



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Correlação de padrões vasculares na imagem de banda estreita com a densidade imuno-histológica de microvasos em lesões de pregas vocais[☆]

Anna Rzepakowska ^{a,*}, Michał Żurek ^a, Jakub Grzybowski ^b, Paweł Pihowicz ^b, Barbara Górnicka ^b, Ewa Osuch-Wójcikiewicz ^a e Kazimierz Niemczyk ^a

^a Medical University of Warsaw, Otolaryngology Department, Varsóvia, Polónia

^b Medical University of Warsaw, Department of Pathology, Varsóvia, Polónia

Recebido em 4 de maio de 2019; aceito em 22 de julho de 2019

PALAVRAS-CHAVE

Lesão intraepitelial;
Displasia;
Câncer glótico inicial;
Densidade de
microvasos;
Banda estreita;
Exame de imagem

Resumo

Introdução: A microarquitetura dos vasos mucosos e submucosos é crucial para o diagnóstico. A neoangiogênese é um parâmetro biológico confirmado que implica progressão e metástase no câncer de laringe.

Objetivo: Investigar a correlação entre as classificações de padrões vasculares por imagem de banda estreita e densidade imuno-histológica de microvasos em diferentes tipos de lesões intraepiteliais da prega vocal.

Método: A análise da densidade imuno-histológica de microvasos com o uso de anticorpos CD31 e CD34 foi feita em 77 lesões, inclusive: 20 lesões não displásicas, 20 com displasia de baixo grau, 17 com displasia de alto grau e 20 com câncer invasivo. A avaliação dos padrões vasculares com a imagem de banda estreita, de acordo com as diretrizes de classificação de Ni e da *European Laryngological Society*, foi feita antes da ressecção cirúrgica.

Resultados: O valor médio da densidade imuno-histológica de microvasos com CD31 foi o mais alto para as lesões do Tipo IV de Ni (20,55), enquanto para o padrão longitudinal e perpendicular, de acordo com a classificação da *European Laryngological Society*, foi de 12,50 e 19,45, respectivamente. O maior valor médio da densidade imuno-histológica de microvasos com CD34 foi identificado nas lesões de Ni Tipo Va (35,43) e nos padrões longitudinal e perpendicular de acordo com a classificação da *European Laryngological Society* foi de 15,12 e 30,40, respectivamente.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.07.009>

[☆] Como citar este artigo: Rzepakowska A, Żurek M, Grzybowski J, Pihowicz P, Górnicka B, Osuch-Wójcikiewicz E, et al. Correlation of narrow band imaging vascular patterns with immunohistological microvessel density in vocal fold lesions. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2021;87:137–44.

* Autor para correspondência.

E-mail: arzepakowska@wum.edu.pl (A. Rzepakowska).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

Conclusões: As alterações morfológicas microvasculares das lesões laringeas intraepiteliais observadas na endoscopia por imagem de banda estreita foram positivamente correlacionadas com os índices de angiogênese da avaliação imuno-histológica.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

Avanços tecnológicos na imagem endoscópica, inclusive a endoscopia de ampliação e imagem de banda estreita (NBI, do inglês *Narrow Band Imaging*), forneceram aos otorrinolaringologistas ferramentas clínicas para identificação de lesões laringeas intraepiteliais com displasia ou potencial maligno, com acurácia diagnóstica muito próxima à histopatologia. A NBI permite uma avaliação detalhada da morfologia e dos vasos da mucosa sem a necessidade de agentes de coloração. A microarquitetura dos vasos mucosos e submucosos é crucial para o diagnóstico. A neoangiogênese é um parâmetro biológico bem estabelecido, que implica progressão e metástase do câncer de laringe.¹ Pesquisas sobre a progressão da displasia intraepitelial para o câncer invasivo precoce no colo uterino e no esôfago também mostraram o aumento concomitante da densidade microvascular no epitélio e o grau de atipia na histopatologia.^{2,3}

Os primeiros resultados que confirmaram a eficácia do método NBI para diferenciação de lesões na laringe apareceram na literatura de língua inglesa em 2010.⁴ Piazza et al., com base em uma análise prospectiva de 279 pacientes, definiram características oncológicamente suspeitas de mucosa laringea identificadas pelo NBI: "área acastanhada bem demarcada, com manchas escuras espessas e/ou vasos sinuosos e vasos hipertróficos aferentes ramificando-se em pequenas alças vasculares no contexto da lesão". Nessa ocasião, Ni verificou, apresentou e publicou uma proposta de classificação dos padrões de vascularização da mucosa com o uso de NBI nas lesões laringeas e verificou ser uma ferramenta de avaliação eficaz.⁵

Cinco tipos de padrões vasculares, de I a V (Tipo V com subtipos: Va, Vb, Vc), foram criados, com base na escala proposta anteriormente para a avaliação por NBI das alterações no esôfago por Inoue et al.⁶ Nos cinco anos seguintes, a classificação de Ni foi a única ferramenta usada na pesquisa sobre a eficácia diagnóstica do uso de NBI na laringe. O sistema de Ni et al. é simples; entretanto, a distinção de Tipo I (normal em tamanho) e II (tamanho e densidade ampliada) para vasos longitudinais não é útil no diagnóstico diferencial de lesões pré-cancerosas e o Tipo III (vasos cobertos por leucoplasia) não traz informações adicionais. Entretanto, os seguintes tipos identificam alças vasculares perpendiculares no epitélio e parecem descrever mudanças na arquitetura dos microvasos com a progressão da histopatologia subjacente: Tipo IV (alças de pequeno tamanho, formato regular e baixa densidade), Va (alça irregular, torcida e forma espiralada, maiores em tamanho e de maior densidade), Vb (remanescentes de alça capilar com aspecto vermiforme) e Vc (tecido necrótico com remanescentes de alças capilares).

Segundo Ni et al., acredita-se que o tipo IV pela NBI corresponda à displasia de baixo grau, o tipo Va à displasia de alto grau e carcinoma *in situ* e o tipo Vb e Vc a câncer invasivo. Displasia de alto grau pode ser encontrada nas lesões do Tipo IV e câncer infiltrativo no Tipo Va, portanto não é possível estabelecer uma atribuição direta dos tipos avaliados por NBI a um grau de displasia intraepitelial ou lesão invasiva. Em 2016, o comitê de estudos de imagem laringológica endoscópica da *European Laryngological Society* (ELS) propôs uma diretriz descritiva de alterações vasculares nas lesões das cordas vocais.⁷ A versão extensa e descritiva do sistema ELS pode parecer bastante inconveniente para aplicação clínica; no entanto, para fins de aprendizagem e aquisição de experiência, parece ser a mais abrangente. Para a prática diária, a distinção geral do sistema ELS, no que se refere à direção dos vasos da mucosa (longitudinal ou perpendicular), é crucial para a diferenciação entre lesões benignas e suspeitas de displasia ou câncer invasivo.^{7,8}

Atualmente, a NBI é aceita e comumente usada em todo o mundo para o diagnóstico preciso e o seguimento de pacientes com lesões laringeas.⁹ É difícil criar um sistema de classificação perfeito, mas a coexistência das duas escalas de classificação pode dificultar a avaliação uniforme e a comparação dos resultados.

Além disso, não encontramos estudos que investigassem a correlação entre os padrões vasculares por NBI em lesões intraepiteliais da laringe e a densidade de microvasos avaliada imuno-histologicamente.

Portanto, este estudo foi criado para identificar a relação entre os dois sistemas de classificação, por meio de NBI, e a densidade vascular avaliada imuno-histologicamente nas lesões de pregas vocais.

Método

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (KB /83/2017). Todos os procedimentos feitos no estudo estavam de acordo com a Declaração de Helsinque de 1964 e suas posteriores alterações ou padrões éticos comparáveis. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo.

O estudo foi feito em 2018, pela análise retrospectiva dos registros médicos arquivados e blocos de tecido embebidos em parafina de pacientes tratados com microcirurgia laringea em nosso departamento devido a lesões hipertróficas suspeitas das pregas vocais (PV). Todos os participantes foram submetidos à avaliação da lesão por NBI antes da ressecção.

O desenho do estudo admitiu a inclusão de pacientes com diferentes graus histológicos de lesões das PV: lesões não

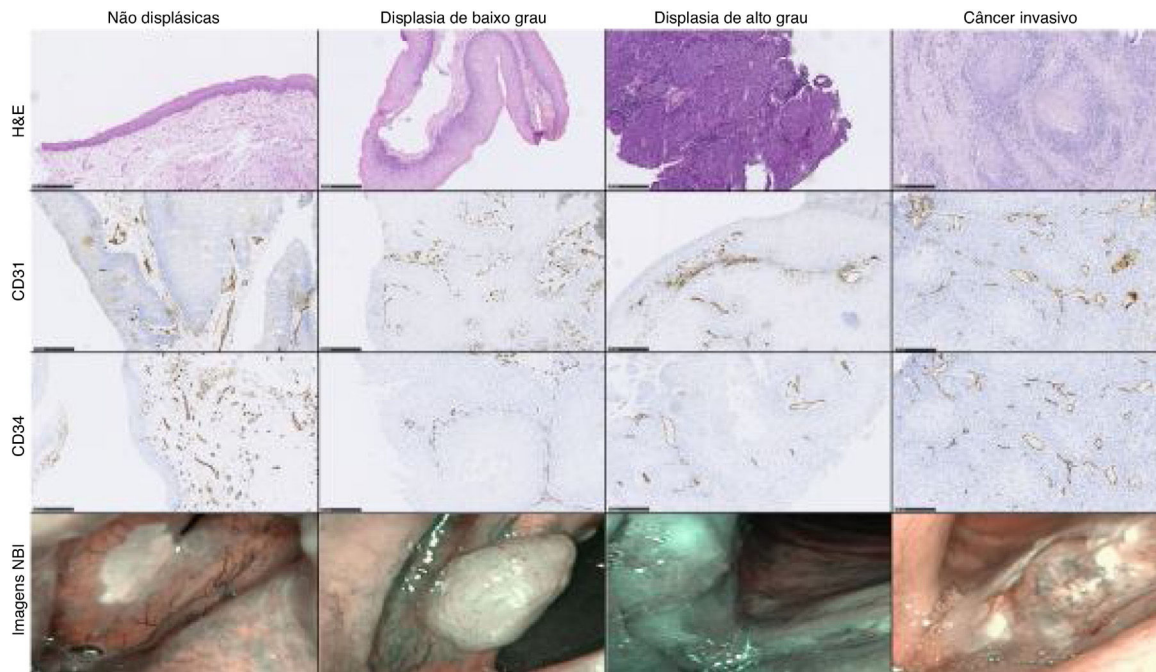


Figura 1 Exemplos de coloração H&E.

displásicas (edema estromal, alterações inflamatórias), displasia de baixo grau, displasia de alto grau (com carcinoma *in situ*) e câncer invasivo, com número de casos comparáveis. Os pacientes foram consecutivamente incluídos em cada grupo. Foram excluídos os pacientes com história de microcirurgia ou biópsia laringea anterior, radioterapia na região do pescoço ou história de imunodeficiência e quimioterapia sistêmica e aqueles com quantidade inadequada de amostra de tecido em blocos embebidos em parafina para procedimento imuno-histoquímico. No fim, incluímos 77 pacientes (20 com lesões não displásicas, 20 com displasia de baixo grau, 17 com displasia de alto grau, 20 com câncer invasivo) com material tecidual suficiente para outros procedimentos de coloração. Os espécimes obtidos durante a ressecção microcirúrgica ou biópsia de tecido das lesões de PV foram reanalisados por dois histopatologistas, cegos para os resultados iniciais, a fim de confirmar o diagnóstico de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde a partir de 2017.¹⁰ Em casos com opiniões divergentes, o consenso foi alcançado antes da inclusão para análise posterior.

Avaliação de imagens de banda estreita

Toda a extensão dos exames pré-operatórios feitos por NBI foram analisados com o sistema de vídeo Visera Elite OTV-S190 e videoendoscópio de nasofaringolaringoscopia endoscópica – VH (Olympus Medical Systems, Volketswil, Suíça) e usados para avaliar os padrões vasculares das lesões de acordo com a classificação de Ni e o sistema de estadiamento da ELS por dois especialistas experientes com o método e cegos para os dados dos pacientes e resultados histopatológicos. A concordância interobservador para a classificação de Ni e ELS foram, respectivamente, de 88% e 99%. O consenso foi estabelecido para casos com opiniões

diferentes. Os exames com NBI foram feitos com o paciente sentado após anestesia tópica da cavidade nasal e, se necessário, também da garganta com spray de lidocaína 0 a 3 dias antes da ressecção cirúrgica. O exame foi iniciado com luz branca, passou depois para o modo NBI padrão e, finalmente, para o modo NBI ampliada.

Procedimento de imuno-histoquímica

Os anticorpos CD31 e CD34, os mais comumente selecionados nos estudos que

avaliam a densidade microvascular na coloração imuno-histoquímica (IHQ), foram escolhidos para nossa investigação. O CD31 é detectado em células endoteliais maduras, varia de células não formadoras de lúmen a formadoras de lúmen.¹¹ O CD34 é uma sialoproteína transmembrana detectada com anticorpos anti-CD34, tanto em precursores de células endoteliais como em células endoteliais diferenciadas.¹² O número limitado de procedimentos de IHQ possíveis no exame de amostras de pregas vocais depende da pequena quantidade de material obtido durante a microcirurgia laringea e das alterações térmicas adjuntas nas margens do tecido, causadas pela ressecção a laser. Cortes de 3-5 μ m de espessura foram obtidos de 77 blocos de tecido fixados em formalina e embebidos em parafina com o uso de um micróto (HM 340E Electronic Rotary Microtome, Thermo Shandon). Todas os cortes foram corados com um processador automático de tecidos (ASP 6026, Leica, EUA) com hematoxilina e eosina (H&E). Cortes correspondentes foram corados com anticorpo anti-CD31 (clone: JC70A; DAKO/Agilent, EUA), anticorpo anti-CD34 (clone: QBEnd10; DAKO/Agilent, EUA). EnVision FLEX, pH alto (Link) (DAKO/Agilent, EUA) e Autostainer Link 48 (DAKO/Agilent, EUA) foram usados na imunocoloração.

Resumidamente, os cortes de tecido foram desparafinados por incubação em tampão de lavagem, pH 9,0, a 98 °C durante 20 minutos com o equipamento TP Link station (DAKO/Agilent, EUA). Após 10 minutos de incubação no tampão de lavagem à temperatura ambiente, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos. As lâminas foram então incubadas por 20 minutos com os anticorpos primários, seguida pela adição do anticorpo secundário. No caso do anticorpo anticluster de diferenciação (CD) 31, a reação foi reforçada pela adição de reagente Mouse LINKER de acordo com as recomendações do fabricante. A visualização foi obtida pela aplicação de 3,3'-diaminobenzidina. Por fim, os núcleos das células foram contraincolorados com hematoxilina. Os cortes de tecido foram desidratados com concentrações graduadas de etanol, clareados em xileno e cobertos com lamelas de cobertura (Klinipath, Holanda).

Avaliação das amostras imunocoradas foi feita por dois histopatologistas com microscopia óptica e os resultados foram calculados.

Avaliação da densidade de microvasos

Primeiramente, para cada lâmina, as regiões com maior densidade de vasos (*hotspots*) foram

identificadas com baixa ampliação (x40), então a contagem média de vasos CD31 positivos e CD34 positivos feita em três ou cinco *hotspots*, respectivamente, foi calculada com alta ampliação (x 200). Apenas coloração membranosa contínua foi considerada positiva. Qualquer microvaso grande, com um lúmen, ou qualquer célula endotelial separada e única foi contado como 1. Os vasos foram contados no interior do epitélio e na interface epitélio/estroma.

A [figura 1](#) apresenta exemplos de cortes corados com H&E e imunocoloração para CD31 e CD34 em cada tipo de lesão intraepitelial de PV com aumento de 100x com os respectivos quadros de NBI.

Análise estatística

Os parâmetros foram avaliados com os programas SPSS 18.0 e Statistica 13. Um

valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises. A concordância interavaliadores na avaliação por NBI foi calculada como um valor de concordância percentual. Os testes Anova, não paramétrico de Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney foram usados para comparar as diferenças entre os tipos por NBI e a expressão de CD31 e CD34. Os testes Anova e Kruskal-Wallis foram usados para comprovar se havia diferenças estatisticamente significantes para todos os padrões vasculares analisados. Os tipos de classificação de Ni por NBI foram divididos em dois grupos: Tipos I- IV para o grupo benigno e Tipos Va-Vc para o grupo com malignidade. Com o teste U de Mann-Whitney, a MVD média de cada tipo foi comparada com o valor médio de MVD do grupo oposto. A MVD média entre o padrão longitudinal e perpendicular (segundo a classificação da ELS) também foi comparada pelo teste U de Mann-Whitney. Gráficos *box-plots* foram usados para apresentação gráfica dos resultados obtidos. As correlações entre os dois métodos,

Tabela 1 Dados demográficos e padrões vasculares de NBI de acordo com a classificação de Ni e estadiamento da *European Laryngological Society* (ELS) para os tipos de lesões histopatológicas individuais

	Número de lesões	Média da Idade ± DP	NBI Tipo I	NBI Tipo II	NBI Tipo III	NBI Tipo IV	NBI Tipo Va	NBI Tipo Vb	NBI Tipo Vc	ELS longitudinal	ELS perpendicular
Não displásicas	20	55,15 ± 12,38	1	19	-	-	-	-	-	20	-
Displasia de baixo grau	20	61,55 ± 10,66	-	2	4	12	2	-	-	6	14
Displasia de alto grau	17	64,94 ± 11,25	-	-	1	1	6	6	3	1	16
Câncer invasivo	20	66,65 ± 9,31	-	-	-	-	2	8	10	-	20
Todas as lesões	77	61,96 ± 11,62	1	21	5	13	10	14	13	27	50

NBI: narrow band image.

Tabela 2 Média de densidade de microvasos (MVD) com CD31 em tipos de padrão vascular individual de acordo com as classificações de Ni e da *European Laryngological Society* (ELS)

Classificação NBI	Número de lesões analisadas	Média de MVD com CD31	Variação de MVD com CD31	Desvio padrão (±DP) de MVD com CD31	Erro Padrão de MVD com CD31	IC 95% de MVD com CD31	p-valor
Tipo I	1	3,33	–	–	–	–	–
Tipo II	21	12,63	3,00 – 33,33	7,87	1,68	9,14 – 16,11	0,04 ^a
Tipo III	5	12,73	5,33 – 21,00	6,44	2,88	4,74 – 20,73	0,115 ^a
Tipo IV	13	20,55	8,67 – 56,00	13,95	3,73	12,49 – 28,60	0,842 ^a
Tipo Va	10	17,67	5,67 – 26,67	7,19	2,72	11,02 – 24,32	0,198 ^a
Tipo Vb	14	19,67	6,00 – 53,67	13,59	3,51	12,14 – 27,19	0,16 ^a
Tipo Vc	13	19,92	9,00 – 34,67	7,11	1,97	15,63–24,22	0,013 ^a
Total	77	17,01	3,00 – 56,00	10,63	1,21	14,60–19,43	0,016 ^b
Padrão longitudinal da ELS	27	12,50	3,00– 33,33	7,65	1,47	9,47 – 15,52	0,02 ^a
Padrão perpendicular da ELS	50	19,45	5,67 – 56,00	11,27	1,59	16,25 – 22,65	

IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

^a p-valor do teste U de Mann-Whitney.^b p-valor do teste de Kruskal-Wallis.

para avaliar a densidade de microvasos (MVD com CD31 e MVD com CD34) com os padrões vasculares por NBI e ELS, foram calculadas com o teste de correlação de postos de Spearman.

Resultados

Em cada uma das 77 lesões, procedeu-se à análise imuno-histoquímica da MVD com os anticorpos CD31 e CD34, bem como à avaliação dos padrões vasculares na endoscopia por NBI. As lesões não displásicas em 19 casos apresentavam Ni Tipo II e em um caso, Ni Tipo I. Nesse grupo de lesões, todos os vasos eram longitudinais. As 20 lesões com displasia de baixo grau apresentavam os seguintes padrões vasculares: 2 - Ni Tipo II, 4 - Ni Tipo III, 12 - Ni Tipo IV e 2 - Ni Tipo Va. Vasos longitudinais foram identificados em 6 lesões de displasia de baixo grau e vasos perpendiculares estavam presentes em 14. Entre as lesões com displasia de alto grau foram identificados os seguintes padrões por NBI: 1 - Ni Tipo III, 1 - Ni Tipo IV, 6 - Ni Tipo Va, 6 - Ni Tipo Vb e 3 - Ni Tipo Vc. Vasos longitudinais estavam presentes em um caso, os demais 16 casos tinham vasos perpendiculares. Os casos de câncer invasivo demonstraram os seguintes padrões vasculares: 2 - Ni Tipo Va, 8 - Ni Tipo Vb e 10 - Ni Tipo Vc. Todos os 20 casos de câncer invasivo tinham vasos perpendiculares dentro da lesão. A [tabela 1](#) apresenta dados demográficos e padrões vasculares detalhados por NBI, de acordo com a classificação de Ni e ELS para grupos individuais, de acordo com o diagnóstico histopatológico.

A avaliação da densidade microvascular com a expressão de CD31 (MVD com CD31) em células endoteliais revelou diferenças estatisticamente significantes na contagem de microvasos entre as classificações Ni e a classificação ELS (p-valor do teste de Kruskal-Wallis para classificação de Ni e teste U de Mann-Whitney para classificação ELS de 0,016 e 0,002, respectivamente). O valor médio da MVD com CD31 aumentou progressivamente do Tipo II (12,63) até o maior valor para o Tipo IV (20,55). A maior diminuição na MVD com CD31 foi observada para o Tipo Va (17,67), mas aumentou novamente nos Tipos Vb e Vc (19,67 e 19,92, respectivamente).

A DMV com CD31 em lesões com padrão de vasos longitudinais de acordo com a classificação ELS foi de 12,5, em comparação com 19,45 para aquelas com vasos perpendiculares. As estatísticas detalhadas da MVD com CD31 em padrões vasculares com classificação de Ni e ELS são apresentadas na [tabela 2](#). A [figura 2](#) apresenta a estatística gráfica para MVD com CD31 nos tipos de NBI de acordo com as classificações Ni ([fig. 2A](#)) e ELS ([fig. 2B](#)).

A avaliação da densidade de microvasos com a expressão de CD34 (MVD com CD34) também revelou diferenças estatisticamente significantes na contagem média de microvasos entre a classificação Ni e a classificação ELS (p-valor do teste Anova para classificação de Ni e teste U de Mann-Whitney para classificação de ELS ambos < 0,001).

Para a MVD com CD34, o maior valor médio foi identificado nas lesões do Tipo Va (35,43) comparadas aos Tipos IV (25,94), Tipo Vb (30,48) e Vc (34,45).

A DMV com CD34 nas lesões com padrão longitudinal de acordo com a classificação ELS foi de 15,12, contra

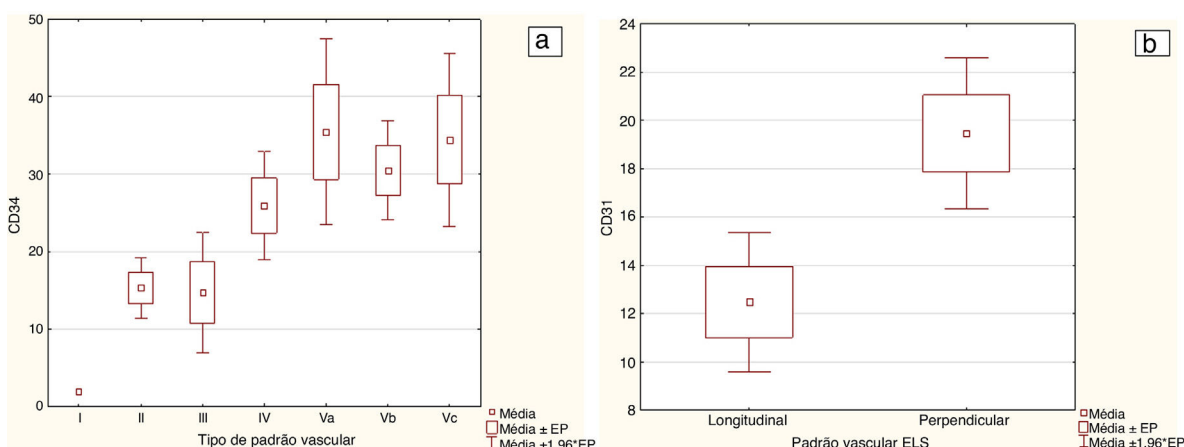


Figura 2 Gráficos estatísticos para as classificações MVD com CD31 (2A) e ELS (2B).

Tabela 3 Média de densidade de microvasos (MVD) com CD34 em tipos de padrão vascular individual de acordo com as classificações de Ni e da *European Laryngological Society* (ELS)

Classificação NBI	Número de lesões analisadas	Média de MVD com CD34	Variação de MVD com CD34	Desvio-padrão (±DP) de MVD com CD34	Erro-padrão de MVD com CD34	IC 95% de MVD com CD34	p-valor
Tipo I	1	2,00	–	–	–	–	–
Tipo II	21	15,30	3,40 – 31,80	9,47	2,02	11,10 – 19,50	< 0,001 ^a
Tipo III	5	14,72	2,80 – 25,40	8,82	3,97	3,69 – 25,75	0,08 ^a
Tipo IV	13	25,94	7,60 – 49,40	13,39	3,58	18,20 – 33,68	0,153 ^a
Tipo Va	10	35,43	17,00 – 57,40	16,14	6,10	20,50 – 50,36	0,01 ^a
Tipo Vb	14	30,48	6,80 – 56,00	12,49	3,27	23,56 – 37,40	0,02 ^a
Tipo Vc	13	34,45	10,00 – 92,60	20,54	5,70	22,04 – 46,86	0,03 ^a
Total	77	25,04	2,00 – 92,60	15,75	1,79	21,47 – 28,62	< 0,001 ^b
Padrão longitudinal da ELS	27	15,12	2,00 – 31,80	9,27	1,79	11,44 – 18,90	< 0,001 ^a
Padrão perpendicular da ELS	50	30,40	4,00 – 92,60	15,98	2,26	25,86 – 39,44	

IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

^a p-valor do teste U de Mann-Whitney.

^b p-valor de Anova.

30,40 para aqueles com vasos perpendiculares. As estatísticas detalhadas de MVD com CD34 para cada tipo de padrão vascular de acordo com as classificações Ni e ELS são apresentadas na [tabela 3](#). A [figura 3](#) apresenta a estatística gráfica para MVD com CD34 nos tipos NBI de acordo com as classificações Ni ([fig. 3A](#)) e ELS ([fig. 3B](#)).

A correlação (teste de Spearman) entre a classificação Ni por NBI e MVD com CD31 e MVD com CD34 revelou um valor de rho de 0,333 e 0,521, respectivamente (valor de

p 0,003 e < 0,001, respectivamente). A correlação entre a classificação ELS e MVD com CD31 e MVD com CD34 revelou um valor de rho de 0,356 e 0,506, respectivamente (valor de p 0,02 e < 0,001, respectivamente).

Discussão

Este estudo é o primeiro relato na literatura que usou técnicas de histopatologia para avaliar a correlação entre MVD e

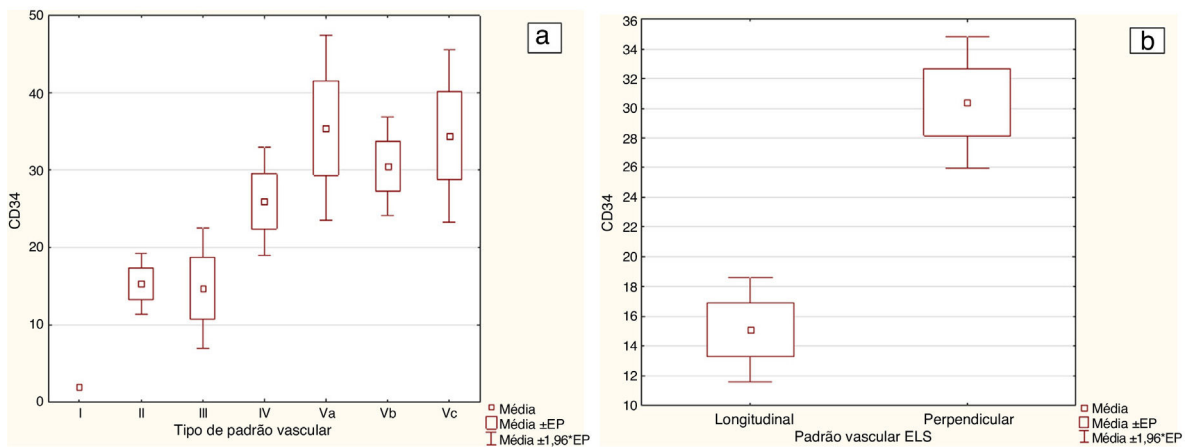


Figura 3 Gráficos estatísticos para as classificações MVD com CD34 (3A) e ELS (3B).

progressão da doença de lesões não displásicas, lesões com displasia de baixo grau, lesões com displasia de alto grau e câncer invasivo das pregas vocais, avaliadas por endoscopia com NBI. Investigamos a densidade vascular da mucosa das pregas vocais através de imuno-histoquímica com o uso dos anticorpos CD31 e CD34 e demonstramos boa concordância com as classificações Ni e ELS de padrões microvasculares com NBI. Também demonstramos um aumento significativo da DMV dos padrões vasculares com NBI típicos para lesões não displásicas de PV (Tipo I ou II de acordo com a classificação de Ni ou vasos longitudinais na classificação ELS), a modelos NBI característicos para lesões displásicas e câncer invasivo (Tipo IV e V ou vasos perpendiculares). A técnica de NBI foi projetada para destacar a vascularização da mucosa através da aplicação de filtros de luz especiais, que isolam os comprimentos de onda absorvidos pela hemoglobina. A alta precisão desse método endoscópico tem sido comprovada no diagnóstico diferencial de lesões laringeas em muitos estudos.^{4,5,8,13–19} A maioria dos estudos usou a classificação do Ni devido a sua precisão, especificidade e sensibilidade. No entanto, a principal limitação da técnica de NBI ainda é a visualização horizontal dos vasos da mucosa sem exame direto da profundidade. A classificação de Ni dos padrões vasculares foi projetada para refletir a progressão dos vasos perpendiculares de pequeno tamanho e de baixa densidade descritos como Tipo IV em displasia de baixo grau, àqueles maiores em tamanho, distorcidos e de maior densidade para Tipo Va em displasia de alto grau e carcinoma *in situ* e interrupção dos vasos e focos de necrose nos tipos Vb e Vc, que é típico para o câncer invasivo. Essa classificação dos vasos da mucosa laringea por Ni foi feita com base na classificação do padrão de *Loops Capilares Intrapapilares* (IPCL, do inglês *Intrapapillary Capillary Loop*) introduzido por Inoue et al. para a avaliação de lesões esofágicas superficiais.⁷ Houve algumas dúvidas se as diferenças na estrutura histológica das pregas vocais e no epitélio do esôfago não causariam discrepâncias na avaliação dos tipos de IPCL na laringe. A classificação proposta pela ELS foi criada para uma abordagem mais prática, com uma distinção dicotômica de lesões benignas (vasos longitudinais) e pré-malignas ou malignas (vasos perpendiculares).⁷ Não apenas não encontramos estudos sobre a viabilidade de visualizar a angiogênese por NBI em lesões intraepiteliais laringeas,

comparando-a com a avaliação imuno-histoquímica da densidade microvascular, como também faltam investigações sobre a progressão renovascular na carcinogênese das lesões intraepiteliais da laringe.

É interessante o fato de que, com o emprego dos dois anticorpos mais comumente usados, CD31 e CD34, a MVD mais alta foi observada nos tipos IV e Va de Ni, os padrões típicos para displasia de baixo grau e alto grau ou câncer pré-invasivo e não para o tipo Vb ou Vc, atribuídos ao câncer invasivo. O declínio da MVD com maior progressão do câncer invasivo pode ser explicado pela desordem e decomposição dos vasos, bem como a necrose que o acompanha. As variações nos resultados de imunocoloração, quando se usam diferentes marcadores vasculares, foram relatadas em estudos publicados anteriormente e são explicadas pela variação na expressão desses fatores, depende do grau de maturação e diferenciação das células endoteliais vasculares.^{20,21} Enquanto o CD31 é detectado em células endoteliais maduras, anticorpos anti-CD34 também fazem a imunocoloração de células endoteliais linfáticas, fibroblastos, e adipócitos, o que também pode interferir com maior contagem de MVD com CD34 em comparação com MVD com CD31.²¹ Outro marcador vascular que merece atenção, não analisado neste estudo, é o anticorpo CD105, que tem como alvo a endoglin expressa ao longo do processo de vasculogênese, de vasos sanguíneos imaturos a maduros.²¹

Apenas alguns estudos investigaram e confirmaram a correlação entre a classificação do padrão vascular por NBI e a densidade microvascular. O estudo de Fujii et al. analisou as irregularidades microvasculares avaliadas por NBI e MVD com CD34 no câncer faríngeo e demonstrou que alterações arquiteturais dos IPCL correspondiam a distúrbios de arquitetura identificados histopatologicamente na arquitetura e atipia celular.²² Liu et al. apresentaram um coeficiente de correlação de Spearman de 0,67 entre a NBI e a expressão de MVD com CD34 na avaliação da angiogênese de lesões colorretais.¹²

Kawamura et al. demonstraram uma forte correlação entre o método NBI e a densidade vascular avaliada patologicamente em lesões gástricas.²³ Além disso, confirmaram que as diferenças na densidade vascular avaliadas por NBI são confiáveis para distinguir os tipos diferenciados e não diferenciados de carcinoma gástrico. Uno et al.

propuseram uma classificação de padrão capilar para detecção de lesões displásicas no esôfago de Barrett e confirmaram sua aplicabilidade. Não apenas demonstraram a acurácia da classificação, mas demonstraram diferenças significativas na densidade microvascular entre os tipos de classificação.²⁴

Conclusão

Este estudo confirmou que as alterações morfológicas microvasculares de lesões laringeas intraepiteliais observadas sob endoscopia com NBI estão positivamente correlacionadas com os índices de angiogênese da avaliação imuno-histológica e apoiam a viabilidade do uso da endoscopia na avaliação da angiogênese.

Aprovação ética

Este artigo não contém estudos com animais realizados por nenhum dos autores. Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo participantes humanos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa institucional e com a declaração de Helsinqui de 1964 e suas emendas posteriores ou padrões éticos comparáveis. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2012;132:574–82.
2. Jiang S, Yang Y, Fang M, Li X, Yuan X, Yuan J. Co-evolution of tumor-associated macrophages and tumor neo-vessels during cervical cancer invasion. *Oncol Lett.* 2016;12:2625–31.
3. Konda VJ, Hart J, Lin S, Tretiakova M, Gordon IO, Campbell L, et al. Evaluation of microvascular density in Barrett's associated neoplasia. *Mod Pathol.* 2013;26:125–30.
4. Piazza C, Cocco D, De Benedetto L, Del Bon F, Nicolai P, Peretti G. Narrow band imaging and high definition television in the assessment of laryngeal cancer: a prospective study on 279 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267:409–14.
5. Ni XG, He S, Xu ZG, Gao L, Lu N, Yuan Z, et al. Endoscopic diagnosis of laryngeal cancer and precancerous lesions by narrow band imaging. *J Laryngol Otol.* 2011;125:288–96.
6. Inoue H, Kumagai Y, Yoshida T, Kawano T, Endo M, Iwai T. High-magnification endoscopic diagnosis of the superficial esophageal cancer. *Dig Endosc.* 2000;12:S32–5.
7. Arens C, Piazza C, Andrea M, Dikkers FG, Tjon Pian Gi RE, Voigt-Zimmermann S, et al. Proposal for a descriptive guideline of vascular changes in lesions of the vocal folds by the committee on endoscopic laryngeal imaging of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273:1207–14.
8. Šifrer R, Rijken JA, Leemans CR, Eerenstein SEJ, van Weert S, Hendrickx JJ, et al. Evaluation of vascular features of vocal cords proposed by the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275:147–51.
9. Mehlum CS, Rosenberg T, Dyrvig AK, Groentved AM, Kjaergaard T, Godballe C. Can the Ni classification of vessels predict neoplasia? A systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope.* 2018;128:168–76.
10. Gale N, Poljak M, Zidar N. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: What is New in the 2017 WHO Blue Book for Tumours of the Hypopharynx, Larynx, Trachea and Parapharyngeal Space. *Head Neck Pathol.* 2017;11:23–32.
11. Alessandri G, Girelli M, Taccagni G, Colombo A, Nicosia R, Caruso A, et al. Human vasculogenesis ex vivo: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. *Lab Invest.* 2001;81:875–85.
12. Liu H, Wu J, Liu XC, Wei N, Liu KL, Ma YH, et al. Correlation between microvascular characteristics and the expression of MVD, IGF-1 and STAT3 in the development of colonic polyps carcinogenesis. *Exp Ther Med.* 2017;13:49–54.
13. Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S. The value of narrow band imaging for early detection of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266:1017–23.
14. Qi X, Yu D, Zhao X, Jin C, Sun C, Liu X, et al. Clinical experiences of NBI laryngoscope in diagnosis of laryngeal lesions. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:3305–12.
15. Kraft M, Fostiropoulos K, Gurtler N, Arnoux A, Davaris N, Arens C. Value of narrow band imaging in the early diagnosis of laryngeal cancer. *Head Neck.* 2016;38:15–20.
16. Bertino G, Cacciola S, Fernandes WB Jr, Fernandes CM, Occhini A, Tinelli C, et al. Effectiveness of narrow band imaging in the detection of premalignant and malignant lesions of the larynx: validation of a new endoscopic clinical classification. *Head Neck.* 2015;37:215–22.
17. Staníková L, Kučová H, Walderová R, Zeleník K, Šatanková J, Komínek P. Value of Narrow Band Imaging (NBI) in early diagnosis of laryngeal cancer. *Klin Onkol.* 2015;28:116–20.
18. Rzepakowska A, Sielska-Badurek E, Cruz R, Sobol M, Osuch-Wójcikiewicz E, Niemczyk K. Narrow band imaging versus laryngovideoscopy in precancerous and malignant vocal fold lesions. *Head Neck.* 2018;40:927–36.
19. Rzepakowska A, Sielska-Badurek E, Żurek M, Osuch-Wójcikiewicz E, Niemczyk K. Narrow band imaging for risk stratification of glottic cancer within leukoplakia. *Head Neck.* 2018;40:2149–54.
20. Nagatsuka H, Hibi K, Gunduz M, Tsujigiwa H, Tamamura R, Sugahara T, et al. Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin and their relationship with lymphnode metastasis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:70–6.
21. Miyata Y, Sagara Y, Watanabe S, Asai A, Matsuo T, Ohba K, et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. *Virchows Arch.* 2013;463:673–9.
22. Fujii S, Yamazaki M, Muto M, Ochiai A. Microvascular irregularities are associated with composition of squamous epithelial lesions and correlate with subepithelial invasion of superficial-type pharyngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010;56:510–22.
23. Kawamura M, Naganuma H, Shibuya R, Kikuchi T, Sakai Y, Nagasaki F, et al. Analysis of microvascular density in early gastric carcinoma using magnifying endoscopy with narrow-band imaging. *Endosc Int Open.* 2016;4:E832–7.
24. Uno G, Ishimura N, Tada Y, Tamagawa Y, Yuki T, Matsushita T, et al. Simplified classification of capillary pattern in Barrett esophagus using magnifying endoscopy with narrow band imaging: implications for malignant potential and interobserver agreement. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e405.