos sanguíneos e linfáticos nesse sítio anatômico<sup>23-25</sup>. No entanto, de acordo com nossos resultados, o assoalho bucal seria a região de maior preocupação, tendo em vista os achados da MVC, tanto para CD105 como para o FvW, sendo seguida pela língua.

Em concordância com estudos prévios<sup>20,26</sup>, a presente pesquisa não constatou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o índice angiogênico e a idade, em casos de CEO. Benevenuto et al.<sup>26</sup>, embora não tenham encontrado relações estatisticamente significativas entre os índices angiogênicos e a idade dos pacientes, argumentam que não se pode desconsiderar a possibilidade de haver variações qualitativas na vascularização entre pacientes jovens e mais velhos.

Quando avaliada a imunomarcagem para os anticorpos CD105 e FvW nos casos de CEO, foi observado que as mulheres apresentaram um ligeiro aumento na contagem microvascular quando comparadas aos homens, embora não tenha sido evidenciada diferença estatisticamente significativa. Isso poderia sugerir que a angiogênese no CEO seria influenciada pelos hormônios femininos.

Neste estudo, assim como no de Shivamallappa et al.<sup>12</sup>, em relação ao estadiamento clínico TNM, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparado aos marcadores angiogênicos. Porém, conforme visto na Tabela 2, quando comparado às médias da MVC do CD105 para os casos de estágio I-II (8,9 vasos imunomarcados) e III-IV (11,7 vasos imunomarcados), foi observado que houve um discreto aumento. Isso pode sugerir que há, de fato, um aumento do número de vasos com a evolução do tumor. Eshghyar et al.<sup>6</sup> e Nair et al.<sup>8</sup> afirmam que a imunexpressão de CD105 é maior em estágios avançados do CEO do que em estágios iniciais e, ainda, que o referido marcador pode auxiliar na avaliação do potencial metastático da lesão.

Tabela 2. Avaliação dos marcadores CD105 e FvW de acordo com a localização anatômica da lesão e o estadiamento clínico TNM.

|                       | CD105 |      |          |          | P     | FvW   |      |           |          | P     |
|-----------------------|-------|------|----------|----------|-------|-------|------|-----------|----------|-------|
|                       | Média | Med  | Q25-75   | Min-Max  |       | Média | Med  | Q25-75    | Min-Max  |       |
| Localização anatômica |       |      |          |          |       |       |      |           |          |       |
| Assoalho bucal        | 16,8  | 9,6  | 0,0-32,2 | 0,0-53,6 |       | 17,5  | 18,3 | 10,8-22,2 | 7,6-29,6 |       |
| Língua                | 10,2  | 11,4 | 0,6-16,6 | 0,0-27,6 | 0,096 | 11,6  | 12,7 | 6,0-14,6  | 0,0-27,6 | 0,013 |
| Região retromolar     | 3,2   | 0,0  | 0,0-7,0  | 0,0-13,2 |       | 7,4   | 5,7  | 3,4-9,2   | 1,2-21,2 |       |
| Estágio TNM           |       |      |          |          |       |       |      |           |          |       |
| I / II                | 8,9   | 2,8  | 0,0-13,8 | 0,0-43,2 | 0,664 | 12,5  | 13,1 | 5,8-21,0  | 0,0-27,6 | 0,735 |
| III / IV              | 11,7  | 8    | 0,3-13,7 | 0,0-53,6 |       | 11,7  | 10,3 | 6,6-13,6  | 3,4-29,6 |       |

CD105 = endogлина; FvW = fator de von Willebrand; Med = mediana; Q25-75 = Quartis 25 e 75; Max = máximo; Min = mínimo.

Não há consenso na literatura sobre a designação do marcador imunistoquímico que melhor oferece resultados na avaliação da angiogênese. Diversos autores<sup>6,19,27,28</sup> afirmam que o CD105 é um excelente imunomarcador para a angiogênese. No entanto, em outros estudos<sup>11,29</sup>, o uso do anticorpo anti-FvW é recomendado para análise da vascularização. Nossos resultados sugerem que o FvW seria o marcador mais apropriado para a avaliação da angiogênese em casos de CEO, uma vez que apenas um caso teve marcação ausente para essa proteína, enquanto que onze casos não apresentaram imunomarcagem para o CD105. Foi evidenciada uma imunorreatividade granular no citoplasma das células endoteliais perivasculares, marcadas positivamente pelo anti-FvW. Segundo Mitchell e Sohoen<sup>30</sup>, isso está relacionado aos corpos de Weibel-Palade, organelas exclusivas das células endoteliais, que são responsáveis por armazenar o FvW. A imunomarcagem do FvW ocorreu com intensidade mais fraca que a verificada com o anticorpo anti-CD105, também em nível de citoplasma das células endoteliais perivasculares<sup>27,28</sup>. Frente a esse achado, pode-se sugerir que, durante a angiogênese, as células endoteliais expressam a endoglina em níveis superiores aos do FvW.

A localização anatômica é considerada um importante parâmetro relacionado à progressão e ao prognóstico do CEO<sup>24,31</sup>. Conforme verificado no presente estudo, os casos de CEO em assoalho bucal apresentaram maiores índices angiogênicos que as lesões em outros sítios, corroborando a influência da localização anatômica na agressividade do tumor.

A imunopositividade do CD105 e do FvW ocorreu na maioria dos casos estudados, o que corrobora a participação da angiogênese no desenvolvimento do CEO. Contudo, a despeito da importância desse fenômeno, os índices angiogênicos com os biomarcadores CD105 e FvW não revelaram relações significativas com o estadiamento clínico TNM. De forma semelhante, Benevenuto et al.<sup>26</sup> não encontraram diferenças significativas entre o índice angiogênico (avaliado através da expressão do FvW) e o estadiamento clínico e a gradação histológica de malignidade do CEO.

Com base nos achados do presente estudo, sugere-se que a angiogênese contribui para o desenvolvimento do CEO, embora a análise quantitativa dos vasos sanguíneos no tecido neoplásico não tenha evidenciado associação com o estágio clínico da lesão.

## ■ REFERÊNCIAS

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>. PMID:18804401.
2. Instituto Nacional de Câncer [site na internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. [citado 2015 ago 28]. <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>
3. McCullough MJ, Prasad G, Farah CS. Oral mucosal malignancy and potentially malignant lesions: an update on the epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Aust Dent J.* 2010;55(Suppl 1):61-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01200.x>. PMID:20553246.
4. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011;57(1):19-37. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x>. PMID:21781177.
5. Davey KJ, Perrier S, Ohe G, et al. Assessment of vascularity as an index of angiogenesis in periradicular granulomas. Comparison with oral carcinomas and normal tissue counterparts. *Int Endod J.* 2008;41(11):987-96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01466.x>. PMID:19133088.
6. Eshghyar N, Mohammadi N, Rahrotaban S, Motahary P, Vahedi Vaez SM. Endoglin (CD105) positive microvessel density and its relationship with lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Arch Iran Med.* 2011;14(4):276-80. PMID:21726105.
7. Dallas NA, Samuel S, Xia L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(7):1931-7. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4478>. PMID:18381930.
8. Nair S, Nayak R, Bhat K, Kotrashetti VS, Babji D. Immunohistochemical expression of CD105 and TGF-β1 in oral squamous cell carcinoma and adjacent apparently normal oral mucosa and its correlation with clinicopathologic features. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(1):35-41.
9. Schellerer VS, Mueller-Bergh L, Merkel S, et al. The clinical value of von Willebrand factor in colorectal carcinomas. *Am J Transl Res.* 2011;3(5):445-53. PMID:22046486.
10. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 2012;128(3):158-69. <http://dx.doi.org/10.1159/000339426>. PMID:22890291.
11. Souza GFM, Freitas RA, Miranda JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Ciênc Odontol Bras.* 2007;10(1):12-8.
12. Shivamallappa SM, Venkatraman NT, Shreedhar B, Mohanty L, Shenoy S. Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. *Int J Oral Sci.* 2011;3(4):216-24. <http://dx.doi.org/10.4248/IJOS11077>. PMID:22010580.
13. Bôas DS, Takiya CM, Gurgel CA, Cabral MG, Santos JN. Tumor-infiltrating macrophage and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Braz Dent J.* 2013;24(3):194-9. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201302049>. PMID:23969905.
14. Marioni G, Staffieri A, Fasanaro E, et al. The role of angiogenin in pT1-T2 tongue carcinoma neo-angiogenesis and cell proliferation: an exploratory study. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(8):606-11. <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12053>. PMID:23432607.
15. Basnaker M, Sr S, Bnvs S. Expression of Endoglin (CD-105) and microvessel density in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(9):ZC91-4. PMID:25386532.
16. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer.* 1995;72(2):319-23. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1995.331>. PMID:7543771.

17. Clapp C, Thebault S, Jezierski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1177-215. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00024.2009>. PMID:19789380.
18. Nikitenko LL. Vascular endothelium in cancer. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):223-40. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-008-0707-4>. PMID:19015885.
19. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2283-90. PMID:21737653.
20. Mărgăritescu C, Simionescu C, Mogoantă L, et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(3):321-6. PMID:18758636.
21. Cardoso SV, Souza KC, Faria PR, Eisenberg AL, Dias FL, Loyola AM. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. *BMC Cancer.* 2009;9:391.
22. Liu P, Sun YL, Du J, Hou XS, Meng H. CD105/Ki67 coexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2012;22(4):586-92. <http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e31823c36b8>. PMID:22266931.
23. Matos FR, Lima Ed, Queiroz LM, Silveira EJ. Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(7):1703-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2011.08.023>. PMID:22154400.
24. Vasconcelos MG, Mafra RP, Vasconcelos RG, Medeiros AMC, Queiroz LMG. Squamous cell carcinoma of the tongue: clinical and morphological analysis of 57 cases and correlation with prognosis. *J Bras Patol Med Lab.* 2014;50(5):359-63. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20140040>.
25. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(3):491-508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>. PMID:25979396.
26. Benevenuto TG, Nonaka CF, Pinto LP, Souza LB. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(3):291-7. <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0b013e31823277f6>. PMID:22505011.
27. Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metzke K, Altmani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Virchows Arch.* 2007;451(1):65-71. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-007-0438-z>. PMID:17593387.
28. Netto GC, Bleil CB, Hilbig A, Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology.* 2008;28(1):17-23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00825.x>. PMID:18181830.
29. Freitas TM, Miguel MC, Silveira EJ, Freitas RA, Galvão HC. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exp Mol Pathol.* 2005;79(1):79-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.02.006>. PMID:16005715.
30. Mitchell RN, Sohoen FJ. Vasos sanguíneos. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N, editores. *Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 495-536.
31. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 2007;15(4):376-83. <http://dx.doi.org/10.1177/1066896907304992>. PMID:17913944.

**Correspondência**

Rodrigo Porpino Mafra  
 Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN,  
 Departamento de Odontologia, Disciplina de Patologia Oral  
 Av. Senador Salgado Filho, 1787 – Lagoa Nova  
 CEP 59056-000 - Natal (RN), Brasil  
 Tel.: +55 (84) 3215-4138  
 E-mail: rodrigo\_pm@hotmail.com

**Informações sobre os autores**

RPM e MSS – Mestrandos em patologia oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).  
 SIMLQ – Doutorando em patologia oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).  
 RFLXL – Cirurgiã-dentista do Hospital da Aeronáutica de Natal.  
 LBS e LPP – Professores doutores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

**Contribuições dos autores**

Concepção e desenho do estudo: RFLXL, LPP  
 Análise e interpretação dos dados: RPM, MSS, SIMLQ  
 Coleta de dados: RFLXL  
 Redação do artigo: RPM, MSS  
 Revisão crítica do texto: LBS, LPP  
 Aprovação final do artigo\*: RPM, MSS, SIMLQ, RFLXL, LBS, LPP  
 Análise estatística: SIMLQ  
 Responsabilidade geral pelo estudo: LBS, LPP

\*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao J Vasc Bras.