

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária**



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO CARCINOMA
PAVIMENTOCELULAR DA MUCOSA ORAL**

FACTORES TUMORAIS DE PROGNÓSTICO

Daniel António de Sousa

**Doutoramento em Medicina Dentária
Cirurgia Oral**

**Orientador
Professor Doutor Paulo Valejo Coelho**

2009

***Tese de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Universidade de Lisboa***

ÍNDICE

RESUMO/ABSTRACT.....	6
PREFÁCIO.....	15
INTRODUÇÃO.....	18
FACTORES HISTOMORFOLÓGICOS TUMORAIS DE PROGNÓSTICO	
-ESTADO ACTUAL DO PROBLEMA.....	70
OBJECTIVOS DO ESTUDO.....	98
MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
RESULTADOS.....	111
DISCUSSÃO.....	138
CONCLUSÕES.....	155
COMENTÁRIO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	157
BIBLIOGRAFIA.....	158

ABREVIATURAS e ACRÓNIMOS

AgNORs	Regiões de organização nucleolar argirófilas
CDK	Cinase ciclina-dependente
CPC	Carcinoma pavimentocelular
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EGF	Factor de crescimento epitelial
EGFR	Receptor do factor de crescimento epitelial
EMT	Transição epitelial-mesenquimatosa
FAK	Cinase de adesão focal
FIT	Frente invasiva tumoral
GM-CSF	Factor estimulador de colónias de granulocitos e macrófagos
HPF	Campo de alta ampliação
IHQ	Imunohistoquímica
KGF	Factor de crescimento dos queratinocitos
LI	Índice de marcação
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases da matriz
m RNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PCNA	Antigénio nuclear de células em proliferação
RNA	Ácido ribonucleico
TGF	Factor tissular de crescimento
TIMP	Inibidor tissular das metaloproteinases
VADS	Vias aerodigestivas superiores
VEGF	Factor de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Palavras-chave: cancro oral, prognóstico, factores tumorais, invasão, metastização, grau histológico, Ki-67, angioinvasão.

A finalidade deste trabalho foi contribuir para o estudo dos factores tumorais de prognóstico do carcinoma pavimentocelular da mucosa oral.

Numa primeira parte foram analisados alguns aspectos epidemiológicos, aspectos morfológicos, funcionais e ultraestruturais da mucosa oral normal, descritos os mecanismos da cancerigénese e da progressão tumoral no cancro oral à luz dos actuais conhecimentos da biologia celular e da genética molecular, nomeadamente o papel dos oncogenes e genes supressores, da apoptose e da evasão à apoptose, da inibição da sinalização inibitória de crescimento, da angiogénese e linfangiogénese, assim como os mecanismos de invasão e metastização. Foram ainda analisados o risco e os padrões de metastização cervical no cancro oral, conhecidas que são as suas especiais características de disseminação linfática regional e as suas implicações na terapêutica cirúrgica e terapêutica complementar. Foi também comentada a classificação de estadiamento TNM da OMS e o seu valor clinicopatológico.

Na análise crítica do conhecimento actual dos factores histomorfológicos tumorais de prognóstico do carcinoma pavimentocelular da mucosa oral foram analisados os que respeitam ao estudo da frente invasiva tumoral, à avaliação da actividade proliferativa tumoral, à espessura do tumor e aos factores determinados na avaliação anatómo-patológica pós-operatória.

Como objectivos do estudo foram estabelecidos os seguintes: 1) avaliar a relação de alguns factores tumorais (dimensão do tumor, estado das margens, invasão perineural e angioinvasão, número de gânglios com metástase no esvaziamento cervical) com o risco de recidiva e com o prognóstico de

sobrevivência global; 2) avaliar a relação dos sistemas de graduação, em particular o padrão de invasão na frente invasiva, com o risco de recidiva e com o prognóstico de sobrevivência global; 3) avaliar o índice de proliferação celular na frente invasiva tumoral com recurso ao marcador tumoral Ki-67/MIB1 e a sua relação com o risco de recidiva e com o prognóstico de sobrevivência global; 4) correlacionar a espessura do tumor com os restantes elementos de graduação e em particular com o índice de proliferação celular de Ki-67/MIB1, nomeadamente avaliar se os tumores com maior espessura têm ou não um índice de proliferação mais elevado e se existe correlação com o prognóstico de sobrevivência global.

Foram assim seleccionados 65 casos, num universo de 1356 casos de doentes com CPC da língua (incluindo base da língua) e pavimento da boca, em todos os seus estádios, registados nos arquivos do ROR – Sul, entre 1998 e 2007. Todos estes casos eram doentes inscritos, tratados e seguidos clinicamente no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do IPOLFG-EPE entre 1999 e 2005 e que correspondiam totalmente aos critérios de inclusão estabelecidos, designadamente o de terem sido submetidos a cirurgia como tratamento primário.

Destes 65 casos foram colhidos no seu processo clínico os seguintes dados: idade (na data do diagnóstico), sexo, data do diagnóstico anatomopatológico confirmativo da lesão, estado actual (data da última observação clínica), tempo de sobrevivência expresso em meses e intervalo livre de doença expresso em meses (definido como o período entre a data do tratamento inicial e a data do diagnóstico da recidiva).

Dos dados anatomopatológicos da peça operatória foram colhidos os seguintes elementos: estágio pTNM, distância à margem cirúrgica mais próxima, eventual presença de tumor na margem cirúrgica, número de gânglios do esvaziamento cervical e número de gânglios com metástase.

Foram avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos: máxima profundidade de invasão do tumor expressa em mm (arredondada às décimas); avaliação do grau histológico segundo os sistemas de classificação OMS/Broders, sistema de graduação de Anneroth/Batsakis e sistema de graduação de Bryne, invasão vascular, invasão linfática e invasão perineural.

Foi ainda efectuada a marcação imunocitoquímica de Ki-67 com o anticorpo anti-Ki-67 e determinado o seu índice de marcação na frente invasiva tumoral.

Os procedimentos estatísticos analíticos aplicados neste trabalho foram os seguintes:

Na análise univariada da associação entre variáveis categóricas foi usado o teste de Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exacto de Fisher (quando valores esperados <5). A avaliação da associação entre a expressão do índice de marcação Ki-67 e a espessura do tumor com a recidiva foi feita com recurso a modelos de regressão logística.

A estimativa da sobrevivência global e do intervalo livre de doença foi feita usando o estimador produto-limite de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevivência comparadas através do teste logrank e do teste de Peto (mais sensível a diferenças observadas no início da curva). Foi ainda realizada uma análise multivariada com recurso ao modelo de Cox de riscos proporcionais para o estudo das variáveis com impacto na sobrevivência global.

O estudo da correlação entre variáveis quantitativas foi feito com recurso aos coeficientes de correlação de Pearson e/ou de Spearman. A comparação da espessura e do índice de marcação Ki-67 entre subgrupos foi feita com recurso aos testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (>2 grupos).

Excepto quando explicitamente referido o contrário, todos os testes foram bilaterais tendo sido considerado o nível de significância de 5%. A análise foi realizada utilizando o software *R versão 2.5.0*.

Os resultados obtidos mostram, no que respeita aos factores clinicopatológicos, que a recidiva tumoral, o estádio pTNM, e pN, possuem um elevado significado prognóstico na sobrevivência global, em análise univariada. pN (pN1 e pN2) mostra ainda em análise multivariada possuir elevado significado prognóstico para a sobrevivência global. Em especial pN2 exprime um *exp(coef)* elevado em análise multivariada - Modelo de Cox de riscos proporcionais.

Dos factores histopatológicos, o parâmetro angioinvasão mostrou possuir um muito elevado significado prognóstico na sobrevivência global em análise univariada (p-value log rank=6e-06 e p-value Peto=2.24e-05). O parâmetro

neuroinvasão mostrou também possuir significado prognóstico na sobrevivência global em análise univariada (p-value log rank=0.0154 e p-value Peto=0.0154).

Face a estes resultados pode pois admitir-se que, neste conjunto de casos T1 e T2 com localização circunscrita à língua, todos tratados primariamente com cirurgia, os factores clinicopatológicos determinantes do prognóstico de sobrevivência em análise univariada sejam o estado dos gânglios cervicais, o estágio TNM e a recidiva.

Em análise multivariada - Modelo de Cox de riscos proporcionais, os parâmetros clinicopatológicos com maior importância para a sobrevivência foram a recidiva loco-regional, pN1, pN2 e tumor nas margens de excisão.

O parâmetro espessura não mostrou possuir em análise univariada significado prognóstico nem na sobrevivência global nem na ocorrência de recidiva.

Não foi possível demonstrar uma relação significativa entre a espessura e pN. No entanto deve referir-se que há uma tendência para os casos com gânglios positivos apresentarem valores medianos de espessura superiores (mediana da espessura: N0 - 9,8mm; N1 – 13,5mm; N2 – 13,8mm).

Os sistemas de graduação considerados (Broders, Anneroth-Batsakis e Bryne), bem como o padrão de invasão na frente invasiva, não provaram neste estudo possuir significado no prognóstico de sobrevivência ou de recidiva. O mesmo se verificou com o índice de marcação com Ki-67 na frente invasiva tumoral.

A angioinvasão (que em análise univariada revelou possuir um elevado significado prognóstico da sobrevivência global) não tem significado no prognóstico de recidiva em análise univariada. O mesmo se passa também com a invasão perineural.

Finalmente, no estudo da relação entre pN e a angioinvasão foi igualmente encontrada uma associação estatisticamente muito significativa entre os dois parâmetros.

Também se documenta uma tendência para que os tumores com maior espessura apresentem angioinvasão e neuroinvasão.

Desta forma parece poder concluir-se, no conjunto dos factores clinicopatológicos, o elevado significado prognóstico para a sobrevivência de pN, da recidiva tumoral e da existência de tumor na margem de excisão cirúrgica. Por outro lado, no conjunto dos factores tumorais de prognóstico, salienta-se o elevado significado prognóstico da angioinvasão e também da neuroinvasão, sendo de realçar a associação, estatisticamente muito significativa, entre pN e a angioinvasão.

Finalmente sugere-se que, face aos resultados obtidos, o objectivo de trabalhos futuros incida no estudo da relação da angiogénese e linfangiogénese com a invasão linfovascular e desta com a metastização linfática regional cervical. Sugere-se que, sendo o padrão de metastização linfática cervical reconhecidamente previsível no cancro oral, relacionado com um processo linfodependente, se aprofunde o estudo de mediadores biológicos condicionantes deste processo, assim como o de eventuais pressões selectivas subjacentes. Sugere-se ainda o estudo do eventual papel promotor das células do estroma e ainda da transição epitelial-mesenquimatosa.

ABSTRACT

Key words: oral cancer, prognosis, tumor factors, invasion, metastasis, histologic grading, Ki-67, angioinvasion.

The aim of this work is to contribute for the study of tumour prognosis factors of the oral mucosa squamous cell carcinoma (SCC).

In a first part there have been analyzed some epidemiologic aspects, morphological, functional and ultrastructural aspects of the normal oral mucosa, the mechanisms of cancerigenesis and the tumour progression in the oral cancer, under the current knowledge of cellular biology and molecular genetics, namely the role of the oncogenes and suppressing genes, of apoptosis and the evasion to apoptosis, the inhibition of the inhibitory signalling of growth, the angiogenesis and lymphangiogenesis and also the invasion mechanisms and metastasis. There were also analysed the risks and patterns of cervical metastasis in oral cancer, for its well known special characteristics of lymphatic regional dissemination and the WHO classification of TNM staging and its clinic pathological value was commented.

On the critical analysis of the current knowledge on tumour histomorphological prognosis factors of the oral mucosa SCC there were analysed the ones concerning the study of the tumour invasive front, the evaluation of the tumour proliferative activity, the tumour thickness and the obtained factors on the pathological postoperative evaluation.

The following were determined as this study goals: 1) evaluate the relation of some tumour factors (tumour dimension, histological differentiation grade, margin status, perineural invasion and angioinvasion, number of metastatic nodes on the neck dissection) with risk of recurrence and the survival prognosis; 2) evaluate the relation of the grading systems, particularly the invasion pattern in the invasive front, with the risk of recurrence and with the survival prognosis; 3) evaluate the index of cell proliferation (proliferation index) in the tumour invasive front using the Ki-67/MIB1 marker and its relation with the risk of recurrence and the survival prognosis; 4) correlate the tumour thickness with the remaining grading elements particularly with the Ki-67/MIB1 cell proliferation index, namely evaluate if tumours

with greater thickness do or do not have a raised marking index and if there is any correlation with survival prognosis.

Therefore, there were selected, in a universe of 1356 cases of patients with tongue and floor of mouth SCC (including base of the tongue), in all its stages, registered in the ROR-Sul archives, between 1998 and 2007, 65 cases, all corresponding to patients treated and clinically followed in the Head and Neck Tumours Surgery Department of IPOLFG-EPE between 1999 and 2005 and that totally corresponded to the established inclusion criteria, including surgery as primary treatment .

In these 65 cases the following data was taken from the clinical process: age (by the time of the diagnosis), gender, date of diagnosis (which was the date of the pathological confirmation of diagnosis), current state (for which it was considered the situation on the date of the last observation), survival expressed in months, date of recurrence when existing, disease - free interval expressed in months (defined as the period between the date of initial treatment and the date of the recurrence).

The following elements were taken from the surgical pathology report: pTNM stage, minimal surgical margin, existence or not of tumour in the surgical margins, number of nodes of the neck dissection specimen when done and number of positive metastatic nodes.

The following histopathologic parameters were evaluated: maximum depth of tumour invasion expressed in mm, rounded off to tenth; evaluation of the histological grading systems, using the selected cuts, which included the complete thickness of the tumour tissue (including invasive margins) according to the classification systems of WHO/Broders, Anneroth/Batsakis grading system and Bryne grading system, lymph invasion, vascular invasion and perineural invasion.

Futhermore it was done the imunohistochemic staining with the antibody Ki-67/MIB1 and its labeling index (LI) in the invasive tumour front was determined.

The analytic statistic procedures applied in this work were the following:

In the univariate analysis of the association between categorical variables the Chi-square test of Pearson and the Exact test of Fisher (when expected values <5) were used. The evaluation of the association between the expression of Ki-67 labeling index and tumour thickness was done with logistic regression models.

The estimation of survival and the disease free interval was done with the Kaplan-Meier plot and the survival curves compared through the logrank test and Peto test (more sensitive to differences observed in the initial curve). A multivariate analysis was also done through the Cox model of proportional risks for the study of variables with impact in global survival.

The study of correlation between quantitative variables was done through the correlation coefficient of Pearson and/or Spearman. The comparison of tumour thickness and Ki-67 labeling index was done through the non-parametric tests of Mann-Whitney and Kruskal-Wallis (>2 groups).

All tests were bilateral and the significance level of 5% was considered. The analysis was done using the R software version 2.5.0.

The obtained results show that, concerning the clinical-pathological factors, pTNM and pN stage, and local recurrence possess a high prognosis meaning in the overall survival, in univariate analysis. pN (pN1 and pN2) also shows in multivariate analysis to possess a high prognosis meaning to the overall survival. Specially pN2 expresses an extremely high exp(coef) in multivariate analysis - Cox Model of proportional risks.

In multivariate analysis - Cox Model of proportional risks- the clinical and pathological parameters with higher relevance were pN (pN1 and pN2), local recurrence, pN1 and tumour in the surgical excision margins, in a decreasing order of influence.

Concerning the histopathological factors, the angioinvasion revealed to possess a high prognostic significance for the overall survival in univariate analysis (p-value log rank=6e-06 and p-value Peto=2.24e-05) . The same occurs with the perineural invasion (p-value log rank=0.0154 and p-value Peto=0.0154).

In multivariate analysis – Cox Model of proportional risks, the most relevant clinical-pathological factors for survival were local and regional recurrence, pN1, pN2 and positive surgical margins.

The thickness parameter did not demonstrate to have, in univariate analysis, prognostic significance neither in the global survival nor in the recurrence.

It was not possible to demonstrate any significant relation between the thickness and pN. However it must be reported that there is a tendency for the

cases with positive neck nodes to show higher median thickness tumor values (median thickness: N0-9,8mm; N1-13,5mm; N2-13,8mm).

The grading system taken into account (Broders, Anneroth-Batsakis and Bryne), as well as the invasion pattern in the invasive front, did not prove to possess in this study meaning in the survival prognosis or recurrence. The same was verified with grading index with K1-67 in the tumour invasive front.

Angioinvasion and perineural invasion do not have meaning in the recurrence prognosis in univariate analysis.

Finally, in the study of the relation between pN and angioinvasion it was equally found a very high statistic association between the two parameters.

It is also registered a tendency for the tumours with greater thickness to present angioinvasion and neuroinvasion.

In such way it seems to be conclusive that, in the group of clinicopathological factors, the high prognostic meaning to the survival were pN, the tumour recurrence and the existence of tumour in the surgical margins. On the other hand, in the group of tumour factors of prognosis it is pointed out the high prognostic meaning of the angioinvasion and also the neuroinvasion, enhancing the statistically very significant association between pN and the angioinvasion.

Finally it is suggested, according to the obtained results, that the goal of future studies should fall upon the relation of angiogenesis and lymphangiogenesis with the lymphovascular invasion and of this one with the lymphatic regional neck metastasis. We also suggest that, considering the quite predictable pattern of neck node metastasation process of oral SCC, indicating a probable lymphodependent process, the study of their conditioning biological mediators, and also eventual selective pressures, could be useful. And also the study of the eventual promoting role of stromal cells and of the epithelial – mesenchimatous transition.

PREFÁCIO

A minha actividade clínica cirúrgica tem-se centrado desde há mais de 20 anos, de forma consistente, regular e praticamente exclusiva, nos tumores da cabeça e pescoço e em particular nos carcinomas da cavidade oral, pelo que o seu estudo e tratamento se tornou uma dimensão estrutural da minha vida e do meu trabalho.

Sendo certo que tal facto me confere uma dupla responsabilidade – profissional em relação aos meus doentes e docente em relação aos meus alunos - também é verdade que nunca ignorei a necessidade científica de aprofundar o entendimento dos mecanismos da doença oncológica num nível investigacional que congregue a biologia celular e molecular, a genética e a histopatologia. Os avanços nestas áreas são actualmente de tal forma rápidos que obrigam a uma actualização informativa regular, sem o que se corre o risco de ter dos eventos biológicos do cancro uma visão parcelar ou já desajustada.

Deste modo e com base nesse meu interesse decidi concretizar este projecto, o qual tendo por motivação a minha experiência cirúrgica, pretendeu estudar alguns aspectos do problema do cancro oral, nas suas vertentes da carcinogénese e da progressão tumoral e ainda dos factores de prognóstico tumorais.

De algum modo quero assim completar um ciclo da minha vida, numa forma de inquietude e desafio que intelectualmente me poderiam sem qualquer dúvida definir.

Dediquei a esta tarefa, durante o período de tempo que me propus levá-la a cabo, muitas horas de trabalho, pesquisa e reflexão, sem nunca interromper a minha actividade hospitalar e profissional. Foi de facto um desafio que coloquei a mim próprio, para concretizar uma ambição de há muito acalentada mas que só agora levo determinadamente ao seu fim.

Sendo indiscutivelmente um projecto pessoal, não teria sido possível estruturá-lo se não fosse a minha situação de Cirurgião do Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil, EPE. De facto o meu enquadramento

institucional foi a plataforma de vivência e de casuística sobre a qual o projecto de investigação e a Tese nele baseada foram desenvolvidos e concretizados. Nesse sentido, o meu primeiro agradecimento vai para o IPOLFG, EPE, os seus doentes e o seu magnífico referencial de uma Medicina de excelência e de generoso humanismo.

A minha ligação como docente à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa consubstancia uma vocação académica que me é particularmente cara. Nela fui recebido de uma forma que nunca poderei esquecer e nela tenho desenvolvido uma gratificante actividade de ensino, em particular na disciplina de Cirurgia Oral, actualmente Cirurgia Oral e Medicina Oral.

Desde o primeiro momento em que exprimi a minha intenção de Doutoramento que a mesma foi calorosamente acolhida e incentivada. Quero pois aqui exprimir o meu profundo agradecimento à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa na pessoa do seu Presidente do Conselho Directivo, Professor Doutor António Vasconcelos Tavares e ainda ao distinto Conselho Científico e a todos os Docentes em geral.

Ao orientador desta Tese, Professor Doutor Paulo Valejo Coelho, regente da disciplina de Cirurgia Oral e Medicina Oral da Faculdade de Medicina Dentária de Lisboa, dedico um muito profundo, expressivo e justo agradecimento. Foi ele que desde o primeiro momento me apoiou no meu projecto e me deu ânimo nos momentos porventura mais críticos. O seu precioso e constante incentivo, os seus conselhos, a sua contribuição na discussão dos resultados e conclusões, o seu entusiasmo, foram de um valor inestimável e a reafirmação da sua brilhante capacidade científica. O apoio que me prestou neste projecto sobreleva a relação de grande amizade que com ele tenho e foi seguramente um factor decisivo na sua concretização.

Quero também agradecer à Professora Doutora Isabel Fonseca, do Serviço de Anatomia Patológica do IPO, a sua valiosa e indispensável ajuda na parte laboratorial do projecto.

A sua reconhecida experiência na área da patologia e oncologia oral foram muito úteis para o meu trabalho, em especial na revisão dos casos.

Devo ainda uma palavra de agradecimento ao Director do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do IPO, Dr. Jorge Rosa Santos, pelo seu apoio e grande disponibilidade que sempre manifestou desde o início da execução do meu trabalho. Quero igualmente agradecer ao então Director do Serviço de Anatomia Patológica do IPO, Professor Doutor Jorge Soares, a colaboração prestada, designadamente por ter autorizado a efectivação da parte laboratorial do projecto no seu Serviço .

À Dra. Saudade André, do Serviço de Anatomia Patológica do IPO dedico um agradecimento muito caloroso pela sua valiosíssima ajuda e grande disponibilidade. A sua natural modéstia não me deixa lugar a mais rasgados elogios, mas quero deixar aqui expressa a minha admiração pela sua sabedoria e grande qualidade humana.

A Dra. Susana Esteves, do Gabinete de Investigação Clínica do IPO, é credora do meu eterno reconhecimento pela extraordinária colaboração que me prestou no tratamento estatístico dos dados. A sua paciente, extensiva e competentíssima colaboração foi fundamental para levar a bom termo o meu trabalho.

Ainda uma palavra de agradecimento às minhas amigas da Biblioteca, Isabel Teixeira de Sousa, Mónica Bettencourt, Rita Cid e à saudosa Célia Arinto pela sua infinita paciência, disponibilidade e simpatia.

Também um agradecimento a Teresa Ferreira, técnica do Laboratório de Técnicas especiais, Imunocitoquímica, do Serviço de Anatomia Patológica, pela colaboração prestada na parte do trabalho desenvolvida no laboratório.

Devo finalmente uma palavra de reconhecimento a minha Mulher e aos meus Filhos pelo seu incondicional apoio em todo este percurso. Foi também a pensar neles que me lancei e levei até ao seu termo este projecto.

INTRODUÇÃO

A expressão *cancro oral* designa um conjunto de tumores malignos que ocorrem no lábio, língua e pavimento bucal, gengiva, região jugal, palato duro e mole, outras localizações intra-orais e ainda na orofaringe (Classificação Internacional de Doenças – ICD, versão 10, categorias C00.0,1,2,6, C00.3-5, C02.0-3, C03, C04, C05.0, C06, C01, C05.1,2, C09, C10.0,2,3).

Cerca de 95% destes tumores são histologicamente *carcinomas pavimentocelulares* (CPC) com origem na mucosa oral.

Por definição, o carcinoma pavimentocelular é um tumor maligno de natureza epitelial que pode manifestar vários graus de diferenciação pavimentosa e cuja progressão local é reconhecidamente invasiva e pode ainda envolver, por metastização, os gânglios linfáticos regionais.

A realidade epidemiológica do cancro oral é muito significativa ocorrendo anualmente em todo o mundo cerca de 500 000 casos novos na cavidade oral, faringe e laringe, dos quais quase 2/3 em homens, com uma mortalidade de 270 000 casos por ano. Cerca de 300 000 destes casos novos registam-se na cavidade oral. Isto representa cerca de 6% da incidência e 5% da mortalidade de todos os cancros (Parkin *et al.*, 1999).

Na Europa Ocidental as taxas de incidência nos homens são elevadas (11,3 por 100 000), Europa do Sul (9,2 por 100 000) , Sul da Ásia (12,7 por 100 000), África austral (11,1 por 100 000) e Austrália / Nova Zelândia (10,2 por 100 000). Nas mulheres da Ásia Austral a incidência é relativamente elevada (8,3 por 100 000). A zona mundial de maior incidência é a Melanésia - 31,5 por 100 000 nos homens e 20,2 por 100 000 nas mulheres (Parkin *et al.*, 2005). Globalmente considerado no conjunto das outras formas de cancro, o cancro oral ocupa o quinto lugar a nível mundial. Estas variações regionais de incidência são muito significativas, como nas regiões do Centro e Sul da Ásia, nas quais representa mais de metade de todos os cancros da área de cabeça e pescoço e é a mais frequente forma de cancro no homem, sendo esta prevalência particularmente alta atribuída à acção de carcinogéneos e de factores epidemiológicos específicos, como o consumo de

preparados de tabaco de mascar com folha de betel, noz de areca e lima (“pan” ou “paan”) a que se adicionam outras substâncias, em regra especiarias, como o cardamomo, açafreão, anis, mostarda e adoçantes de acordo com preferências locais. A noz de areca, um dos mais usados produtos psicoactivos, é largamente consumida como produto de mascar na Índia, Paquistão, Bangladesh e Sri Lanka por homens, mulheres e até crianças. Contém diversos alcalóides sendo a arecolina o mais abundante deles, existindo ainda em pequenas quantidades a arecaidina, a guvacina e a guvacolina. Contém ainda polifenóis (taninos e flavonóides). Por seu lado a folha de betel contém óleo de betel, um líquido volátil com vários fenóis. Muitas vezes é ainda adicionado tabaco a esta mistura. O consumo destes preparados expõe os utilizadores a nitrosaminas cuja carcinogenicidade tem vindo a ser estudada, e embora não exista consenso sobre essa acção há evidência suficiente para admitir tal efeito nos humanos, quer no cancro oral quer no cancro da orofaringe e do esófago (IARC Monographs 2004).

Registe-se que quatro dos cinco países com mortalidade mais elevada por cancro oral e da orofaringe em homens, em anos recentes, são da Europa de Leste (Hungria, Croácia, Eslovénia, Roménia e Ucrânia), aos quais se associa também a França.

Em Portugal (incluindo as Regiões Autónomas dos Açores e Madeira) registam-se por ano cerca de 1 500 casos novos de cancro oral, dos quais cerca de 1 250 em homens e de 250 em mulheres (Pinheiro *et al.*, Cancer in Portugal, 2002). O cancro oral é em Portugal responsável por 4% das mortes nos homens, sendo neste sexo a quinta causa de morte por doença oncológica. Em Portugal há variações regionais consideráveis, sendo por exemplo a taxa de mortalidade na Madeira dupla da taxa média do País. Em Portugal continental é mais frequente nas regiões do Sul, onde a prevalência de fumadores é mais elevada em ambos os sexos (Departamento de Estudos e Planeamento em Saúde, 1988 e 1997).

A taxa de mortalidade para o cancro oral em Portugal aumentou cerca de 24% de 1988 a 1998, passando de 7.7 em 1988 para 9.6/100 000 habitantes em 1998, sobretudo em homens de idade jovem e de meia idade, seguindo um padrão em que o aumento é cada vez mais elevado em camadas etárias sucessivamente mais jovens, sugerindo um efeito *cohort* (Pinheiro *et al.* op. cit.). O aumento do

consumo de álcool e de tabaco na Europa Central e de Leste e também em Portugal nos últimos anos parece estar agora a repercutir o seu efeito . O rácio de mortalidade padronizado homens/mulheres é de 6.3 e reflecte a diferente prevalência de fumadores e também o rácio do consumo de álcool entre os sexos é de 2.7. Nas mulheres o cancro oral representa apenas 1% da mortalidade devida ao cancro e não tem aumentado até agora.

Mais de metade dos novos casos diagnosticados correspondem a estádios avançados, continuando o prognóstico global de sobrevivência a ser ainda hoje muito grave, inferior a 30% aos 5 anos para os estádios III e IV.

Apesar de todos os progressos verificados na actuação terapêutica, quer na área cirúrgica, quer nas restantes modalidades de tratamento como a radioterapia e a quimioterapia, e dos avanços verificados nos meios de diagnóstico, não houve melhoria significativa da sobrevivência global aos 5 anos nas últimas 3 décadas (Jemal *et al.* 2002). Todavia, como refere Kowalski (2006), este tipo de análise não tem em conta as especificidades de cada localização tumoral quanto à incidência, estágio clínico e tratamento, pelo que é necessária uma estratificação. De qualquer modo deve ter-se em consideração que os tumores malignos da cavidade oral têm diferentes evoluções clínicas consoante a sua localização.

Deste modo torna-se evidente que, para além da necessidade de conhecer melhor a importância relativa dos factores de risco conhecidos que em conjunto ou separadamente actuam na carcinogénese oral, é importante que se continuem a aprofundar os conhecimentos sobre a patogénese tumoral e os factores do próprio tumor que possam ter importância na sua progressão e comportamento biológico.

Na área do cancro oral e dos carcinomas da cabeça e pescoço em geral escassos ou nulos progressos se verificaram no campo dos marcadores tumorais e não se espera que tal se venha a modificar no futuro, sobretudo pela sua complexidade e também por serem tumores clinicopatologicamente heterogéneos. Pelo contrário muito se avançou no que respeita ao estudo dos factores de prognóstico tumorais, área de investigação que foi e continua a ser muito profícua, não só pelo interesse e implicações práticas de que se reveste o estudo dos complexos mecanismos de cancerogénese, como também pela identificação de doentes com maior risco de progressão tumoral ou recidiva.

1.1 Mucosa oral normal

O epitélio oral é pavimentoso estratificado, queratinizado em áreas sujeitas a forças masticatórias, e sob ele existe tecido conjuntivo, englobando a lâmina própria (Figura1). A submucosa consiste em tecido conjuntivo mais laxo, com glândulas e depósitos adiposos e ainda estruturas nervosas e vasculares. O limite entre a lâmina própria e a submucosa é indistinguível.

No epitélio pavimentoso estratificado oral podem reconhecer-se várias camadas: estrato germinativo (ou camada basal), estrato espinhoso (ou camada de células espinhosas), estrato granuloso (ou camada granular) e estrato córneo (camada queratinizada ou córnea) .

Estas diferentes camadas representam um processo de amadurecimento progressivo do epitélio (Berkowitz *et al.* 2004) que mantém a sua integridade estrutural através de um processo de renovação celular contínua no qual as células formadas nas camadas profundas migram para a superfície para substituir as das camadas superficiais. Coexistem pois duas populações celulares funcionais: a população progenitora e a população madura, esta com um processo de maturação e diferenciação para formar uma camada protectora (Ten Cate 1998).

As células progenitoras situam-se no estrato germinativo, na camada basal dos epitélios finos (pavimento da boca) e nas duas ou três camadas mais profundas dos epitélios mais espessos (região jugal e palato). O compartimento progenitor não é homogéneo e consiste em duas subpopulações celulares funcionalmente distintas: uma pequena população de ciclo muito lento e que se considera representar as células-tronco, cuja função é produzir células basais e conservar o potencial proliferativo do tecido, e uma população maior constituída por células amplificantes cuja função é aumentar o número de células disponíveis para uma maturação subsequente. São as células-tronco que, por se dividirem menos frequentemente, se tornam importantes para a protecção da informação genética do tecido, dado que o DNA é mais vulnerável durante a mitose.

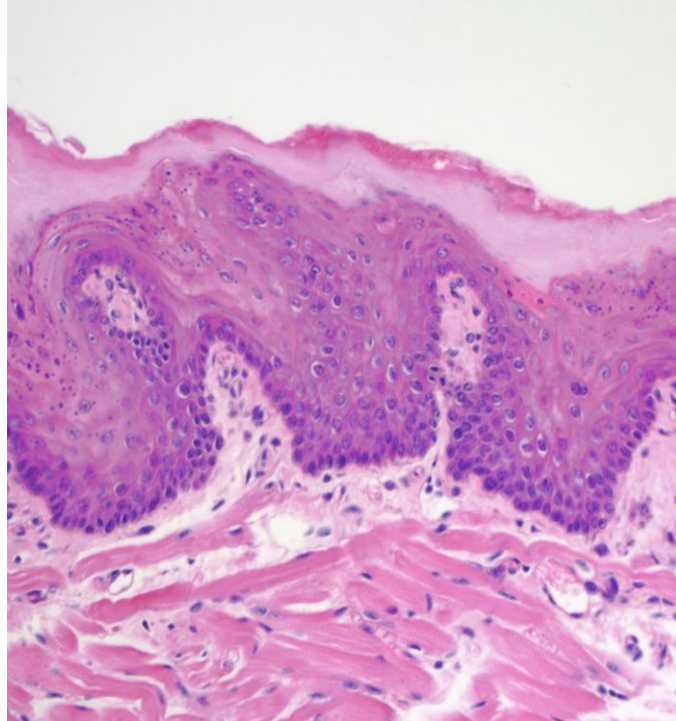


Figura 1: Mucosa oral normal
(Hematoxilina & Eosina x 400).

Após a divisão celular cada célula-filha decide se recicla na população progenitora ou se entra no compartimento de maturação, período este designado de dicofase. Pensa-se que as células em maturação produzam inibidores de crescimento que condicionam mais divisões celulares por um mecanismo de *feed back*, mas o mecanismo preciso de libertação do inibidor não é conhecido, podendo estar nele implicados factores sistémicos.

O número de células em divisão é mensurável por diversos métodos , assim como o tempo de *turnover*, ou seja o tempo necessário para a substituição de todas as células do epitélio. Sabe-se que o tempo de renovação na mucosa mastigatória é um pouco mais lento do que na mucosa de revestimento, não mastigatória, e que o epitélio de junção e sulcular se renova mais rapidamente (cerca de 5 dias).

As células que se dividem nas camadas basais e não permanecem na população progenitora, deslocando-se para a superfície do epitélio, passam por um

processo de maturação que, a nível da mucosa oral, assume dois padrões: queratinização e não-queratinização. Este processo maturativo não tem a ver com a simples migração das células, uma vez que as células não migrantes também se diferenciam e ainda que a diferenciação induz a saída da célula do estrato germinativo.

O processo de queratinização, ou cornificação, consiste na formação de uma camada superficial de queratina.

O epitélio queratinizado normal apresenta uma série de camadas: a basal (camada de células cuboidais ou colunares que está adjacente à membrana basal) e a camada de *células espinhosas* ou *stratum spinosum* (várias camadas de células grandes, esféricas ou elípticas), que no seu conjunto constituem mais de metade da espessura do epitélio; a camada granular ou *stratum granulosum* constituída por células achatadas contendo pequenos grânulos que coram intensamente com hematoxilina e são pois basófilas – grânulos de queratohialina e a camada superficial, constituída por células muito achatadas, as escamas, que coram com eosina e são pois eosinófilas e não contêm núcleos, que é a camada queratinizada ou *stratum corneum*. Este padrão anucleado de maturação é designado de ortoqueratinização, enquanto que no padrão de paraqueratinização se observam núcleos contraídos ou picnóticos na maior parte ou em todas as escamas, não significando no entanto que se trate de um padrão patológico.

O epitélio não queratinizado da mucosa oral encontra-se nos lábios, região jugal, mucosa alveolar, palato mole, face ventral da língua e pavimento bucal. As células do epitélio não queratinizado são ligeiramente maiores do que as do epitélio queratinizado e as pontes intercelulares ou espinhos são menos evidentes. Não existe camada granular e as células da camada superficial contêm núcleos, corando menos intensamente com a eosina do que o epitélio queratinizado.

As células da camada basal são as menos diferenciadas do epitélio bucal. Para além das organelos habituais das células de outros tecidos, contêm estruturas características que as distinguem – os tonofilamentos e as pontes intercelulares ou desmossomas. Os tonofilamentos são proteínas fibrosas sintetizadas pelos ribossomas e têm o aspecto de filamentos longos com o diâmetro aproximado de

8nm. Estas proteínas intracelulares são as citoqueratinas, características dos tecidos epiteliais.

As queratinas representam 30 proteínas diferentes com diferentes pesos moleculares, das quais as de mais baixo peso molecular existem no epitélio simples e glandular, as de peso molecular intermédio no epitélio estratificado e as de maior peso molecular no epitélio estratificado queratinizado. Todos os epitélios orais estratificados possuem queratinas de tipo 5, 14 e 15, o epitélio oral queratinizado queratinas 1, 6, 10 e 16 e o epitélio oral não queratinizado queratinas 4 e 13.

A coesão entre as células epiteliais, que lhe confere a propriedade fundamental de barreira, é assegurada por um material intercelular viscoso, constituído por complexos glicoproteicos produzidos pelas próprias células epiteliais. Para a coesão contribuem ainda a modificações das membranas celulares como os desmossomas, áreas circulares ou ovais das membranas celulares adjacentes que aderem por espessamentos intracelulares especializados (placas de adesão) nas quais se inserem feixes de tonofilamentos. Estes filamentos dobram-se em alça dentro da placa de adesão e saem, não atravessando as células adjacentes.

A adesão entre a superfície basal das células do epitélio e a lâmina basal subjacente é efectuada pelos hemidesmossomas. Os filamentos intermédios de queratina terminam na placa densa do hemidesmossoma situada no citoplasma da célula.

O sistema de ligação constituído pelos desmossomas, hemidesmossomas e tonofilamentos sustenta e dissipa as forças aplicadas sobre a superfície epitelial e é ainda complementado por outros tipos de ligação, como as junções de hiato ou tipo *gap*, que permitem a comunicação entre as células e o trânsito de iões e de pequenas moléculas entre células adjacentes, e as junções íntimas, raras no epitélio oral e que suprimem totalmente o espaço intercelular .

Os diferentes estádios de maturação traduzem-se citologicamente por diferenças de tamanho e forma e por síntese de mais proteína estrutural sob a forma de tonofilamentos, aparecimento de novas organelos e produção adicional de material intercelular. O arranjo dos tonofilamentos diverge do epitélio queratinizado no qual se organizam em feixes e formam tonofibrilhas, para o epitélio não

queratinizado no qual é disperso e menos evidente. A própria estrutura química dos filamentos de queratina varia entre camadas, consoante os diversos estádios de maturação.

A região de interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo da lâmina própria tem características de interdigitação entre papilas de tecido conjuntivo com cristas epiteliais.

Esta disposição aumenta a superfície da interface, distribuindo as forças à superfície do epitélio e facilitando as trocas metabólicas.

Os aspectos microestruturais desta lâmina basal (diferentes dos observados em microscopia óptica) são de uma camada altamente organizada com cerca de 50 nm espessura, constituída por uma camada de material finamente granular ou filamentosos, a lâmina densa, disposta paralelamente às membranas citoplásmicas das células da camada basal e separada delas por uma zona clara com cerca de 45 nm de espessura, a lâmina lúcida (Ten Cate 2001 *op cit.*). A lâmina lúcida é atravessada por muitos finos filamentos de ancoragem e dentro da lâmina densa encontram-se pequenas alças de fibrilhas finamente ligadas chamadas fibrilhas de ancoragem. As fibrilhas colagénias passam por essas alças, entrelaçando-se com a lâmina densa formando uma junção flexível.

Este arranjo complexo de lâminas e fibrilhas, como refere ainda Ten Cate, não constitui porém em termos estruturais uma membrana, sendo pois designado como complexo basal ou lâmina basal sendo todavia o termo membrana basal (MB) usado correntemente na literatura e também o será aqui. É este complexo basal que promove a junção do epitélio ao tecido conjuntivo.

A mucosa oral humana tem uma ampla variação estrutural conforme a zona considerada. Assim na face ventral da língua e no pavimento bucal assume uma estrutura de mucosa de revestimento, enquanto que na superfície dorsal da língua se encontra uma mucosa especializada.

O epitélio da mucosa de revestimento na face ventral da língua é fino ou muito fino, pavimentoso estratificado, não queratinizado, com lâmina própria fina, de papilas curtas, algumas fibras elásticas e ainda rede vascular intensa no pavimento bucal. Na face ventral da língua a submucosa é quase ou mesmo ausente, inserindo-se a mucosa sobre os músculos linguais.

Na superfície dorsal da língua o epitélio da mucosa especializada é espesso, pavimentoso estratificado queratinizado e não-queratinizado, com três tipos de papilas linguais, algumas com corpúsculos gustativos. A lâmina própria tem papilas extensas, há glândulas salivares minor na região lingual posterior, inervação abundante especialmente junto aos corpúsculos gustativos e vascularização rica. A submucosa é uma camada mal definida e a mucosa liga-se ao tecido conjuntivo que envolve os músculos da língua.

É importante referir que a camada epitelial é constituída por células funcionalmente polarizadas de forma que os seus topos basolateral e apical estão perfeitamente definidos e, de igual modo, o complexo filamentosos que é o citoesqueleto está polarizado no sentido apicobasal. Este complexo é constituído por três grandes sistemas de estruturas: os microtúbulos, os microfilamentos ou filamentos de actina e os filamentos intermédios .

1.2 Cancerigénese e progressão tumoral no cancro oral

Não é hoje possível descrever ou entender cientificamente a questão da carcinogénese sem uma ampla base de referência da biologia celular e da genética molecular.

Apesar dos acontecimentos relacionados com a cancerigénese terem uma sequência e número desconhecidos, é possível reconhecer e estão definidos alguns importantes fenómenos relacionados com a progressão tumoral (Hahn *et al.* 1999, Hanahan *et al.* 2000) todos eles interligados devendo pois ser entendidos de uma forma conjunta: aquisição de sinalização proliferativa autónoma, inibição da sinalização inibitória do crescimento, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, capacidade de invasão e metastização, angiogénese e linfangiogénese.

O modelo evolutivo de desenvolvimento tumoral maligno, através de uma transição celular baseada na acumulação de múltiplas alterações que conduzem ao fenótipo histopatológico maligno a partir de um clone celular dominante, foi proposto

teoricamente por Nowell em 1976 e tem constituído a base explicativa da progressão de muitas lesões malignas, nomeadamente o CPC oral.

Acredita-se que a progressão dos tumores malignos resulte da variabilidade entre as subpopulações de células tumorais e da selecção destas subpopulações por condições do próprio meio tumoral e ainda que a origem destas subpopulações seja a instabilidade genética das células tumorais. Os mecanismos possíveis desta instabilidade genética são diversos, uns intrínsecos das células (mutação, amplificação, fenótipos mutantes, perturbações da reparação do DNA), outros presentes no microambiente tumoral (mutagénios endógenos). Existem ainda mecanismos epigenéticos de variabilidade, incluindo alterações na regulação dos genes, diferenciação, adaptação e fusão celular (Heppner e Miller 1997).

Em 1990 foi apresentado por Fearon e Vogelstein um modelo de progressão genética dos tumores, no caso o cancro colorectal, que considera a activação de oncogenes e inactivação de genes supressores como factores de promoção de uma vantagem celular clonal de tipo ganho proliferativo, sendo a progressão tumoral determinada pela acumulação de eventos genéticos e não pela sua ordem.

De um modo primordial e baseados na verificação da possibilidade de ocorrência de múltiplos tumores na área das vias aerodigestivas superiores, Slaughter *et al.* Propuseram, em 1953, a hipótese de *field cancerization* para explicar a indução carcinogénica de exposição, ou seja a possibilidade de que toda a mucosa dessa área estaria em risco. Esta hipótese tem hoje suporte à luz dos novos conhecimentos sobre a biologia celular do cancro e da oncogénese molecular. Uma célula é transformada por um evento genético crítico e começa a migrar através da mucosa normal ou a repopular essa mucosa. Eventos genéticos adicionais podem levar ao desenvolvimento de tumor com expressão clínica.

Existe agora a indicação de que é necessária uma acumulação de pelo menos seis a dez eventos genéticos independentes para o desenvolvimento destes tumores (Renan 1993), segundo uma forma de transição *multi-step*. Foi ainda possível estabelecer uma relação clonal entre tumores múltiplos na área das vias aerodigestivas superiores (Bedi *et al.* 1996, Partridge *et al.* 2000) e que parte dos tumores primários múltiplos se podem desenvolver dentro de um mesmo campo pré-neoplásico (Tabor *et al.* 2002).

Vários trabalhos demonstraram também anomalias cromossômicas e importantes alterações genéticas, designadamente perda de cromossomas 3p, 5q, 8p, 9p, 18q e 21q (Van Dyke *et al.* 1994). Sabemos também que tecido de mucosa oral com displasia ligeira e com aspecto macroscópico normal pode conter já alterações genéticas clonais (Califano *et al.* 1996) parecendo não haver necessariamente correlação entre as alterações genéticas precoces e as alterações morfológicas. Batsakis (1979) havia referido previamente uma progressão histológica da mucosa normal até à mucosa displásica e daí ao carcinoma *in situ*.

Um vasto trabalho de investigação, mais recentemente centrado na identificação de alterações adquiridas em oncogenes e genes supressores tumorais e no relacionamento destes achados genotípicos com as alterações fenotípicas clínicas, conduziu a um modelo de progressão molecular para o CPC da cabeça e pescoço proposto por Califano, van der Riet, Westra *et al.*(1996). Este modelo suporta a ideia de que a progressão fenotípica resulta da acumulação de eventos genéticos e não da sua sequência específica.

Assim, entende-se hoje a carcinogénese, e a carcinogénese oral em particular, como uma acumulação de alterações genéticas múltiplas, quer somáticas, quer adquiridas (estas em regra por exposição a agentes ambientais, como o tabaco, álcool e vírus), originando por selecção clonal contínua uma população celular dominante a qual, por evolução selectiva suplementar, conduz a alterações na sua proliferação e comportamento local.

Num determinado momento, existem portanto no mesmo tumor maligno diferentes subpopulações celulares com diversos graus de diferenciação, proliferação e capacidade metastática, que se vão adaptando e seleccionando. Esta diversidade condiciona não só o comportamento local do tumor mas também as suas capacidades de invasão e metastização.

De igual modo se admite que o microambiente celular adjacente ao tumor também se encontra sujeito aos mesmos efeitos carcinogénicos, uma vez que apresenta igualmente perda de heterozigotia e outras anomalias cromossômicas (van der Riet *et al.* 1994). A avaliação molecular directa nas regiões circundantes ao tumor confirma a presença de populações celulares clonais que não estão ainda

completamente transformadas, podendo até ter capacidades pré-invasivas ou invasivas.

De uma forma simplista, poderíamos afirmar que o cancro é, na sua essência uma doença do ciclo celular (Pines 1995) sendo necessária para a sua formação a existência de alterações no controlo de mecanismos e vias-chave da regulação da proliferação celular.

A base conceptual da biologia molecular do cancro inclui a compreensão dos intervenientes nestas alterações, nomeadamente a mutação ou desregulação de proto-oncogenes em oncogenes e da acção dos genes supressores tumorais.

1.2.1 Oncogenes

Os proto-oncogenes são genes celulares normais que estão profundamente envolvidos na regulação do crescimento normal e diferenciação celulares (Weinberg 1995). Os sinais de estimulação mitogénica das células podem ter diversas naturezas: factores de crescimento, receptores de factores de crescimento, proteínas de sinalização citoplásmica de transdução e proteínas nucleares. Os proto-oncogenes mutados ou desregulados adquirem a capacidade de destabilizar ou desregular o crescimento celular normal e passam a oncogenes.

O oncogene pode contribuir para a transformação maligna das células. As proteínas codificadas pelos oncogenes diferem das proteínas codificadas pelos genes normais de forma qualitativa (novas proteínas na sequência) ou quantitativa (p. ex. número anormal de cópias da proteína normal) – Budillon 1995.

A activação dos oncogenes pode ocorrer de diversas formas: por aquisição de um novo promotor de transcrição, resultando numa super-expressão com aumento do produto do gene; por translocação cromosómica com desregulação de um proto-oncogene próximo dos pontos de controlo cromosómicos; por amplificação devida ao aumento do número de cópias do gene ou por mutação no gene com alteração da proteína codificada.

Os oncogenes codificam proteínas que controlam a proliferação celular, a apoptose ou ambas. Podem ser activados por alterações estruturais resultantes de mutação ou fusão de genes, por justaposição ou amplificação (Konopka *et al.* 1985, Tsujimoto *et al.* 1985). Sabe-se que as translocações e mutações podem ocorrer como acontecimentos iniciais ou durante a progressão tumoral, enquanto que a amplificação ocorre geralmente durante a progressão. A activação dos oncogenes, por rearranjos cromossómicos, mutações e amplificação, conferem às respectivas células uma vantagem de crescimento ou aumento de sobrevivência.

No CPC da cabeça e pescoço as alterações cromossómicas mais frequentes são translocações conduzindo a deleções que afectam 3p13-q24 (em 60% dos tumores), 4p (43%), 5q12-q23 (30%), 8p22-p23 (65%), 9p21-p24 (43%), 10p (39%), 13q12-q24 (30%), 18q22-23 (< 60%), e 21q (52%) (Van Dyke *et al.* 1994). A perda de X inactivo e a perda (ou rearranjo) de Y ocorre em 70% dos tumores dos doentes do sexo feminino e masculino respectivamente. Outras alterações menos frequentemente encontradas, em cerca de 30 a 40% dos tumores, são ganhos de 3q21-qter, 5p, 7p, 8q e 11q13-23 (Carey *et al.* 1993).

A perda da região cromossómica 9p21 ocorre precocemente (Califano *et al.* 1996) e o seu principal efeito é a inactivação do gene p16, um inibidor das cinases ciclina-dependentes (CDKs). A perda de função de p16 é frequentemente observada nos queratinocitos em cultura que deste modo escapam à senescência (Forastiere 2001).

As perdas alélicas nos *loci* marcadores em regiões genómicas específicas, indicando a inactivação de genes supressores tumorais críticos dentro das regiões, foi demonstrada em 3p, 5q, 9p, 11q, 13q, 18q e 17p (Ah-See *et al.* 1994, Nawroz *et al.* 1994).

No modelo de progressão genética do CPC da cabeça e pescoço proposto por Califano *et al.* em 1996 os eventos genéticos de heterozigotia indicados foram precoces em 3p, 9p21 e 17p13, intermédios em 11q, 13q11 e 14q e tardios em 6p, 4q e 8. Esta acumulação de eventos genéticos está associada com uma progressão histopatológica embora possa existir um período prolongado de latência antes do aparecimento do fenótipo invasivo (Califano 2000).

As ciclinas são proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, funcionando como subunidades reguladoras que juntamente com unidades catalíticas ou cinases ciclina-dependentes (CDKs) formam complexos ciclina - CDK, variando a sua concentração e a activação das respectivas cinases de acordo com a progressão do próprio ciclo e daí a sua designação. Os complexos ciclina-CDK que intervêm no início da fase S e na passagem de G2 à mitose são distintos e aumentando a actividade cinásica das CDKs obtém-se uma aceleração dessas fases. As células regulam a concentração de cada ciclina nos diferentes pontos do ciclo celular ajustando a taxa de síntese e a taxa de destruição da proteína. As ciclinas da mitose ou mitóticas não são todas degradadas simultaneamente mas em momentos específicos. O aumento e diminuição sucessivos na concentração de cada ciclina são determinados pela coordenação entre a sua transcrição e a sua degradação pelo proteossoma. Existe assim um duplo controlo que assegura uma concentração adequada de cada ciclina para activar o seu parceiro catalítico CDK na fase correcta do ciclo celular. Pelo contrário as células mutantes dos carcinomas não degradam as ciclinas após o início da mitose pelo que param em mitose e não reentram em G1, não se verificando o indispensável mecanismo de destruição programada das ciclinas.

A ciclina D1 tem sido particularmente estudada no contexto da carcinogénese e foi descrita como um oncogene por Motokura em 1991. É codificada pelo gene CCND1 localizado no cromossoma 11q13 cuja amplificação está associada com a amplificação de ciclina D1. A ciclina D1 forma complexos activos com as proteínas CDK 4 e CDK 6 os quais promovem a progressão do ciclo celular fosforilando e inactivando a proteína retinoblastoma (Rb). Sabe-se que a ciclina D1 também funciona como modulador transcricional, regulando a actividade de diversos factores de transcrição e da histona deacetilase (HDAC 3). É instável, com uma semi-vida curta de cerca de 24 minutos e é degradada principalmente pelo proteossoma 26S de uma forma ubiquitinadependente.

A sobreprodução da ciclina D1 pode forçar a célula tumoral através do *checkpoint* crítico da transição G1-S, ocasionando uma divisão celular incontrolada e perpetuação de outras alterações genéticas existentes. Foi encontrada amplificação do gene no CPC da cabeça e pescoço e ainda em lesões pré-

malignas, parecendo existir relação com um mau prognóstico (Berenson *et al.* 1989, Callender *et al.* 1994, Izzo *et al.* 1998, Michalides *et al.* 1995, Bova *et al.* 1999).

A degradação desta ciclina é essencial para a replicação de DNA e verificou-se que a inibia ligando-se ao antigénio nuclear de células em proliferação (PCNA) e a CDK2. A ligação da ciclina D1 ao PCNA inibe directamente a síntese de DNA (Fukami-Kobaiashi 1999).

A actividade da ciclina D1 pode ser regulada negativamente por muitos genes supressores, incluindo Rb, p16, p21 e p27 (Serrano *et al.* 1993). A avaliação da ciclina D1 tem sido efectuada com recurso a várias técnicas: imunohistoquímica, hibridização *in situ* com fluorescência e técnicas *Southern blotting* para quantificação do número de cópias. Nos carcinomas da cabeça e pescoço a ciclina D1 mostrou amplificação e sobreexpressão que se pode correlacionar com a recidiva local, metastização e um pior prognóstico de sobrevivência (Akervall *et al.* 1997, Bova *et al.* 1999, Capaccio *et al.* 1997, Kyomoto *et al.* 1997, Masuda *et al.* 1996, Michalides *et al.* 1997, Mineta *et al.* 2000, Pignataro *et al.* 1998, Bellacosa *et al.* 1996, Fortin *et al.* 1997, Gleich *et al.* 1999, Meredith *et al.* 1995).

O p63 é um membro da família de moléculas p53. Embora detenha alguma homologia com p53 tem no entanto função muito diferente. Embora considerado também regulador do ciclo celular e apoptose, tem um papel muito mais limitado do que p53 na progressão e supressão. Foi sugerido que seja o desencadeador molecular para a iniciação do programa de estratificação na morfogénese epidérmica (Koster *et al.* 2000). Esta investigadora tem estudado o papel de p63 no desenvolvimento epidérmico em modelo experimental e nas displasias ectodérmicas, verificando que a ausência de p63 determina a ausência de epiderme e de apêndices cutâneos.

O p63 codifica múltiplas proteínas com propriedades de transactivação, indução apoptótica e oncogénicas. Foi demonstrada a amplificação de p63 no CPC da cabeça e pescoço assim como a sobreexpressão dos isotipos $\Delta Np63$ e que promovem o crescimento oncogénico *in vivo* e *in vitro*.

O papel de outros proto-oncogenes no cancro oral é menos evidente, nomeadamente do *ras*, do qual foram identificadas poucas mutações, e do EGFR cujos níveis aumentados em RNA ou nível de proteína raramente correspondem a

uma amplificação primária de DNA. A proteína factor de iniciação eucariótica 4E (eIF4E) foi encontrada por PCR competitiva sobrexpressa em casos de CPC da cabeça e pescoço, e também há evidência de amplificação génica não detectável nas lesões benignas (Sorrells *et al.* 1999). Por outro lado a sobreexpressão de eIF4E pode facilitar a síntese de factores angiogénicos como o VEGFR, estimulando a sua translação (Nathan *et al.* 1999).

Outros genes ou produtos de genes foram ainda detectados sobrexpressos em CPC da cabeça e pescoço, sendo as novas técnicas de microarranjo um importante meio de identificação de proto-oncogenes com relevância nesta área.

1.2.2 Genes supressores, apoptose e evasão à apoptose

A regulação supressiva do crescimento celular é reconhecida e constitui uma parte importante do equilíbrio proliferativo celular.

O factor β de transformação de crescimento (TGF- β) é um dos factores de regulação supressiva mais referido. Algumas linhas celulares de cancro da cabeça e pescoço evidenciaram mutações do receptor de TGF- β e mutações no domínio cinase da serina.

Numa primeira fase da carcinogénese actua como um supressor, mas mais tarde pode funcionar como activador da progressão tumoral. A acção supressora é atribuída à inibição do crescimento e à estimulação da apoptose (Siegel e Massagué, 2003), mas mais recentemente foram identificadas outras acções adicionais como a manutenção da estabilidade genómica e a indução da senescência replicativa (Glick *et al.* 1996, Tremain *et al.* 2000), bem como a supressão da actividade da telomerase (Yang *et al.* 2001). Pelo contrário a capacidade de estímulo tumoral de TGF- β supõe-se relacionada com a perda da resposta inibitória, aumento da expressão e/ou activação do ligando e a uma mudança nas vias de transdução de sinal, com ênfase na actividade pró-oncogénica do ligando e aquisição de um fenótipo mais invasivo (Derinck *et al.* 2001, Roberts e Wakefield 2003).

Um dos complexos moleculares mais estudados na carcinogénese e progressão tumoral do cancro oral é o gene supressor TP53, localizado em 17p13. A proteína p53, na forma normal ou *selvagem*, é o mais importante interveniente na sinalização da transdução que regula a paragem do ciclo celular na fase G1 para que se verifique a reparação do DNA ou então a morte celular apoptótica após lesão irreparável do DNA (Lane 1992).

Os primeiros 75 aminoácidos da sequência estão envolvidos na activação da transcrição de genes específicos, e os aminoácidos 120 a 190 estão envolvidos no reconhecimento específico das sequências de DNA (Farmer *et al.*1992). Foram referidas mutações dos domínios principais (exões 5-9) em cerca de 60% dos CPCs orais, estando fortemente associadas com a acumulação de proteína detectável por métodos imunohistoquímicos (Ahomadegbe *et al.*1995). Estas mutações impedem a capacidade celular de reparar o seu DNA, o que provoca instabilidade genómica da célula cancerosa e alterações adicionais no oncogene e nos produtos do gene supressor tumoral. As mutações também impedem a apoptose em resposta à lesão do DNA nuclear, o que pode determinar por exemplo a resistência celular ao tratamento com radiações ou com agentes quimioterapêuticos com acção na lesão do DNA. Estas mutações estão presentes em quase 50% dos CPCs da cabeça e pescoço estudados (Sakai e Tsuchida 1992) ou em quase 100% de acordo com Kropveld *et al.* (1999).

O papel do TP53 na progressão tumoral do CPC da cabeça e pescoço já havia sido referido por Boyle *et al.* (1993), com mutações em 19% das lesões pré-malignas e 43% nas lesões malignas. Num estudo de investigadores do M.D. Anderson Cancer Center do Texas (Shinet *et al.* 2001) foi demonstrado um aumento das anomalias do TP53 durante a progressão tumoral, em 19% no epitélio normal, 29% nas lesões hiperplásicas, 45% nas lesões displásicas e 58% no carcinoma invasivo, bem como uma associação significativa entre a expressão de TP53 e a instabilidade genómica, sugerindo que essas alterações possam levar a uma acumulação de episódios genéticos durante a tumorigénese.

Apesar destes resultados, o significado prognóstico do TP53 no cancro oral pode ainda ser considerado como equívoco (Bánkfalvi 2000; Gluckman *et al.*1994, Tsuji *et al.* 1995, Piffkò *et al.* 1998, Stoll *et al.* 1998, Adamson *et al.* 1994, Chiang *et*

al. 1999). Deve pois referir-se que a utilidade da análise das mutações de p53 na determinação do prognóstico de sobrevivência é limitada, dado o elevado número de estudos que mostram não existir uma clara correlação entre ambos.

O sítio cromossómico que mais frequentemente apresenta deleções no CPC da cabeça e pescoço localiza-se em 9p21 que corresponde ao locus para o gene supressor CDKN2/MTS1/INK4A. O produto do gene é um inibidor do complexo ciclina/ciclina dependente-quinase, e a ausência da proteína p16 INK4a (Gonzales-Moles *et al.* 2002) bem como defeitos na expressão do gene INK4a (Grüttgen *et al.* 2001) foram encontrados em número significativo embora variável de casos, estando ainda por definir o impacto clínico destes resultados.

1.2.3 Inibição da sinalização inibitória do crescimento e aquisição de sinalização proliferativa

A proliferação celular é um dos mecanismos mais importantes da carcinogénese, revestindo-se também de um grande significado prognóstico no CPC oral. Em geral uma elevada actividade proliferativa associa-se a mau prognóstico.

O receptor do factor de crescimento epitelial (EGFR) pertence à família dos receptores transmembrana de tirosina-quinases, que inclui EGFR (HER 1 ou ErbB-1), HER2/neu ou ErbB-2, HER3 ou ErbB-3 e HER4 ou ErbB-4. Os membros desta família mostram a estrutura prototípica de domínio extracelular N-terminal, uma região transmembrana, e um domínio intracelular C-terminal. Este último contém a região tirosina-quinase bem como múltiplos sítios de fosforilação envolvidos na regulação da actividade cinase. A junção de ligandos como o factor de transformação de crescimento (TGF- α) ou EGF resulta na homodimerização com EGFR ou na heterodimerização com outro receptor Erb da família de receptores de tirosina-quinases, conduzindo à auto-fosforilação do receptor. A activação do receptor possibilita-lhe a selecção e activação de várias cascatas de sinalização tais como as

vias Ras/RAF/MEK/ERK, fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)- Akt, Stat e fosfolipase C gama (Grandis e Sok 2004). A activação destas vias promove a proliferação celular, a invasão e a angiogénese. Foi também demonstrado por Zhang *et al.* (2004) que a activação de EGFR resulta na activação da proteína Src e esta promove a invasão pelas células do CPC da cabeça e pescoço. O gene EGFR também mostrou capacidade de translocação para o núcleo, onde actua como activador de transcrição.

A amplificação do gene EGFR não é frequente, ocorrendo apenas em 15% dos casos de CPC da cabeça e pescoço (Temam *et al.* 2007).

Ao contrário, a sobreexpressão de EGFR (cujo mecanismo é complexo e foi descrita em várias neoplasias malignas - bexiga, mama, pulmão, cérebro, estômago, próstata, ovário e pâncreas (Salomon *et al.* 1995), é frequentemente encontrada no CPC da cabeça e pescoço, em que o EGFR está sobreexpresso em 90% dos casos, frequentemente também com sobreexpressão dos seus ligandos (Bei *et al.* 2004, Ongkeko *et al.* 2005). A elevação da expressão de EGFR ocorre com muita frequência através do aumento da taxa de transcrição sem aparente alteração na estabilidade de mRNA, embora nalguns casos se observe uma amplificação do gene. O controlo deste mecanismo não está ainda bem definido, embora haja evidência de que p53 selvagem pode suprimir a transcrição de EGFR em linhas celulares de CPC da cabeça e pescoço.

Desde a evidência inicial, referida por Dassonville *et al.* (1993), do valor prognóstico de sobrevivência do EGFR como factor independente numa série de 109 doentes, vários estudos demonstraram existir correlação entre a expressão de EGFR e a sobrevivência no CPC da cabeça e pescoço (Ang *et al.* 2002, Maiorano *et al.* 1998, Grandis *et al.* 1998, Bandrés *et al.* 1998). Não está ainda definido o melhor método para a quantificação da expressão de EGFR mas têm sido preferidos os métodos quantitativos por permitirem reflectir não só a expressão mas também variações na sua distribuição topográfica nos tecidos. Grandis *et al.* (1998) utilizaram IHQ quantitativa para demonstrar que níveis aumentados de EGFR e TGF- α prediziam piores intervalo livre de doença e sobrevivência numa série de 91 doentes com CPC da cabeça e pescoço tratados primariamente com cirurgia. Shin *et al.* (1994) demonstraram que a sobreexpressão de EGFR pode desenvolver-se

por estádios e se observa no epitélio normal adjacente ao tumor ao contrário do epitélio normal distante. O nível de sobreexpressão de EGFR é ainda elevado nas lesões hiperplásicas e displásicas pré-malignas, sugerindo-se um possível papel na iniciação e na promoção tumorais. A intensidade de marcação das lesões invasivas é maior o que também sugere um papel de EGFR no desenvolvimento de um fenótipo maligno. Modelos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a inibição da sinalização de EGFR pode alterar a angiogénese, a adesão, a motilidade e a invasão (Huang 2000, Milas *et al.* 2000, Genersch *et al.* 1998, Lu *et al.* 2001, O-charoenrat *et al.* 1999 e 2000, Zolfaghari 1996).

1.2.4 Telomerase e imortalização

Os telómeros são estruturas especializadas existentes na porção terminal dos cromossomas das células eucarióticas e são compostos por repetições da sequência TTAGG. Os telómeros protegem os cromossomas da quebra enzimática do DNA, da replicação incompleta e previnem recombinações e fusões aberrantes e asseguram ainda a replicação completa do cromossoma durante a divisão celular.

Os telómeros humanos das células somáticas sofrem um encurtamento progressivo durante a divisão celular, do qual resulta uma perda da sequência terminal do DNA decorrente da replicação. A perda progressiva do telómero causa senescência (Veldman *et al.* 2001, Fujimoto *et al.* 2001, Belair *et al.* 1997, Liao *et al.* 2000).

A célula pára de se dividir quando há um grande encurtamento do telómero o qual é reconhecido como um “relógio mitótico” sendo responsável pela sua capacidade replicativa celular. No entanto, há células germinativas e células tronco (ou estaminais) que escapam ao encurtamento do telómero por expressarem telomerase, uma enzima que sintetiza DNA telomérico. A telomerase, uma DNA polimerase ribonucleoproteína, contém um componente RNA que sintetiza a repetição DNA do telómero, compensando a perda dos telómeros durante a divisão celular (Liao *et al.* 2000, já citado). Sabe-se hoje que, para além das células germinativas, também outros tipo de células possuem, embora fraca, actividade

telomerase, como as da medula óssea, tecido gastrointestinal e células da camada basal da pele.

A ausência de telomerase em células normais tem como efeito a erosão progressiva do telómero, conduzindo a uma replicação incompleta, a qual determina instabilidade cromossómica e portanto tendência para mutações (Veldman *et al.* 2001, já citado). Deste modo a telomerase actuará como um factor potenciador do crescimento tumoral (Schliephake 2003).

O encurtamento do telómero é interpretado por p53 como um erro de DNA pelo que a célula é impedida de se replicar e é levada a um estado de senilidade. Como em condições normais não há telomerase na célula, ela pára de se dividir, constituindo assim um mecanismo de protecção anti-tumoral.

A telomerase exprime em 75% dos CPC orais, bem como em 80% dos carcinomas do pulmão, 84% da próstata, 85% do fígado, 93% da mama, entre outros (Belair *et al.* 1997, já citado). A expressão de telomerase parece aumentar durante a progressão do CPC oral, sendo menor nas displasias e maior nas lesões invasivas, sugerindo uma relação entre a actividade da telomerase e a carcinogénese oral.

Refira-se no entanto que, por ter sido detectada também em tecidos normais, a telomerase pode ser não só um marcador de carcinogénese mas também de proliferação.

1.2.5 Angiogénese e linfangiogénese

O estudo da angiogénese tem grande relevância dado saber-se que a capacidade angiogénica do tumor determina e permite um crescimento mais rápido

do mesmo por aumento do suporte nutricional e uma maior capacidade de disseminação.

Sabe-se de há muito que os tumores possuem uma vascularização mais exuberante do que os tecidos normais. Sabe-se ainda que a presença desta neovascularização aumentada é condição fundamental para que exista crescimento do próprio tumor e que ela se deve à formação de microvasos a partir de células endoteliais de capilares justa-tumorais. Estas observações foram referidas por Folkman no início da década de 70, que também introduziu o conceito de utilização de substâncias antiangiogénicas para limitar ou impedir o crescimento dos tumores. Folkman demonstrou ainda mais tarde (1995) que os tumores sólidos não podem crescer mais do que 2 a 3 mm de diâmetro sem terem capacidade de poderem induzir o seu próprio suprimento vascular.

A evolução do conhecimento sobre a angiogénese tumoral permitiu estabelecer que no decurso da progressão das células normais para a malignidade estas aumentam a produção de indutores da angiogénese e diminuem a produção de inibidores da mesma, quer através de uma mudança súbita para o fenótipo angiogénico, quer por transição progressiva.

A expressão do fenótipo angiogénico no tumor é um processo extremamente complexo, que também se verifica nos CPCs da área de cabeça e pescoço.

As células endoteliais têm, em condições de normalidade, um baixo ritmo de divisões celulares, comparativamente com as células epiteliais. Desta forma compreende-se que uma hipervascularização rápida na zona justa-tumoral possa ter como causa um estímulo proliferativo aumentado e que este seja determinado localmente e tenha igualmente actuação local.

Sabe-se que no CPC da cabeça e pescoço muitas moléculas capazes de induzir angiogénese são produzidas directamente por queratinocitos e pelo próprio tumor (Lingen 1999). A interleucina 8 (IL- 8) por exemplo é um factor angiogénico *major*.

É possível que o VEGF produzido pelas células tumorais aumente a permeabilidade dos microvasos locais de forma a aumentar o aporte local de nutrientes, mesmo antes do início da neovascularização. Esta difusão de nutrientes e de oxigénio no local do tumor poderia ser também facilitada pela perda de pericitos dos microvasos devido à elaboração endotelial de angiopoietina-2. Na verdade as células endoteliais exprimem angiopoietina-2 na presença de células tumorais por um mecanismo desconhecido (Holash *et al.* 1999). Por outro lado a saída de plasma e fibrina dos microvasos poderia também facilitar a quimiotaxia e o alinhamento das células tumorais e a subsequente migração de células endoteliais (Senger *et al.* 1994, Kadish *et al.* 1979).

A regulação da angiogénese é efectuada através de factores estimuladores (VEGF, bFGF – *factor de crescimento fibroblástico básico*, angiogenina, angiotrofina e TNF – *factor de necrose tumoral*) e de factores inibidores angiogénicos (trombospondina 1, regulada por p53, angiostatina e endostatina). Li *et al.* (1999) mostraram que, ao contrário do que se pensava, pelo menos um inibidor da angiogénese pode funcionar antes de que o tumor se torne neovascularizado, o que tem tido evidentes implicações na investigação das terapêuticas antiangiogénicas, nomeadamente em doentes de alto risco tumoral .

O VEGF, citocina multifuncional com actividade biológica primariamente associada às células endoteliais, é um dímero de 34 a 50 kDa de duas subunidades idênticas ligadas a dissulfetos. Tem sido o mais estudado dos potenciais mediadores da angiogénese e nos CPCs da cabeça e pescoço revela níveis elevados de expressão. Actua directamente nas células vasculares endoteliais promovendo a proliferação celular e a permeabilidade vascular e induzindo a angiogénese. Os receptores da família VEGF incluem VEGF-1 e VEGF-2 expressos no endotélio vascular e VEGF-3 no endotélio linfático.

A interacção entre as células tumorais e o estroma é aqui mais uma vez extremamente importante através da indução indirecta da angiogénese.

A libertação dos factores estimuladores da angiogénese é desencadeada por factores locais, como a hipóxia e a elevação de CO₂ ou de óxido nítrico. Quanto às proteínas inibidoras, a sua acção restringe-se à actividade angiogénica

resultante da presença de tecido tumoral, não possuindo qualquer influência negativa sobre a actividade proliferativa de células endoteliais normais.

A ciclo-oxigenase-2 (COX-2), contrariamente à ciclo-oxigenase-1, a qual é geralmente expressa em tecidos normais, é uma proteína expressa em resposta à presença de mediadores locais libertados por diversos estímulos no contexto de uma resposta inflamatória. Em tecidos colorectais por exemplo a sua expressão está associada a factores angiogénicos e formação de neo-vasos no processo de carcinogénese (Wu *et al.* 2004).

As células vasculares endoteliais podem produzir pelo menos duas dezenas de mitogénios e factores antiapoptóticos, possuindo pois potencial oncogénico. Muitas destas proteínas, como o factor de crescimento de fibroblastos e factores de crescimento epitelial, são armazenados na matriz extracelular (MEC) e podem ser mobilizados pela estimulação do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) para produzir proteases (Gerber *et al.* 1999).

Há também evidência da relação da angiogénese com o processo de metastização. É admissível que a proliferação vascular de neo-vasos com parede fragmentada, células endoteliais alongadas e disseminadas, no seio de tecido tumoral com células de baixa adesividade, constitua um factor favorável à entrada e migração celulares na circulação, quer linfática, quer sanguínea. Por outro lado, a libertação de factores angiogénicos pelas células tumorais, activando o plasminogénio e colagenases e contribuindo para a degradação da membrana basal endotelial, pode contribuir para a metastização. Há ainda evidência de que a actividade angiogénica pode influenciar decisivamente o potencial metastático do tumor, expondo-o a uma maior área de superfície endotelial e determinando assim uma maior possibilidade de disseminação hematogénea.

A valorização da angiogénese tumoral como factor de prognóstico foi iniciada pela observação de que no, melanoma maligno cutâneo, o aumento da metastização se verifica apenas já numa fase em que a neovascularização é mais importante (Srivastava *et al.* 1986).

A expressão de VEGF (e do factor de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas, PD- ECGF) correlaciona-se com a densidade microvascular (Giatromanolaki *et al.* 1998, Grabenbauer *et al.* 2000, Heindal *et al.* 1999). Foi

também encontrada correlação entre a densidade microvascular e um alto risco para recidiva regional em CPCs da cavidade oral, clinicamente N0, tratados cirurgicamente (Williams *et al.* 1994, Shpitzer *et al.* 1996). Deve porém notar-se que a densidade vascular pode ser uma medida inadequada da angiogénese tumoral no CPC oral dado que a cavidade oral é uma região altamente vascularizada .

A hiperexpressão de VEGF parece ser efectivamente indicador de mau prognóstico em diversas séries clínicas. Smith *et al.* (2000), numa série de 56 casos de CPC da orofaringe tratados com cirurgia e radioterapia complementar, encontraram uma relação da hiperexpressão de VEGF com recidiva local e risco de metastização ganglionar, constituindo um factor independente de mau prognóstico de sobrevivência em análise multivariada. Numa série de 60 doentes com estádios I a IV de CPC da cabeça e pescoço, Mineta *et al.* (2000) encontraram também uma relação da expressão de VEGF com menor intervalo livre de doença. Noutras séries de doentes mais pequenas foi possível também confirmar esta relação, embora outros estudos de maior amplitude sejam necessários para o seu esclarecimento dado haver igualmente séries com resultados não confirmatórios.

No caso do cancro oral, a questão da disseminação linfática do tumor para os gânglios linfáticos cervicais tem especial importância, constituindo um problema fulcral da evolução do tumor, com implicações directas a nível da actuação terapêutica. Daí o grande interesse que têm merecido quer o estudo da metastização linfática, quer o da própria linfangiogénese tumoral.

Os vasos capilares linfáticos diferem dos capilares sanguíneos em que, apesar de possuírem também uma única camada de células endoteliais, estas têm junções menos desenvolvidas e grandes espaços interendoteliais , para além de que são igualmente desprovidas de fenestrações. A pressão endocapilar linfática é ligeiramente superior à intersticial, pelo que a permeabilidade é mantida através de filamentos que ligam as células endoteliais à matriz extracelular perivascular. Os capilares linfáticos não possuem uma membrana basal contínua ao contrário dos capilares sanguíneos, sendo também desprovidos de pericitos. No entanto, à semelhança do endotélio vascular sanguíneo, as células endoteliais linfáticas contêm corpos de Weibel-Palade e são imunoreactivos para o factor von Willebrand e CD31.

Duas teorias pretendem demonstrar os mecanismos embriogénicos da vasculogénese e da linfangiogénese: por diferenciação local *de novo* do endotélio sanguíneo e linfático a partir dos angioblastos e linfangioblastos respectivamente, e por *sprouting* a partir de capilares sanguíneos ou de veias pré-existentes (Mc Clure 1921, Wilting *et al.* 1999).

O estudo da linfangiogénese tem sido obscurecido pelo da angiogénese, sobretudo pela falta de identificação de factores linfangiogénicos assim como de marcadores adequados do endotélio vascular linfático. Porém tal perspectiva mudou após a descoberta do primeiro factor linfangiogénico, o VEGF-C (Joukov *et al.* 1996, Lee *et al.* 1996).

O VEGF-C é um elemento da família VEGF de factores de crescimento, que produzem glicoproteínas reguladoras da vasculogénese, hematopoiese, angiogénese, linfangiogénese e permeabilidade vascular, além de muitos outros processos fisiológicos e patológicos. A família VEGF compreende VEGF-A, -B, -C e -D e ainda os VEGFs vírus Orf (também chamado VEGF-E). Os três receptores tirosina-quinase de VEGF identificados até agora são VEGFR-1, -2 e -3. VEGFR-1 liga VEGF-A e -B, VEGFR-2 liga VEGF-A, -C, -D e -E e VEGFR-3 liga VEGF-C e -D. Os VEGFRs diferem quanto aos mecanismos de regulação e padrões de expressão. Assim por exemplo VEGFR-3 exprime largamente na vascularização embrionária mas em estádios mais tardios e na fase pós-natal restringe-se ao endotélio linfático.

VEGF-C é sintetizado como uma pré-proteína, sendo geradas através de um processo proteolítico progressivo várias formas que têm sequencialmente afinidade aumentada para activar VEGFR-2 e VEGFR-3 (Joukov *et al.* 1997).

A expressão de VEGFR-3 no endotélio linfático na região do tumor primário correlaciona-se de forma significativa com a metastização linfática regional, sugerindo que a linfangiogénese pode aumentar a possibilidade de disseminação ganglionar linfática (Moriyama *et al.* 1997). Shintani *et al.* (1994) referiram que os CPCs orais com alta densidade vascular mostravam uma alta frequência de metástases linfáticas e tinham pior prognóstico.

O VEGF-C, com base no seu perfil de expressão e na sua ligação a VEGFR-3, foi relacionado com o desenvolvimento do sistema linfático (Kukk *et al.* 1996).

Parece ser no organismo adulto normal um factor linfangiogénico, enquanto que VEGFR-3 está restrito ao endotélio linfático.

Um dos principais obstáculos para o estudo da linfangiogénese tumoral tem sido a falta de marcadores específicos para o endotélio linfático que permitissem distinguir entre linfáticos e vasos sanguíneos. A identificação de novos marcadores linfáticos como o LYVE-1 (Banerji *et al.* 1999 e Prevo *et al.* 2001) e o anticorpo monoclonal D2-40 (Marks *et al.* 1999 e Schacht *et al.* 2005) permitiram marcar selectivamente o endotélio linfático, permitindo a identificação específica de vasos linfáticos em amostras em bloco de parafina .

Há um conjunto de evidências que correlacionam a expressão de VEGF-C com a linfangiogénese e ainda com a metastização ganglionar num grupo de situações tumorais (tiroideia, próstata, estômago, cólon e recto e ainda pulmão) – Bunone *et al.* 1999, Tsurusaki *et al.* 1999, Yonemura *et al.* 1999, Akagi *et al.* 2000, Niki *et al.* 2000, Ohta *et al.* 2000). No entanto ainda não foi demonstrado um papel directo de VEGF-C na linfangiogénese tumoral e na metastização, estando por esclarecer algumas questões importantes , tais como a relação da hiperexpressão de VEGF-C com a densidade dos vasos linfáticos (linfangiogénese) e a consequente metastização linfática, a eventual diferença fenotípica dos neolinfáticos tumorais com os linfáticos normais, a possível existência de outras funções de VEGF-C que possam ser promotoras de metastização ganglionar (factores tróficos, mitogénicos ou quimiotáticos?) e ainda se os linfáticos são meros canais de passagem para as células tumorais ou se, pelo contrário, as suas funções de adesão e de transporte são moduláveis. Para o esclarecimento destas questões, é necessário, nesta fase dos conhecimentos, efectuar uma investigação mais aprofundada.

1.2.6 Invasão e metastização

O processo de invasão local e de metastização do tumor não é um processo simplesmente mecânico: implica em primeiro lugar a perda de adesão intercelular e depois a ligação das células tumorais à membrana basal, a proteólise da matriz extracelular (MEC) e finalmente a migração das células.

A MEC, compartimento tecidual complexo formado por uma enorme variedade de moléculas dos espaços intercelulares, pode ser subdividida em dois territórios: o *compartimento intersticial* com um papel fundamentalmente estrutural e particularmente abundante nos tecidos conjuntivos, e o *compartimento pericelular* o qual se relaciona com vias de modulação do comportamento celular nomeadamente fenómenos de adesão, migração, proliferação/apoptose e diferenciação.

Os grupos de moléculas constituintes da MEC são os colagénios, os componentes do sistema elástico, as proteínas multifuncionais e os proteoglicanos / glicosaminoglicanos.

A MEC deve ser entendida como um dos vectores de transmissão de informação entre as células uma vez que existe uma reconhecida interacção biunívoca células – matriz e as suas funções estendem-se muito para além de um papel meramente estrutural, podendo ainda modificar a expressão genética das células que com ela contactam e assim influenciar a sua diferenciação (Cidadão e Rodrigo 2005) .

As células epiteliais utilizam dois sistemas de adesão: as caderinas , família de proteínas de membrana que medeiam a adesão célula-célula homotópica, e as integrinas, família de receptores heterodiméricos que formam adesões entre as células e a MEC. Ambos os sistemas de adesão sofrem no processo de invasão alterações importantes.

As células epiteliais assentam na membrana basal e a biologia dos queratinocitos é dependente da MEC.

Sabe-se hoje que o papel desempenhado pela MEC não é apenas de barreira à invasão tumoral, sendo também um reservatório de proteínas e de factores de crescimento que interferem no comportamento celular. À medida que as células perdem o seu contacto recíproco surgem novas interacções célula-MEC,

em consequência das quais várias moléculas de adesão associadas à superfície mudam a sua função e iniciam sinalização que favorece o crescimento, a motilidade celular, a degradação da MEC e a metastização.

A interacção das células tumorais com a MEC é um processo complexo que envolve a intervenção de diversos factores, a saber:

1.2.6.1 Proteínas de adesão e perda de adesão celular.

As células epiteliais dependem de junções de adesão entre si ou entre si e a matriz conjuntiva, para se constituírem as suas camadas estratificadas.

As junções aderentes e os desmossomas unem as células entre si e as proteínas de adesão pertencem à família das caderinas. As adesões focais e hemidesmossomas ligam as células à matriz extracelular e as proteínas de adesão transmembrana pertencem à família das integrinas .

As células tumorais não necessitam de ancoragem para se dividirem, ao contrário das células normais. Permanecem unidas entre si mediante proteínas de adesão como a E-caderina, a qual pode impedir a invasão celular tumoral . Kramer e Kantak em 1998 demonstraram o papel da adesão intercelular mediada pela E-caderina na protecção do CPC oral da anoiquia ou seja da apoptose das células não ancoradas à basal, mecanismo esse todavia não bem esclarecido. Em 2004 Kramer e Shen sugeriram um novo mecanismo de sobrevivência celular mediada pela adesão, que designaram de sinoiquia, consistindo na transactivação de EGFR e muito provavelmente relacionado com a formação de um complexo EGFR-E-caderina nas junções intercelulares . A activação de EGFR compensaria a perda de sinais da integrina, suprimindo assim a anoiquia.

A perda de função ou de expressão das caderinas determina a perda de adesão inter-celular, o aumento da motilidade das células e a sua libertação do tumor , propiciando a invasão. Carcinomas bem diferenciados exprimem níveis altos de E-caderina e, ao contrário, os pouco diferenciados têm níveis significativamente baixos de expressão (Wu *et al.* 2000). A expressão de E-caderina não parece ter relação nem como o tamanho nem com o estágio do tumor, mas os doentes com

níveis tumorais elevados desta proteína parecem ter melhor prognóstico de sobrevivência (Mattijssen *et al.* 1993, Chow *et al.* 2001). A perda de E-caderina pode ainda ser relacionada com o fenótipo metastático das linhas celulares de CPC oral (Nakayama *et al.* 1999) e com a metastização dos carcinomas da cabeça e pescoço (Schipper *et al.* 1994). Isto sugere, como notam Ziober *et al.* (2001) que nalguns casos as células tumorais, possivelmente sob estimulação pelas citoquinas, podem temporariamente não ligar-se a caderinas, permitindo assim que ocorram metástases à distância, seguindo-se uma re-expressão da caderina. Alternativamente, o complexo juncional de E-caderina poderia estar presente mas ser disfuncional, permitindo a dissociação das células invasivas.

As cateninas, grupo de proteínas citoplásmicas que formam complexos com as caderinas, intervêm no processo de adesão inter-celular. No CPC oral os níveis de catenina estão na relação inversa da diferenciação tumoral (Lo Muzio 1999).

Esta área de investigação, dirigida para a definição do papel das caderinas e das cateninas na metastização do cancro oral continua a estar actualmente muito activa, sobretudo pela possibilidade potencial de interferência ou inibição destes processos.

A molécula de adesão CD44 tem mostrado ser um factor fundamental de adesão inter-celular e das interacções inter-celulares. A perda de expressão de CD44 no epitélio não-tumoral adjacente ao CPC lingual pode ser considerada como um acontecimento precoce da carcinogénese (González-Moles *et al.* 2004) o que lhe confere um indubitável significado biológico. Por outro lado, numa série de casos de CPC do bordo lingual estudada por Fonseca *et al.* (2001) os investigadores concluíram que o padrão de intensidade de imunoexpressão de isoformas CD44, v3, v4-5 e v6 na FIT está muito relacionada com o grau tumoral, o tipo de invasão do estroma e a presença de metástases cervicais.

1.2.6.2 Adesão da célula tumoral à MEC e integrinas.

As células desprendidas do tumor vão aderir em primeiro lugar à MEC, mecanismo mediado pelas integrinas, moléculas da superfície celular que funcionam como transdutores bidireccionais dos sinais intra e extracelulares, modulando assim potencialmente a invasão celular. As integrinas reconhecem a MEC e transmitem mensagens às células tumorais, conduzindo à degradação das barreiras da MEC e à invasão.

O princípio da dependência de ancoragem, fundamental para as células normais, não prevalece para as células tumorais, pelo que essa adesão não é indispensável para a multiplicação celular.

As integrinas são membros de uma larga família de receptores de superfície celular que medeiam as interações adesivas das células com as macromoléculas da MEC. Fornecem uma ligação entre o citoesqueleto celular e o ambiente extracelular. Cada integrina é composta por uma sub unidade α e uma subunidade β , sendo este emparelhamento de cadeias necessário para o transporte do receptor à superfície celular e para a formação do sítio de ligação do ligando extracelular, localizado perto da região aminoterminal das subunidades (Ziober *et al.* 2001).

As principais integrinas com expressão alterada no CPC são a $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1/ \alpha 6\beta 4$ e o grupo dos complexos αv .

A integrina $\alpha 6\beta 4$ tem sido objecto de grande interesse investigacional por ser determinante na mobilização de células e no processo de invasão do CPC, dado que tem de ser primeiro libertado dos estáveis complexos de adesão hemidesmossoma para que o mesmo se desencadeie e, interagindo com a laminina, pode activar diversas vias desse processo. Em estudos com IHQ desta integrina no CPC da cabeça e pescoço foi demonstrado um padrão de marcação mais difuso do que na mucosa oral normal (Carey *et al.* 1993). Níveis aumentados da expressão de $\alpha 6\beta 4$ foram relacionados com recidiva precoce e metastização (Wolf 1992). A integrina $\alpha v\beta 5$, que tem aliás pouca expressão no CPC da cabeça e pescoço, poderia ter igualmente um papel importante no cancro oral.

Para além de proporcionarem essas funções de tipo adesivo e de migração celular, as integrinas podem também intervir em diversas propriedades celulares,

como o crescimento, apoptose, angiogénese, produção de proteinases e expressão de genes, pelo que possuem um grande potencial de condicionamento .

As integrinas poderiam também ter como função alinhar proteínas de adesão como a fibronectina, com componentes do citoesqueleto, como a actina e a talina, alterando assim a forma das células tumorais e facilitando deste modo a sua passagem entre as diversas estruturas da MEC.

Trata-se pois de estruturas glicoproteicas muito complexas cujo papel na invasão tumoral é reconhecido mas a necessitar de trabalhos suplementares de esclarecimento da função das suas subunidades e das combinações destas.

As lamininas são uma família de grandes glicoproteínas constituídas por uma subunidade α , β e γ . Foram identificadas pelo menos 15 combinações destas subunidades, mas a laminina mais estudada tem sido a laminina 5 ($\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$).

As lamininas são componentes da membrana basal e formam hemidesmosomas com as integrinas para controlar a adesão celular, motilidade, polaridade e proliferação .

Kainulainen em 1998 referiu na sua Tese (num contexto mais abrangente que envolveu o estudo de diferentes integrinas epiteliais, MMP 1 e 2 e seus inibidores TIMP 1,2 e 3) os resultados do estudo da expressão de laminina-5 e ainda do colagénio tipo VII no Líquen plano oral, displasias epiteliais e CPC oral. Encontrou uma síntese anormal de laminina-5 e colagénio tipo VII no CPC oral e ainda um padrão de expressão focalmente alterado nas lesões pré-cancerosas orais, concluindo que a laminina-5 poderia ter um papel importante na migração celular epitelial e/ou adesão do CPC.

A expressão de laminina- 5 foi também correlacionada com a progressão do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo na laringe (Nordemar *et al.* 2001) e com o padrão infiltrativo de crescimento do CPC da língua (Ono *et al.* 1999). Iguamente foi confirmada a diminuição da sobrevivência aos 5 anos dos doentes com elevada expressão de laminina-5. Foi ainda encontrada relação entre a laminina-5 $\gamma 2$ e a recidiva de CPC da língua (Stoltzfus *et al.* 2004).

1.2.6.3 Proteólise da matriz extracelular, MMPs, migração celular e metastização

A proteólise da MEC é um passo crítico da invasão tumoral, designadamente no CPC oral, ao qual se segue a ruptura da membrana basal do epitélio e a conseqüente migração celular, intravasão e metastização .

A área de investigação das proteinases relacionadas com o cancro oral e dos seus inibidores específicos é muito vasta e activa e já não é recente, o que traduz bem a percepção que desde sempre existiu do seu papel primordial .

No entanto ainda subsistem controvérsias quanto ao mecanismo proteolítico propriamente dito.

Os conhecimentos actuais sugerem que as células tumorais ultrapassam a barreira colagénia mobilizando sistemas proteolíticos que dissolvem a matriz não sendo indispensável um papel específico para cada proteinase (Matrisian *et al.* 2003). Também foi proposto que mesmo com a hidrólise da MEC inibida as células tumorais podem adoptar um fenótipo amebóide sendo a migração processada apenas de forma mecânica (Friedl e Wolf 2003).

As metaloproteinases constituem uma superfamília de enzimas proteases altamente reguladas por factores de crescimento, hormonas, oncogenes, citoquinas e que em comum têm o facto de requerer o ião metálico Zinco para a sua activação. Participam da remodelação da matriz extracelular e dos componentes da membrana basal, processo essencial na invasão e na metastização (Liotta *et al.* 1980, Tryggvason *et al.* 1987, Chambers e Matrisian 1997) e já foram detectadas em humanos vinte e três MMPs. Dividem-se em grupos que se baseiam na especificidade do seu substrato, semelhanças na sequência e organização do domínio. Classificam-se em seis grupos: colagenases intersticiais (MMP-1, 8 e 13) que intervêm na degradação do colagénio fibrilhar; gelatinases (MMP-2 e 9) que actuam sobre o colagénio intersticial, colagénio tipo IV e V da membrana basal; estromelinas (MMP-3, 10 e 11) produzidas pelas células estromais; as metaloproteinases associadas a membrana (MT1-MMP a MT6-MMP) que podem unir-se à membrana celular quer por intermédio de um sítio hidrófobo independente do domínio hemopexina ou por via do glicosilfosfatidilinositol (GPI) intervindo na activação proteolítica de outras MMPs; as matrilisinas (MMP-7 e 26), as mais

simples, estruturalmente, já que não contêm domínio homólogo da hemopexina e são expressas especificamente por células tumorais de origem epitelial, cujos espectros proteolíticos são diversos mas incluem a fibronectina e a gelatina; e ainda um grupo heterogéneo de metaloproteinases (MMP-12, 19, 20, 21, 22, 23/B e 28) cujo papel na invasão tumoral não está ainda bem esclarecido.

O papel das MMPs na invasão tumoral e na metastização tem sido largamente estudado, definindo-se para além da degradação da matriz extracelular (Kumamoto *et al.* 2003, Pinheiro *et al.* 2004), uma intervenção na proliferação celular e libertação de factores de crescimento, promoção da angiogénese, migração celular e modificação da matriz extracelular expondo sítios ocultos.

Este conjunto complexo de classes enzimáticas é estreitamente regulado por uma série de passos de activação e de inibidores específicos. Muitos destes enzimas e inibidores são fornecidos na frente invasiva tumoral pelas células do estroma e não pelas células tumorais, demonstrando assim a interdependência tumor-hospedeiro (Sternlicht *et al.* 1999).

A importância das MMPs na mediação dos processos de invasão local e de metastização em relação com o CPC oral é conhecida e foi definida em relação com algumas delas.

Kusukawa *et al.* publicaram em 1993 resultados que correlacionavam a expressão do enzima, também designado colagenase tipo IV 72-kD, com a metastização ganglionar cervical e com a invasão vascular e linfática em doentes com cancro oral. Sutinen *et al.* (1998) verificaram o aumento da expressão de MMP-2 numa série de 10 casos de CPC oral, em comparação com 6 lesões displásicas epiteliais, dados confirmados noutros trabalhos ulteriores (Tokumaru *et al.* 2000, Ikebe *et al.* 1999).

A MMP-3 (ou estromelisina-1) degrada a laminina, fibronectina e o colagénio tipo IV. Em trabalhos de 1991 (Polette *et al.*, Muller *et al.*) com uso de hibridização *in situ* e *Northern blot* respectivamente, foi identificado o enzima e confirmada a sua hiper-expressão em duas séries de casos de cancro oral. Kusukawa em 1995 havia encontrado, por imunohistoquímica, a sua expressão concentrada na chamada frente invasiva do tumor, o que tem muito significado, e em 1996 publicava resultados referindo a sobre-expressão de MMP-3 em cerca de metade dos casos

de cancro oral estudados, bem como a sua associação com um maior T e pior estado ganglionar cervical.

Em trabalhos preliminares de Juarez *et al.* (1993) foi confirmada a presença da protease MMP-9 (colagenase tipo IV 92-kD) no CPC invasivo da cavidade oral, depois confirmada em investigação de Charous *et al.* (1999) e de Pickett *et al.* (1999). A existência de aumento de actividade de MMP-9 está associado a invasividade do cancro oral (cf. Ikebe 1999) e, ao contrário, a supressão da sua actividade diminui a invasividade do CPC da língua (Baba *et al.* 2000). Riedel *et al.* (2000) verificaram que o aumento de expressão de MMP-9 está relacionado com o aumento da densidade microvascular e com aumento de VEGF, o que pode apontar para uma acção conjunta na angiogénese tumoral. Este facto tem o maior interesse dado abrir a possibilidade de utilização de inibidores de MMP no bloqueio da invasão e do processo angiogénico.

A regulação intracelular das MMPs é efectuada por várias moléculas, das quais as mais importantes descritas são os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Há quatro tipos de TIMPs, as quais são produzidas por vários tipos celulares: fibroblastos, queratinocitos, células endoteliais e osteoblastos. Todas as TIMPs são capazes de inibir todas as MMPs (Woessner 2000).

A remodelação tecidual associada à progressão tumoral baseia-se numa relação complexa entre pelo menos três categorias de moléculas : receptores de adesão, MMPs, citocinas e factores de crescimento. A regulação coordenada das MMPs e dos seus inibidores governam a clivagem, libertação de factores de crescimento e receptores de superfície da célula. Os factores de crescimento por sua vez controlam a expressão das MMPs.

Sabe-se que participam de forma dinâmica na regulação da proteólise e são em regra produzidos pelas células do estroma peritumoral, sendo a remodelação da matriz extracelular no processo de invasão o resultado da acção concertada das MMPs e TIMPs (Sutinen 1998).

1.2.6.4 Migração celular invasiva e transição epitelial-mesenquimatosa.

O epitélio está por sua vez em relação com o mesenquima, constituído por fibroblastos, microvasos e células linfáticas, cuja influência na carcinogénese epitelial é reconhecida (Stoof *et al.* 1994). Sabe-se que alterações genéticas nas células do estroma podem conduzir a produção aberrante de proteínas e erros na sinalização ocasionando ruptura na comunicação entre o epitélio e o estroma (Mueller *et al.* 2004, Mc Cawley *et al.* 2001, Edlund *et al.* 2004, Weber *et al.* 2005). Está descrita no cancro oral e das vias aerodigestivas superiores uma alta frequência de perda de heterozigotia / desequilíbrio alélico nas células do estroma, por vezes maior do que no epitélio, traduzindo a possibilidade de que um menor número de alterações - chave genéticas epiteliais poderá ser necessário para iniciar o CPC, conforme referem Weber *et al.* (2007) no seu importante trabalho, o que já havia sido sugerido por Gotte *et al.* (2005). Ainda conforme referem Weber *et al.*, a multiplicidade das alterações do estroma ao longo da carcinogénese sugerem que estas poderão ter o papel principal, influenciando a diversidade biológica e, dessa forma, o curso clínico da doença. O estroma pode ainda ter um importante papel na metastização, referindo Weber *et al.* (2007) um conjunto de observações que suportam esta hipótese, nomeadamente a de que dois de três *loci* críticos, em 3p26.3 e 19q13.31, no estroma se relacionam com o aumento de estágio pN.

Todavia esta relação do epitélio com o mesenquima é mais complexa e vasta, sabendo-se que existe entre os dois uma comunicação bidireccional cujo estudo se revela da máxima importância para o esclarecimento do processo de invasão tumoral e de metastização.

Assim é um facto reconhecido que na maior parte dos carcinomas a progressão tumoral se acompanha da perda de diferenciação epitelial das células tumorais e a sua conversão num fenótipo mesenquimatoso, processo designado de transição epitelial – mesenquimatosa (EMT). Hay e Grennburg (1982) foram os primeiros a descrever a EMT como um processo distinto e as diferenças entre esse movimento na embriogénese e na tumorigénese foram depois assinaladas por Hay em 2005. A EMT foi originalmente identificado durante estádios específicos do desenvolvimento embrionário nos quais as células espiteliais migram e colonizam

diferentes territórios embrionários. Depois disso levou algum tempo a ser reconhecido como um mecanismo potencial de progressão do carcinoma, especialmente porque a EMT não pode ser seguida no tempo e no espaço nos tumores humanos, como refere Thiery (2002), que acrescenta a grande diversidade da organização celular dos tumores humanos como causa da impossibilidade do reconhecimento da EMT sem ambiguidade.

No decurso deste processo de EMT as células perdem os seus marcadores epiteliais, como a E-caderina, e adquirem expressão de marcadores mesenquimatosos, como a N-caderina e a vimentina.

À medida que os mecanismos de regulação da EMT começaram a ser identificados, diversos marcadores moleculares adquirem significado, como o aumento da expressão de N-caderina e vimentina, localização nuclear de β -catenina, aumento da produção de factores de transcrição como Snail 1 (Snail), Snail 2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 e/ou E47 que inibe a produção de E-caderina (Lee *et al.* 2006) além de muitos outros como MMP-3, BCL9-2, EGFR, Met, Kaiso, TGF- β , GSK-3 β , entre outros. Thiery (2002) sublinha ainda que a evidência mais forte do envolvimento da EMT na oncogénese é a capacidade de muitos destes reguladores aumentarem a progressão tumoral e/ou a metastização. Não sendo pois um requisito para a invasão e metastização, a EMT pode ter um papel importante em ambos os processos.

A chave patológica da EMT é a redução da força de adesão célula-célula pela repressão transcricional das caderinas (fundamentalmente da E-caderina), ocludina e claudina e ainda da desmoplaquina, com dissolução de junções, separação das células, perda da polaridade apical-basolateral e aquisição de uma forma celular mais fusiforme, o que no conjunto facilita a dispersão e a migração celulares . Associadamente a perda de função de E-caderina pode promover a invasividade, como foi demonstrado em diversos sistemas experimentais quer *in vivo* quer *in vitro* (Behrens *et al.* 1989, Le *et al.* 1998, Zheng *et al.* 1998).

Embora esta aquisição de um fenótipo mesenquimatoso pelas células tumorais possa ser um aspecto importante da progressão e metastização, há por outro lado outro grupo de evidência sugestiva de que muitos carcinomas não

seguem esta aquisição de forma completa ou até mesmo nem sequer passam pela EMT. Na verdade muitos carcinomas avançados possuem características morfológicas e moleculares indicativas de uma boa diferenciação epitelial (incluindo níveis altos de expressão de E-caderina), junções epiteliais e polaridade apical-basolateral.

As explicações para este facto podem ser uma transição parcial para um fenótipo mesenquimatoso, reversão ao fenótipo epitelial (transição mesenquimatosa - epitelial) por exemplo após colonização metastática à distância, ou ainda por migração celular colectiva, ou seja, invasão em agregados multicelulares ou conjuntos de células (Christiansen JJ *et al.* 2006).

Sahai (2005) que tem estudado os mecanismos de invasão da célula cancerosa, usou um modelo organotípico *in vitro* para avaliar a invasão das células do CPC, tendo encontrado de forma clara invasão colectiva em cordões, semelhantes à encontrada nas margens dos CPCs. Nestes cordões invasivos as células mantêm as junções célula - célula e muitas outras características epiteliais. O papel dos fibroblastos do estroma na promoção da invasão dita colectiva foi também estudado por Gaggioli e Hooper (2007), tendo verificado que os fibroblastos são as células condutoras do processo invasivo, remodelando a MEC através da criação de trilhos que as células tumorais depois seguem. Em trabalhos subsequentes Sahai (2007) verificou que diferentes tipos celulares dentro de um tumor podem cooperar na mediação da invasão colectiva, com diversas vias para a regulação do citoesqueleto e a adesão celular nos fibroblastos condutores e nas células tumorais.

Recentemente ainda Wicki e Christofori (2006) demonstraram também o papel da podoplanina (uma pequena proteína transmembrana mucina-like) no processo de migração colectiva, mas independente da EMT a qual não é suprimida, podendo a sua expressão ser modulada pelo microambiente do tumor.

Numa perspectiva morfológica da invasão singular, célula-a-célula, que se poderá designar como amebóide, descrevem-se nas células invasivas alterações que se traduzem pela formação de estruturas subcelulares especializadas designadas podosomas, num conjunto de eventos que merecem um interesse particular.

Kramer em 1986 referiu, num trabalho experimental e precursor sobre a invasão da membrana basal por células tumorais humanas, que as células invasivas mostravam uma frente contendo filopodia e lamelopodia, e acrescentava que a extensão activa destas áreas especializadas na superfície da membrana parecia representar o mecanismo principal de penetração na matriz. As projecções celulares profundamente infiltrantes da membrana mostravam contacto íntimo com a matriz, enquanto que outras zonas distintas se mostravam livres, sugerindo que as projecções celulares penetrantes da matriz o fariam por hidrólise das suas macromoléculas. Qualquer que fosse o mecanismo parecia que o processo invasivo necessitava da destruição e dissolução da matriz, uma vez que não havia compressão ou distorção da mesma.

Estas projecções, invadopodia, podem funcionar em função da invasão da membrana basal e das diversas matrizes conjuntivas, havendo várias células normalmente invasivas como os leucócitos polimorfonucleares, os osteoclastos, os trofoblastos, as células endoteliais capilares e outras.

São constituídas por uma rede de microfilamentos que utilizam proteases para degradar substratos como a fibronectina, laminina, colagénio e ainda outros componentes da matriz. Foram ainda identificados outros enzimas de membrana como componentes essenciais destes elementos, que incluem serina-proteases, seprase, dipeptil peptidase IV e MT-MMP (Nakahara *et al.* 1997). A membrana plasmática das invadopodias introduz o conteúdo de vesículas que contêm MMP-9 e MMP-2 na proteólise direccionada da MEC no decurso da migração, especialmente durante a invasão por parte das células cancerosas (Nguyen *et al.* 1998, Lorenz *et al.* 2004).

A cascata enzimática está confinada à superfície celular no ponto de pseudopodia invasiva, ligando os enzimas aos locais de adesão, receptores de superfície e moléculas adjacentes da MEC (Bowden *et al.* 1999, Nakahara *et al.* 1997, Hoegy *et al.* 2001). MT1-MMP, molécula duplamente receptora e activadora, contém uma sequência transmembrana-citoplásmica que a confina aos locais de microinvasão na superfície das invadopodia das células tumorais. Em complexo com um dos inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMP-2) torna-se receptor e activador de MMP-2 (como mostraram Nakahara e cols. 1997, trabalho citado)

uma MMP solúvel produzida pelos fibroblastos e células endoteliais do estroma. A proteólise das proteínas da MEC modifica a ancoragem mediada por integrinas, as adesões focais e a arquitectura do citoesqueleto, activando ainda moléculas de sinalização como a cinase de adesão focal (FAK).

Conforme refere Liotta (2001) estes complexos heterotópicos dirigem-se e limitam o campo enzimático ao ponto celular invasivo, deixando intactos os pontos periféricos e distais de ligação necessários para a tracção. À medida que a célula invasiva se desloca através da barreira da MEC os complexos enzimáticos, os inibidores e os receptores moleculares desencadeiam o processo de proteólise, podendo a direcção da invasão celular e da migração ser influenciados por quimioatração (HGF, fragmentos proteolisados da matriz reconhecidos pelas integrinas ou ainda citocinas e factores de crescimento como EGF e factores de transformação do crescimento como TGF- β libertado pela matriz degradada) e pela construção de vias de adesão preferenciais.

Resumindo pode dizer-se, conforme Friedl (2004), que os modos de migração celular invasiva colectiva e singular representam estados temporários que se podem interligar, conforme o reportório molecular interno das células e os factores circundantes. Do ponto de vista da progressão tumoral há evidentes vantagens na migração colectiva sobre a singular, dado que uma maior massa tumoral pode suscitar altas concentrações autócrinas de factores prómigratórios e proteases da matriz e proteger as células mais internas da infiltração linfocitária. O grupo celular funciona colectivamente, pelo que células de diferentes filiações clonais podem funcionar em conjunto, tipo “clone misto”. Na circulação linfática e sanguínea são mais eficientes na embolização e sobrevivem melhor na metastização em ambiente hostil. Existe pois ainda uma vasta área de investigação quanto à determinação do papel da invasão singular face a estes novos conceitos de invasão colectiva.

1.2.6.5 Infiltração linfocitária peritumoral e resposta imune.

Num outro nível de análise do processo de invasão e progressão tumorais, é muitas vezes demonstrável uma infiltração intra e peritumoral por células imunitárias (predominantemente linfócitos T CD4+ e CD8+ e células apresentadoras de antigénio como células dendríticas e macrófagos) mas também outras células como granulócitos e *mast cells*. Este facto tem determinado uma investigação mais aprofundada das interacções do tumor com o estroma, nomeadamente quanto às suas influências no tumor primário, os efeitos de supressão ou de activação do microambiente peritumoral, a identidade e origem das células do estroma induzidas no tumor ou recrutadas para o tumor, bem como a sua influência na progressão tumoral, a natureza da vigilância imune sobre os tumores autóctones e as interacções do tumor e das células estromais sobre as matrizes extracelulares.

Há evidência de que o sistema imunitário tem a capacidade de eliminar células tumorais e a indução de uma imunidade tumoral efectiva pode ser encarada como um processo em três passos: apresentação de antigénios associados ao tumor (TAAgs), selecção e activação de células T específicas de TAAg e de efectores não-Ag-específicos e finalmente condução de células TAAg-específicas ao tumor e eliminação efectiva de células malignas exprimindo TAAgs. Os tumores malignos podem escapar à vigilância imunitária devido a alterações e à modulação destes diversos processos.

O estabelecimento de uma resposta anti-tumoral é um processo complexo. Inicialmente verifica-se o reconhecimento de péptidos tumorais pelas células T circulantes e permeadas no tumor. Por outro lado as células tumorais falham a produção de moléculas co-estimuladoras da expansão clonal de células T, a produção de citocinas reguladoras - chave e o desenvolvimento no tumor de linfócitos T citotóxicos específicos.

As células dendríticas são cruciais no estabelecimento da resposta imune mediada por célula e a sua função no cancro envolve vários processos biológicos sequenciais: apresentação de TAAg e reconhecimento nos tecidos que envolve proteólise intracelular e representação de péptidos de superfície; activação e condução aos gânglios linfáticos regionais do tumor e interacção com linfócitos T

CD4 através dos receptores e de moléculas associadas co-estimuladoras (CD 40, CD 80 e CD 86) resultando na produção de linfócitos T citotóxicos antigénio - específicos; e finalmente migração de linfócitos T citotóxicos para o tumor e indução de morte celular da célula tumoral. As células dendríticas migram através dos tecidos e infiltram os tumores onde encontram antigénios associados os quais capturam, digerem e re-exprimem para a indução da resposta imunitária mediada por célula, têm a capacidade de activar células T naíve nos gânglios linfáticos regionais e de as diferenciar em linfócitos T citotóxicos que interagem especificamente com as células cancerosas do tumor causando lesão celular e morte, e finalmente o seu papel como células apresentadoras de antigénios e a sua capacidade de processar e apresentar simultaneamente um conjunto de antigénios permitindo a indução de uma ampla resposta imune anti-tumoral (Satthaporn *et al.* 2001).

O escape à vigilância imunitária parece ser um aspecto crítico da evolução da doença maligna. Estes defeitos da resposta imune parecem ter predominantemente que ver com a função supressora celular. Todavia o papel das células dendríticas neste complexo processo ainda não está bem esclarecido. Sendo previsível uma disfunção das células dendríticas em relação com os tumores malignos, as suas causas e mecanismos parecem ser heterogéneos e carecem de um esclarecimento mais aprofundado.

As células tumorais têm por seu lado a capacidade de escapar ao controlo do sistema imunitário do hospedeiro, o que se deve principalmente ao facto de poderem manifestar baixa imunogenicidade devido a defeitos no processamento e apresentação de antigénios, expressão baixa ou ausente do complexo *major* de histocompatibilidade classes I ou II ou baixa expressão de diversos antigénios tumorais específicos (Gabrilovich *et al.* 1996). Foi também demonstrado que as células cancerosas podem também evadir o ataque do sistema imunitário através da expressão de citoquinas imuno supressoras como interleucina (IL)-10, TGF- β 1 e VEGF, que induzem defeito na célula imune e defeito na resposta imune do hospedeiro.

1.3 Metastização ganglionar cervical do cancro oral

O conhecimento do processo patológico de metastização teve historicamente uma curiosa evolução e nem inicialmente o próprio Virchow, mentor da base celular da tumorigénese, o entendeu bem dado que o considerava um processo de disseminação de “fluidos tóxicos” através do pulmão em caminho para outros órgãos. Foi todavia este eminente patologista quem, em 1863, referiu o transporte através dos canais linfáticos de material do tumor para os locais de metastização. Estabelecido que foi em definitivo o mecanismo celular da metastização linfógena, constituiu-se em ponto de controvérsia a questão da passagem descontínua de êmbolos de células tumorais pelos linfáticos – embolização, e a extensão de colunas de células nas mesmas vias – permeação. O termo permeação foi introduzido em 1905 por Handley com o significado de disseminação de células cancerosas pelos linfáticos em colunas aparentemente contínuas. Sabe-se porém que estas colunas são na realidade apenas parcialmente contínuas e é este elemento de descontinuidade que lhe confere a qualidade de fenómeno metastático. De qualquer modo os fenómenos de permeação e embolização coexistem e inter-relacionam-se.

Desconhece-se ainda se a motilidade direccional das células tumorais para os linfáticos é apenas mecânica, determinada pela pressão intersticial intratumoral. O primeiro gânglio linfático regional para o qual as células tumorais metastizam é designado gânglio sentinela. O conceito de gânglio sentinela permitiu rever os componentes anatómicos da metastização linfática, decorrentes da filosofia clássica exposta por Halsted em finais do século XIX de que os tumores primários metastizam através dos linfáticos para os gânglios linfáticos regionais.

Esta progressão das células tumorais do tumor primário para os gânglios linfáticos regionais através dos capilares linfáticos e troncos colectores é lógica (Weiss 1996) e inicia-se pela invasão da matriz extracelular, onde a pressão intersticial é menor, alcançando os capilares linfáticos adjacentes e daí, movendo-se ao longo da superfície externa do endotélio, acabam por migrar para o lume endotelial, quer através de espaços intercelulares já existentes, quer abrindo espaços fechados.

À medida que a dimensão do tumor aumenta, aumenta também a pressão intersticial e o fluxo linfático dirige-se para os linfáticos peritumorais, aumentando também o volume do fluído intersticial. Os capilares linfáticos são mantidos abertos, mesmo com aumento da pressão intersticial peritumoral, através de filamentos de ancoragem os quais também mantêm abertas as junções intercelulares, produzindo fendas intercelulares. Deste modo é facilitada a passagem das células tumorais. Quando a pressão exterior aos capilares linfáticos diminui estas junções começam a fechar, evitando o fluxo retrógrado (Schmid-Schonbein 1990).

As células tumorais (muitas vezes acompanhadas das células linfoplasmocitárias) insinuam-se e migram entre as células endoteliais linfáticas. Uma vez dentro do lúmen dos capilares linfáticos, embolizam isoladamente ou em agregados (Yancopoulos *et al.* 2000).

Os capilares linfáticos convergem em linfáticos colectores nos quais a linfa é empurrada ritmicamente e as valvas evitam o refluxo. Neste processo muitas células tumorais são eliminadas, mas a eficiência de sobrevivência celular é pouco conhecida. Algumas células sobreviventes não alcançam os gânglios intercalares, mas aderem ao endotélio linfático, podendo causar metástases *em trânsito* atravessando a parede, invadindo e proliferando nos tecidos circundantes (Balch 2001).

As células tumorais entram no seio sub-capsular do gânglio satélite através dos linfáticos aferentes. Daí as células podem invadir o córtex do gânglio ou efectuar *by pass* através de conexões venolinfáticas. Podem também entrar directamente para os linfáticos eferentes e ser transportados para a estação ganglionar seguinte.

Muitos trabalhos têm demonstrado um aumento do número de linfáticos na periferia dos tumores em crescimento. Mas a questão fundamental é determinar se os linfáticos funcionais também existem dentro do próprio tumor. Estes linfáticos que se observam na estrutura de alguns tumores podem fazer parte do tecido do hospedeiro invadido pelo tumor e não ter capacidade de transporte de células tumorais para a periferia do tumor.

Estes conhecimentos de natureza fisiopatológica quanto à disseminação por via linfática das células tumorais são igualmente válidas quanto se considera a progressão metastática regional do CPC oral.

A metastização ganglionar cervical do cancro oral constitui um facto importante da progressão tumoral, sendo reconhecido que a existência de adenopatias metastáticas regionais é um factor determinante do prognóstico (Spiro *et al.* 1974, O'Brien *et al.* 1986, Mamelle *et al.* 1994, Kowalski *et al.* 2000).

Embora a disseminação metastática do CPC oral para os gânglios linfáticos cervicais seja um facto comum, não está bem esclarecido se as células tumorais utilizam os canais linfáticos existentes ou se é necessária a formação de novos linfáticos por linfangiogénese.

Padera *et al.* (2002) demonstraram, num trabalho com recurso a marcadores de vasos linfáticos (LYVE -1, Prox 1 e o marcador pan-endotelial MECA-32), que a zona central dos tumores não contém vasos linfáticos totalmente funcionais, por estarem colapsados pela alta pressão intratumoral, e que são os linfáticos peritumorais que conduzem a metastização linfática, existindo ainda tumores sem linfáticos intratumorais que também metastizam. Siriwardena *et al.* (2008) num estudo dos linfáticos intra e peritumorais em 54 casos de CPC oral, com o anticorpo monoclonal D2-40, encontraram uma correlação significativa entre a invasão linfática e a metastização, também com uma predominância da invasão linfática peritumoral.

No entanto não podem deixar de ter-se em conta os trabalhos que referem a importância da linfangiogénese intratumoral na metastização regional (Beasley *et al.* 2002, van Trappen 2002, Skobe *et al.* 2001) bem como no prognóstico de doentes com carcinomas orais precoces sem metástases cervicais (Muñoz-Guerra *et al.* 2004).

Beasley *et al.* apontam ainda a possibilidade de que os linfáticos intra e peritumorais tenham uma génese interligada. Estes AA consideram que os linfáticos intratumorais são neoformados e não pré-existentes ou hiperplasiados por três ordens de razões: porque a morfologia dos linfáticos intratumorais é mais semelhante à dos linfáticos imaturos do que à dos linfáticos maduros; porque, ao contrário dos linfáticos periféricos, os linfáticos intratumorais têm núcleos

proliferativos; e ainda porque estão localizados frequentemente no meio de camadas de tumor e não confinados em ilhas do estroma formadas por invaginações do tecido normal.

Foram encontrados ocasionalmente alguns êmbolos tumorais nos linfáticos peri-tumorais, mas não de forma óbvia nos linfáticos intra-tumorais (Beasley *et al.* 2002), o que pode indiciar que os linfáticos intra-tumorais não sejam na realidade os principais condutores da metastização, embora se possa admitir que nalguns casos os êmbolos tumorais tenham neles origem.

De qualquer modo sublinha-se que a possível relação entre linfangiogénese, linfoproliferação e metastização linfática é certamente complexa, sendo ainda necessário determinar de forma conclusiva o verdadeiro significado prognóstico dos linfáticos intratumorais. É provável que, tal como na angiogénese, sejam necessários vários factores de crescimento para regular a linfangiogénese. É ainda possível admitir-se que a propagação das células tumorais do CPC oral para os gânglios linfáticos possa envolver quer a invasão dos linfáticos peritumorais, quer a dos linfáticos intratumorais.

1.4 Risco e padrões de metastização ganglionar cervical

O risco de metastização ganglionar cervical no CPC das vias aerodigestivas superiores (VADS) depende reconhecidamente de vários factores do tumor primário - localização, tamanho e estágio - para além de outros factores tumorais intrínsecos. O risco aumenta progressivamente do lábio para a cavidade oral, orofaringe e hipofaringe. Na cavidade oral o risco é maior para a língua e pavimento bucal, em relação por exemplo ao palato duro. Aumenta ainda em regra com o tamanho da lesão, bem como o seu número e a sua fixação, conforme refere Lindberg (1972) no trabalho talvez mais citado nesta matéria.

De qualquer modo a presença de metástases cervicais na altura do diagnóstico do CPC oral é considerado o indicador mais importante para a recidiva local e/ou metastização à distância (Ferlito *et al.* 2002).

A disseminação metastática do CPC oral e em geral das VADS decorre de forma sequencial e previsível (Shah e Patel 2003) definindo-se grupos selectivos de risco a nível dos gânglios cervicais para cada localização do tumor primário, cuja definição se torna pois fundamental para a actuação terapêutica cirúrgica (figura 2).

Assim, para os CPC da cavidade oral os gânglios com maior risco de metastização são os das áreas ganglionares I, II e III, ou seja os gânglios contidos no triângulo cervical supra-omoióideo.

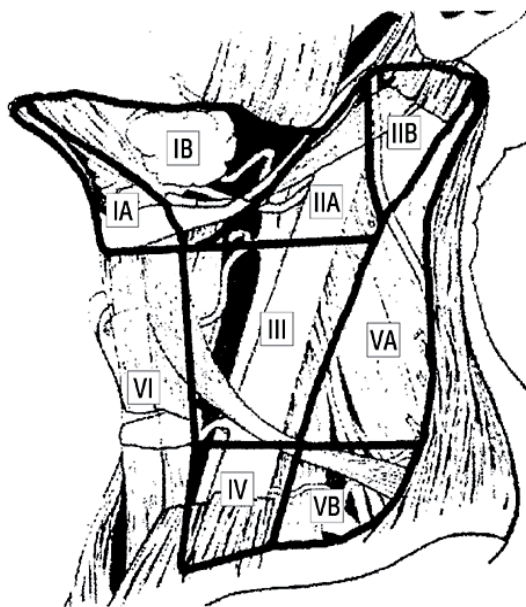


Figura 2: Áreas ganglionares cervicais. Modelo de apoio à cirurgia. IA e IB-áreas submentoniana e submandibular; IIA e IIB-área jugular interna alta e infraparotídea; áreas III e IV-área jugular interna média e inferior; área VA-área do espinal acessório e triângulo cervical posterior; área VB-supraclavicular. (Adaptado de TNM Staging of Head and Neck Cancer / Neck Dissection Classification AAO/HNS 2008).

A metastização para os níveis IV e V nos casos sem doença metastática nos gânglios a montante é extremamente rara. Como excepção refira-se a metastização dos CPC do 1/3 médio do bordo lingual para a área ganglionar IV. Os tumores com localização mediana na cavidade oral ou que ultrapassam a linha média têm potencial de disseminação metastática cervical bilateral. Os tumores da base da língua têm igualmente potencial de metastização cervical bilateral.

Clinicamente a determinação da existência de adenopatias metastáticas cervicais ditas ocultas, ou seja sem expressão no exame objectivo (o chamado pescoço N0 clínico) mas detectáveis por outros meios, como a ultrasonografia, é uma questão relevante no tratamento do cancro oral e tem implicações directas na actuação terapêutica cirúrgica .

A avaliação quantitativa das metástases cervicais ocultas tem sido definida em muitos trabalhos que cronologicamente têm mais de duas décadas. Marks *et al.* (1985) referem para o CPC da porção móvel da língua uma percentagem de 34-39% ; Teichgraeber e Clairmont (1984) 33% nos T1 da língua móvel, 37% nos T2 da língua móvel, 38% nos T1 do pavimento da boca e 25% nos T2 do pavimento da boca.

O esvaziamento cervical efectuado nos casos N0 clínico pode ter apenas intenção diagnóstica e é efectuado por nós em regra nos carcinomas T2 da língua móvel e com um nível selectivo supra-omo-hioideu. Nos casos clinicamente N + o esvaziamento cervical é mandatório, mas cerca de 20% dos casos tratados cirurgicamente com esvaziamento cervical são negativos quanto à existência de metástases no exame anatomo-patológico definitivo. Todavia a possibilidade de hiper-tratamento, tendo em conta a possível morbilidade do acto cirúrgico, é justificadamente aceitável dada a gravidade prognóstica da existência de adenopatias metastáticas cervicais. Neste sentido a nossa opinião é de que a atitude de “esperar e vigiar” é correcta apenas no contexto de tumores T1 e de baixo risco. O limiar de detecção das metástases cervicais, associado ao facto de 2/3 das metástases terem diâmetro inferior a 1cm de diâmetro e 1/3 serem mais pequenas do que 3 mm (Don *et al.* 1995, Buckley *et al.* 2000), constituem importantes limitações que têm conduzido à procura de parâmetros adicionais de prognóstico.

Dentre estes, os factores histopatológicos definidos no próprio tumor (tipo histopatológico, localização, tamanho, espessura, grau de diferenciação, padrão de invasão, resposta inflamatória do hospedeiro, invasão perineural e angioinvasão e ainda invasão óssea) poderão ter significado prognóstico.

A metastização para os níveis IV e V nos casos sem doença metastática nos gânglios a montante é extremamente rara. Como excepção refira-se a metastização

dos CPC do 1/3 médio do bordo lingual para a área ganglionar IV. Os tumores com localização mediana na cavidade oral ou que ultrapassam a linha média têm potencial de disseminação metastática cervical bilateral. Os tumores da base da língua têm igualmente potencial de metastização cervical bilateral.

Clinicamente a determinação da existência de adenopatias metastáticas cervicais ditas ocultas, ou seja sem expressão no exame objectivo (o chamado pescoço N0 clínico) mas detectáveis por outros meios, como a ultrasonografia, é uma questão relevante no tratamento do cancro oral e tem implicações directas na actuação terapêutica cirúrgica .

A avaliação quantitativa das metástases cervicais ocultas tem sido definida em muitos trabalhos que cronologicamente têm mais de duas décadas. Marks *et al.* (1985) referem para o CPC da porção móvel da língua uma percentagem de 34-39% ; Teichgraeber e Clairmont (1984) 33% nos T1 da língua móvel, 37% nos T2 da língua móvel, 38% nos T1 do pavimento da boca e 25% nos T2 do pavimento da boca.

O esvaziamento cervical efectuado nos casos N0 clínico pode ter apenas intenção diagnóstica e é efectuado por nós em regra nos carcinomas T2 da língua móvel e com um nível selectivo supra-omo-hioideu. Nos casos clinicamente N + o esvaziamento cervical é mandatório, mas cerca de 20% dos casos tratados cirurgicamente com esvaziamento cervical são negativos quanto à existência de metástases no exame anatomo-patológico definitivo. Todavia a possibilidade de hiper-tratamento, tendo em conta a possível morbilidade do acto cirúrgico, é justificadamente aceitável dada a gravidade prognóstica da existência de adenopatias metastáticas cervicais. Neste sentido a nossa opinião é de que a atitude de “esperar e vigiar” é correcta apenas no contexto de tumores T1 e de baixo risco. O limiar de detecção das metástases cervicais, associado ao facto de 2/3 das metástases terem diâmetro inferior a 1cm de diâmetro e 1/3 serem mais pequenas do que 3 mm (Don *et al.* 1995, Buckley *et al.* 2000), constituem importantes limitações que têm conduzido à procura de parâmetros adicionais de prognóstico.

Dentre estes, os factores histopatológicos definidos no próprio tumor (tipo histopatológico, localização, tamanho, espessura, grau de diferenciação,

padrão de invasão, resposta inflamatória do hospedeiro, invasão perineural e angioinvasão e ainda invasão óssea) poderão ter significado prognóstico.

1.5 Estadiamento TNM

O estadiamento dos tumores malignos e do cancro oral em particular é um método científico fundamental para a sistematização do seu estudo clínico. De há muito que é efectuado com base no sistema classificativo TNM, originalmente desenvolvido por Pierre Denoix entre 1943 e 1952 e acordado como técnica geral de classificação em 1953 pelo Comité da Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Entre 1958 e 1968 foram efectuadas várias revisões desse sistema, após o que foi publicado o *Livre de Poche* com as propostas de classificação para cada localização anatómica. Depois de várias edições, foi publicado em 1993 o Suplemento de Classificação TNM que promovia o uso uniforme do sistema, com vários exemplos práticos e em 1995 foi publicado o suplemento Factores Prognósticos do Cancro, com os factores de prognóstico anatómicos e não anatómicos para cada localização, tendo sido publicada uma segunda edição deste suplemento em 2001.

O sistema classificativo TNM é essencialmente anatómico e consagra uma razoável uniformização dos critérios de estadiamento, partindo do princípio geral de que os estádios menos avançados têm melhor prognóstico e que, inversamente, os estádios mais avançados têm um pior prognóstico. Torna-se pois necessário obter uma concordância no registo inicial da extensão da doença oncológica para facilitar os registos e a informação relacionada com os mesmos, e possibilitar ainda eventuais estudos comparativos dos resultados das terapêuticas e obter indicações quanto ao prognóstico da doença.

Para descrever a extensão anatómica da doença oncológica o sistema TNM baseia-se na avaliação de três parâmetros:- T (extensão do tumor primário na sua maior dimensão), N (envolvimento ou não dos gânglios linfáticos regionais por implantação metastática) e M (existência ou não de metastização à distância). Esta avaliação desdobra-se em duas fases: primeiro uma fase *clínica*, baseada na

evidência adquirida antes do tratamento e depois uma fase *patológica*, que suplementa a evidência anterior com a adquirida após tratamento, nomeadamente após o tratamento cirúrgico das lesões e através do exame anatomo-patológico das mesmas. Da conjugação destes parâmetros resulta o agrupamento em quatro estádios, de I a IV, sendo que o estadiamento clínico é essencial para seleccionar e avaliar a terapêutica e o estadiamento patológico para determinar o prognóstico e estudar os resultados finais.

O agrupamento em estádios resultou do reconhecimento do facto de que em geral a sobrevivência dos doentes com tumores de menor dimensão e não disseminados era geralmente maior do que a dos doentes com tumores de maior dimensão e/ou disseminados. Esta observação simplista não considera no entanto factores que hoje se sabe serem de grande importância, como por exemplo os que se relacionam com as características do próprio tumor ou as interações do tumor com o hospedeiro. Tal como referem Piccirillo *et al.* (2003), não foi na verdade efectuada nenhuma análise prospectiva multivariada deste agrupamento que permita avaliar o impacto relativo dos parâmetros T, N e M no prognóstico de sobrevivência.

Possui portanto reconhecidas limitações que se agravam pelo facto de ser muito difícil a introdução no sistema de variáveis adicionais, nomeadamente as relacionadas com as características histopatológicas do próprio tumor. Neste sentido várias ideias foram sugeridas, nomeadamente quanto à referência à espessura do tumor, apresentada pelo Grupo Austro-Suiço-Germânico (DÖSAK) para o Estudo dos Tumores da área maxilofacial em 1999 e baseada num extenso estudo retrospectivo de 1532 casos de cancro oral (Howaldt *et al.* 1999). Para além disso, baseia-se apenas na premissa de que os tumores malignos com a mesma histologia localizados no mesmo sítio anatómico têm os mesmos padrões de invasão, o mesmo risco de metastização e o mesmo prognóstico quando os dados são estratificados em categorias T, N e M (Kowalski *et al.* 2005, Jermal *et al.* 2004, Carew *et al.* 1998, Mao *et al.* 2004, Schuller *et al.* 2002, Pignon *et al.* 2000).

O estadiamento clínico baseado apenas no exame objectivo, quer quanto à dimensão do tumor, quer sobretudo quanto ao número, características e localização

dos gânglios linfáticos cervicais, é agora correntemente complementado com exames como TAC, RMN e ultrassonografia, esta associada a citologia aspirativa eco-guiada, o que permite uma maior acuidade diagnóstica e nalguns casos um re-estadiamento e migração para estágio superior. Este re-estadiamento poderia traduzir-se por uma melhoria da sobrevivência para todos os estádios clínicos, situação designada por “Fenómeno Will Rogers” (Feinstein *et al.* 1985 e Christensen 2003) tendo em conta que muitos casos sub-estadiados poderiam ter uma evolução mais favorável.

2. FACTORES HISTOMORFOLÓGICOS TUMORAIS DE PROGNÓSTICO - ESTADO ACTUAL DO PROBLEMA

Como referem Kowalski e Carvalho (2006) a actual classificação de estadiamento do cancro da cabeça e pescoço baseia-se apenas no pressuposto de que os tumores malignos com a mesma histologia e com a mesma localização anatómica têm padrões semelhantes de invasão, risco de metastização e prognóstico, quando os dados são estratificados nas categorias TNM, existindo um consenso virtual na literatura quanto ao facto de a localização do tumor, o seu estágio e ainda a presença de adenopatias metastáticas cervicais na altura do diagnóstico (Kalnins *et al.* 1977, Alvi e Johnson 1996, Ferlito *et al.* 2001, Sano e Myers 2007) serem os principais factores de prognóstico. Os protocolos de decisão terapêutica são geralmente baseados na localização do tumor, na sua histologia, extensão anatómica TNM e na experiência da instituição.

A própria classificação TNM tem várias insuficiências no que respeita por exemplo ao tamanho do tumor (T) medido no seu maior diâmetro: muitos tumores com maior crescimento em superfície têm menor invasividade profunda e, inversamente, tumores pouco extensos superficialmente possuem um significativo crescimento em profundidade. Por outro lado o estágio T2 abrange um conjunto elevado de tumores com dimensão superficial entre 2 e 4 cm, portanto muito variável e previsivelmente com prognósticos muito diferentes. O estadiamento clínico cervical N0 não corresponde também muitas vezes à efectiva realidade da metastização ganglionar cervical, apesar do refinamento diagnóstico que se obteve com a ultrasonografia por vezes associada à punção aspirativa ecoguiada.

Refere-se até recentemente uma taxa elevada de metástases cervicais ocultas (Kademani 2007, Bilde *et al.* 2008) que se pode atribuir a limitações de natureza tecnológica. A disseminação metastática linfática cervical no cancro oral ocorre independentemente do tamanho do tumor e deste modo, como também referem Sano e Myers (2007), pequenos tumores podem determinar o

aparecimento de metástases enquanto que tumores de maior dimensão o não fazem. Daí a importância que poderá assumir a definição de outros factores preditores da evolução biológica do tumor.

Na verdade há um vasto conjunto de evidência clínica e de investigação que aponta para a necessidade de valorizar outros aspectos relevantes na avaliação clínico-patológica dos tumores, designadamente aqueles que se referem às suas características histomorfológicas e moleculares.

2.1 Frente invasiva tumoral – padrão de invasão e sua avaliação prognóstica

A avaliação prognóstica do CPC oral tem manifesta importância, em particular quando se consideram os tumores em estádios precoces (I e II), dado serem estes os casos que têm maior possibilidade de cura clínica. De entre estes, todavia, existem alguns que vêm a revelar-se mais agressivos do ponto de vista da progressão tumoral e menos favoráveis quanto ao prognóstico.

Por outro lado reconhece-se desde há muito que o grau histológico do CPC oral tem valor prognóstico, embora e na prática nunca tenha sido incorporado no planeamento terapêutico destes doentes, pelo menos fase de tratamento primário. Assim, a avaliação histopatológica do tumor e o estabelecimento de sistemas de graduação de malignidade parece ser um objectivo importante .

A graduação quantitativa do cancro começou com o desenvolvimento por Broders a partir de 1920 de um sistema reprodutível e abrangente para definir a diferenciação tumoral. Quando Broders publicou as suas primeiras observações sobre a correlação entre o aspecto histomorfológico e a graduação de malignidade o conceito patológico prevalecente era o de que a malignidade constituía uma propriedade intrínseca da célula proliferante e a “modulação” da malignidade parecia relacionar-se com os mecanismos de defesa do “hospedeiro” (Ortega *et al.* 1998).

Este sistema classificativo de Broders, inicialmente aplicado ao CPC do lábio, considerava a diferenciação como um processo capaz de reduzir e até anular

a capacidade proliferativa das células tumorais e propunha quatro graus baseados na proporção do tumor semelhante ao epitélio pavimentoso normal, sendo a diferenciação tanto maior quanto maior a semelhança.

Mais tarde, em trabalhos subsequentes, precisou a finalidade quantitativa deste sistema definindo a percentagem de células diferenciadas e indiferenciadas para cada grau. No entanto carecia de critérios morfológicos para as distinguir. Apesar do seu carácter inovador possuía entre outras limitações a contagem real das células, método impraticável, que na prática é substituído pela impressão geral da diferenciação do tumor. Mas o seu valor prognóstico manteve-se, sendo introduzidas algumas modificações, como a simplificação para três graus de diferenciação, a qual aparece consagrada em 1972 na publicação da OMS “Histological typing of oral and oropharyngeal tumors”.

Nesta avaliação da diferenciação tumoral incluem-se parâmetros como o grau de queratinização, as relações intercelulares, o pleiomorfismo nuclear e o número de mitoses.

Numa série de estudos subsequentes foi estabelecida uma relação entre os graus de diferenciação e ainda outros parâmetros com o prognóstico no CPC do lábio (Wurman *et al.* 1975), palato (Enneroth *et al.* 1972), cavidade oral e orofaringe (Close *et al.* 1987), língua (Holm *et al.* 1982) e cabeça e pescoço no seu conjunto (Zöller *et al.* 1978).

No entanto, conforme referem Anneroth, Batsakis e Luna (1987) verificou-se uma falta de correlação entre o grau de diferenciação e o prognóstico, sendo uma das razões principais para tal o facto de os carcinomas pavimentocelulares exibirem uma população celular heterogénea com diferenças no grau de diferenciação, o que pode determinar diferenças no seu comportamento invasivo e metastático.

Para sistematizar a avaliação histopatológica dos tumores da cabeça e pescoço e obter uma avaliação mais precisa do seu potencial de crescimento, Jakobsson e colaboradores, do Departamento de Patologia Tumoral do Instituto Karolinska de Estocolmo desenvolveram (1972) um sistema multifactorial de graduação de malignidade semi-quantitativo.

Este sistema considerava não só uma análise da população celular do carcinoma (parâmetros morfológicos da “estrutura”, “tendência à queratinização”, “aberrações nucleares” e “número de mitoses”) mas também uma avaliação da relação tumor - hospedeiro (modo de invasão”, “grau ou estágio da invasão”, “invasão vascular” e “grau de infiltração linfoplasmocitária”) conceito que não sendo totalmente inovador, pois já havia sido expresso por Enneroth *et al.* em 1972, mostrou possuir grande importância clínico-patológica. Num estudo extensivo do carcinoma glótico tratado com radioterapia exclusiva, Jakobsson (Tese 1973) demonstrou a validade deste sistema de graduação multifactorial. Os seus resultados mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre o seu sistema de graduação de malignidade, a recidiva tumoral e as taxas de sobrevivência. Os mais importantes factores preditores encontrados para a sobrevivência aos 5 anos, com ou sem recidiva, foram o pleiomorfismo nuclear da população celular tumoral, o modo de invasão na relação tumor- hospedeiro e o valor total do índice.

Todavia, enquanto alguns Autores correlacionaram positivamente estes sistemas de graduação histológica de malignidade com a frequência de recidivas, o prognóstico e a evolução clínica da doença, outros não encontraram uma relação significativa (Lund *et al.* 1975, Helweg-Larsen *et al.* 1978). Ainda Anneroth (1987) aponta como possível causa para esta variabilidade a falta de controle de factores experimentais clínicos e histológicos, sugerindo que é crítico estabelecer um acordo quanto aos critérios que devem ser aplicados no sistema classificativo.

No entanto o conceito de um *score* quantitativo para avaliar a graduação tumoral manteve-se. O sistema de Jakobsson foi depois modificado por Anneroth e Hansen (1984) que pretenderam tornar os critérios morfológicos mais precisos embora simplificados. Um dos parâmetros, a invasão vascular, foi omitido.

A validade clínica da versão modificada da classificação foi testada, tendo sido encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre os *scores* médios totais de malignidade e o estágio clínico, frequência de recidivas e morte determinada pelo carcinoma oral primário .

Crissman *et al.* (1980) modificaram o sistema de Jakobsson em duas fases. Incluíram uma escala diferente para a “invasão vascular” e reuniram “estrutura” e

“ forma de invasão” num único parâmetro - o “padrão de invasão”. Consideraram que o melhor método de determinação do grau tumoral com vista à previsão do comportamento biológico do tumor e deste modo revestir interesse clínico seria valorizar os parâmetros histológicos que tivessem demonstrado possuir valor prognóstico, alguns menos frequentemente utilizados, como o padrão de invasão e a frequência de mitoses. Assim utilizaram estes como critérios *major* e o grau de queratinização e o pleiomorfismo nuclear como critérios *minor*. O novo parâmetro “padrão de invasão” foi considerado como expressão da capacidade da coesão celular do tumor em manter a população celular unida assim como a relação das células tumorais invasivas e o estroma do hospedeiro. Definiram assim neoplasias coesivas “diferenciadas” com margens bem definidas e compressivas, e neoplasias não-coesivas “ menos diferenciadas” infiltrativas com agregados celulares pequenos e irregulares ou células isoladas. Numa segunda modificação Crissman *et al.* (1984) omitiram o “ estágio de invasão” uma vez que este era considerado sempre invasivo nos carcinomas avançados. De forma conclusiva os resultados de Crissman *et al.* (1984) mostraram que o parâmetro “ padrão de invasão” era a mais importante variável histológica isolada, no estabelecimento do prognóstico de sobrevivência.

Os sistemas de graduação histológica de malignidade com finalidade prognóstica concentraram-se progressivamente no grau (ou *score*) de malignidade, reduzindo progressivamente e tanto quanto possível outros factores.

Deve porém referir-se que todos os sistemas baseados no de Jakobsson e suas modificações consideram os diferentes parâmetros como tendo igual importância na avaliação do grau de malignidade, mas as características histomorfológicas não são de importância equivalente apesar de poderem ter o mesmo grau numérico. Tal facto é uma limitação intrínseca destes sistemas.

Anneroth, Batsakis e Luna propuseram em 1987 um novo sistema de graduação que considera duas vertentes de análise classificativa: a caracterização da população celular tumoral e a relação tumor-hospedeiro.

Na análise da população celular tumoral são considerados o grau de queratinização, o pleiomorfismo nuclear e o número de mitoses. Estes Autores consideram que a característica “ estrutura” do tumor, ou seja, a capacidade de

coesão da população celular tumoral, seja incluída no parâmetro “ padrão de invasão”.

Na análise da relação tumor-hospedeiro são considerados o “padrão de invasão”, o “estádio da invasão” e a “infiltração linfoplasmocitária”. O critério “ modo de invasão” foi omitido uma vez que foi considerado ser largamente sobreposto ao parâmetro “ padrão” ou “ estrutura” da população celular tumoral e ainda por ser em muitos casos difícil de aplicar e ser dependente de outros factores. De igual modo o critério “invasão vascular”, originalmente usado por Jakobsson (1973) foi também omitido nesta classificação dada a incapacidade de se definir e reconhecer esse tipo de invasão com um grau de certeza razoável, admitindo estes Autores que possa ser incluído num sistema de graduação quando o material a examinar seja fixado de forma adequada.

O parâmetro “ padrão de invasão” neste sistema de graduação considera 4 graus:

Grau 1 - tumores com limites compressivos e bem delimitados;

Grau 2 - tumores com cordões sólidos infiltrativos e bandas;

Grau 3 - tumores com grupos pequenos de células ou finos cordões infiltrativos, sendo o número de células em cada grupo não inferior a 15;

Grau 4 - tumores com invasão celular difusa e intensa por células isoladas ou em pequenos grupos de células em número não superior a 15.

O parâmetro “estádio de invasão” pretende definir a profundidade da invasão tumoral. Os tumores com carcinoma *in situ* e/ou invasão duvidosa são considerados de grau 1. A invasão inquestionável envolvendo apenas a lâmina própria é reconhecida como grau 2 e a invasão abaixo da lâmina própria nalgumas áreas adjacente a músculo e glândula salivar, como grau 3. O grau 4 é atribuído quando há invasão extensa e profunda das células tumorais nas camadas celulares musculares substituindo muito do tecido estromal. Também é considerada grau 4 a invasão através do perióstio para o osso mandibular.

O parâmetro “infiltração linfoplasmocitária” é considerado reflectir a reacção imunológica ao tumor. O infiltrado inflamatório pode também ser a expressão morfológica de uma reacção inflamatória, por exemplo devida a ulceração, como referem Anneroth *et al.* (1987). Nos casos avançados com ulceração extensa pode

haver dificuldade na avaliação deste parâmetro, devendo então ser feita longe da ulceração, de preferência no estroma adjacente à frente invasiva do tumor. A infiltração linfoplasmocitária é considerada de grau 1 quando marcada, de grau 2 quando moderada, de grau 3 quando ligeira e de grau 4 quando nula.

Bryne (1989, 1991, 1992) introduziu o conceito de que as características celulares na frente invasiva tumoral bem como a relação tumor-hospedeiro a este nível poderiam fornecer uma melhor informação prognóstica sobre o tumor, encontrou suporte em trabalhos que afirmavam o significado prognóstico independente da graduação da FIT na recidiva e na metastização.

A observação de que as células tumorais na parte mais invasiva dos tumores malignos diferiam substancialmente das células na parte central ou mais superficial do tumor já existia anteriormente. Nicolson (1986) referiu que as células das zonas mais profundamente invasivas do tumor podem exibir alterações mais semelhantes às das suas metástases do que as células das áreas de menor invasividade. Sugeriu ainda que os carcinomas são compostos por diversas populações celulares, heterogêneas quanto a uma larga série de características. Algumas células dentro de um determinado tumor teriam provavelmente a capacidade de metastizar, sendo possível que as alterações nas subpopulações celulares metastáticas determinem essa importante característica biológica dos tumores malignos.

Embora não tenha sido possível identificar com precisão as subpopulações celulares metastáticas (Hill 1987), sabe-se que o padrão histológico dos tumores está muito frequentemente relacionado com o comportamento metastático das células tumorais (Nicolson 1986). As células menos diferenciadas têm maior probabilidade de metastizar do que as células altamente diferenciadas, conforme observa Bryne (1989). Estando a metastização altamente correlacionada com a sobrevivência, a graduação histopatológica dos tumores tem sido usada de forma consistente para predizer a evolução dos tumores, embora com valor prognóstico variável.

O sistema de graduação histológica de malignidade da FIT proposto por Bryne analisa apenas as zonas mais invasivas do tumor, considerando quatro parâmetros:

- I. Grau de queratinização:
 - 1 - muito queratinizado
 - 2 - moderadamente queratinizado
 - 3 - minimamente queratinizado
 - 4 - não queratinizado
- II. Pleiomorfismo nuclear:
 - 1 - pouco pleiomorfismo nuclear
 - 2 - moderadamente abundante pleiomorfismo nuclear
 - 3 - abundante pleiomorfismo nuclear
 - 4 - extremo pleiomorfismo nuclear
- III. Padrão de invasão:
 - 1 - frente bem delineada e compressiva (Figura 3)
 - 2 - margem infiltrativa com cordões grossos e sólidos de células tumorais (Figura 4)
 - 3 - pequenos grupos de células infiltrativas ou cordões finos de células tumorais (em nº superior a 15) – Figura 5
 - 4 - dissociação celular marcada em pequenos grupos e/ou células isoladas (em nº inferior a 15) – Figura 6
- IV. Resposta do hospedeiro – infiltração linfoplasmocitária
 - 1- marcada
 - 2- moderada
 - 3- ligeira
 - 4- nula

A contagem do número de mitoses foi excluída na última revisão do sistema, em 1992, por dificuldade de padronização, mantendo-se o valor prognóstico e melhorando ligeiramente a reprodutibilidade.

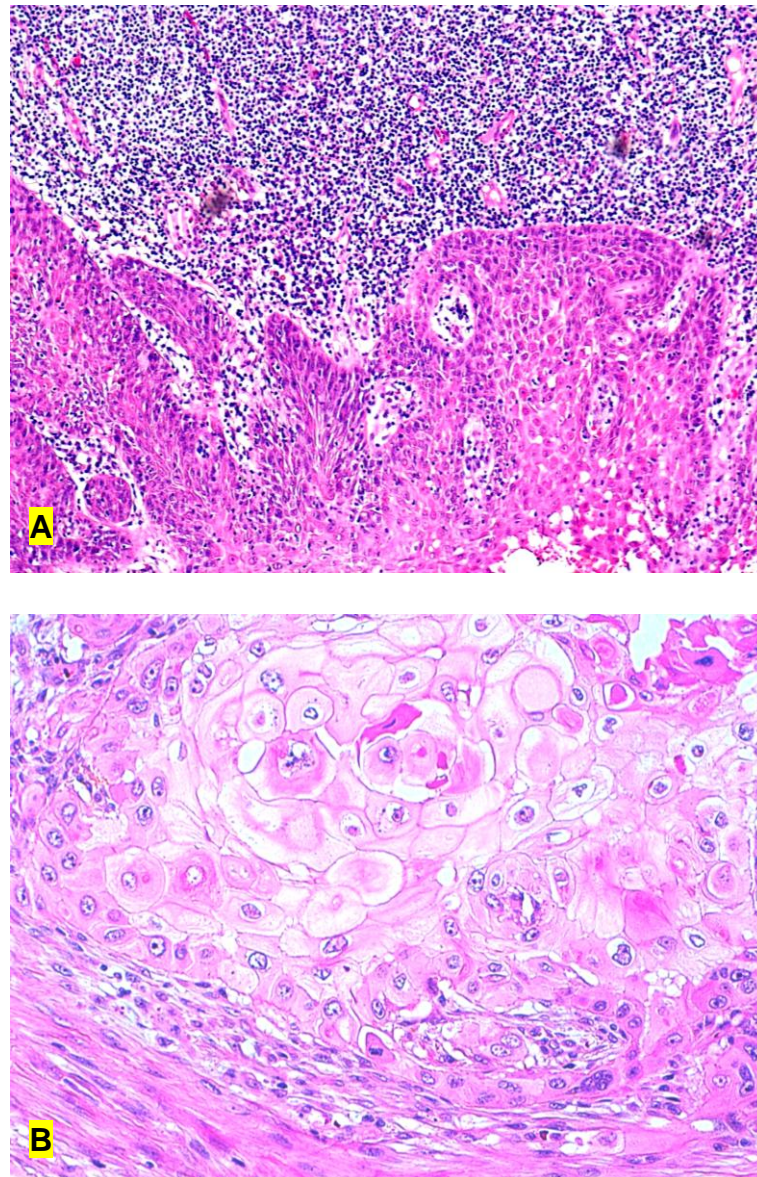


Figura 3: Padrão de invasão tipo 1 - a frente invasiva é compressiva e existe infiltração linfoplasmocitária na periferia do tumor. **A)** x100, **B)** x200 (coloração Hematoxilina & Eosina).

O elevado valor prognóstico das características da FIT foi confirmado por Odell *et al.* (1994) num grupo de doentes muito homogêneo com CPC da porção móvel da língua, em estádios precoces, tendo sido encontrada uma relação entre a FIT e a recidiva local e a metastização. Outros investigadores confirmaram o significado prognóstico independente da graduação da FIT no CPC oral e da cabeça e pescoço (Bánkfalvi *et al.* 2000, Woolgar *et al.* 1995, Piffkó *et al.* 1997, Högmo *et al.*

1999, Welkoborsky *et al.* 1995 e 1999). Spiro (1998) encontrou, numa série de 150 doentes com CPC da língua operados, e aplicando o sistema classificativo do padrão invasivo de Bryne, uma maior incidência de metástases e um pior prognóstico nos casos com padrão de grau 3 e 4.

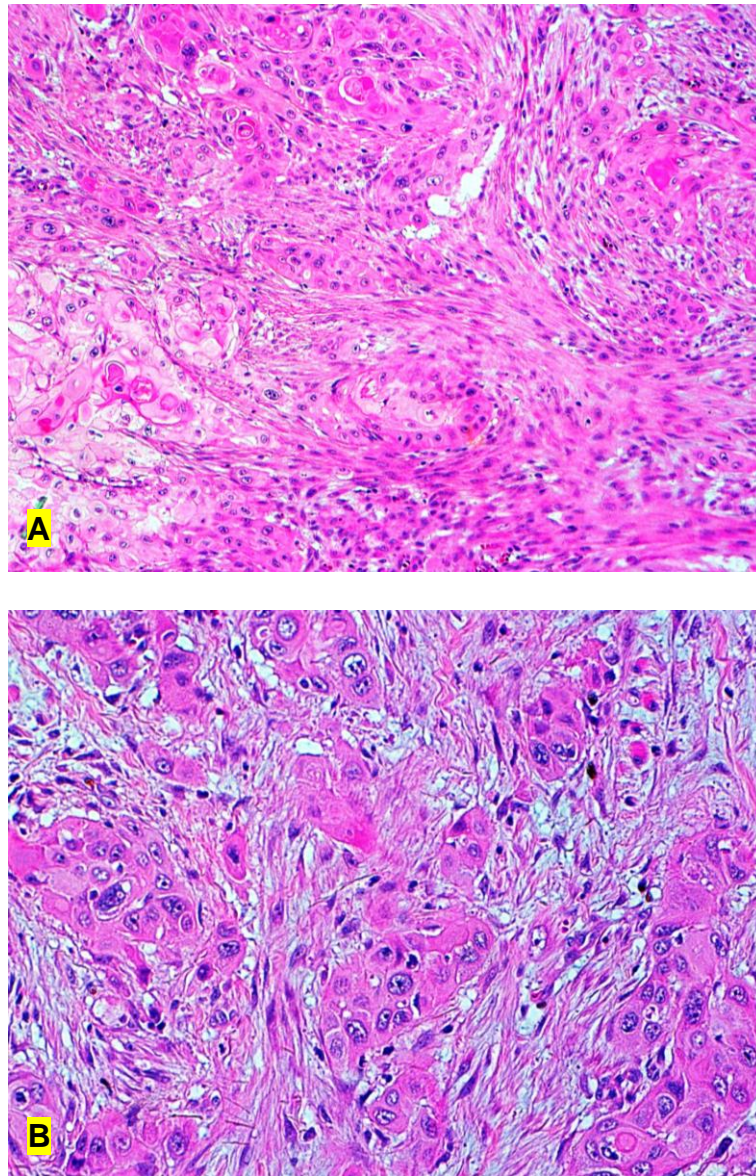


Figura 4: Padrão de invasão tipo 2. Margens infiltrativas com cordões grossos e sólidos de células tumorais. A)x100, B)x200 (coloração Hematoxilina & Eosina).

Sawair *et al.* (2003) e Kurokawa *et al.* (2005) encontraram também uma correlação entre o tipo de invasão na frente invasiva e a metastização regional do CPC oral.

Concluiu-se assim que a graduação da FIT é, na maioria dos casos, superior à tradicional graduação histopatológica.

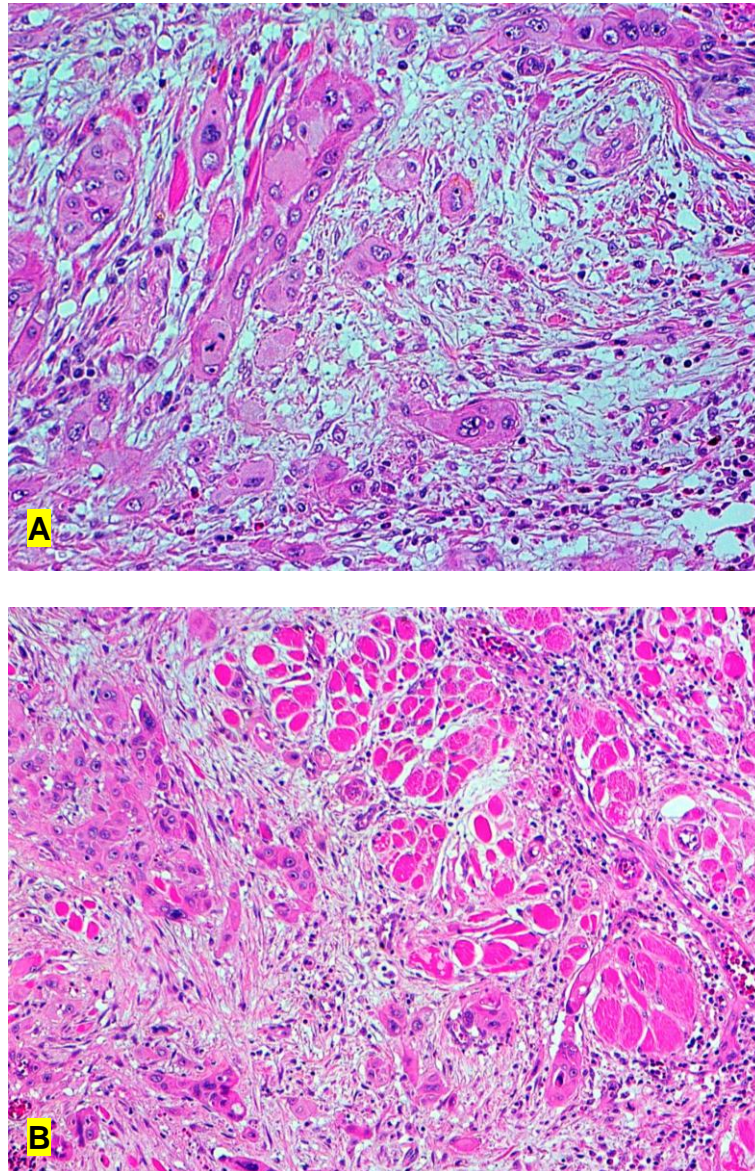


Figura 5: Padrão de invasão tipo 3. Grupos de células ou cordões de células tumorais infiltrantes. A) x100, B) x200 (coloração Hematoxilina & Eosina).

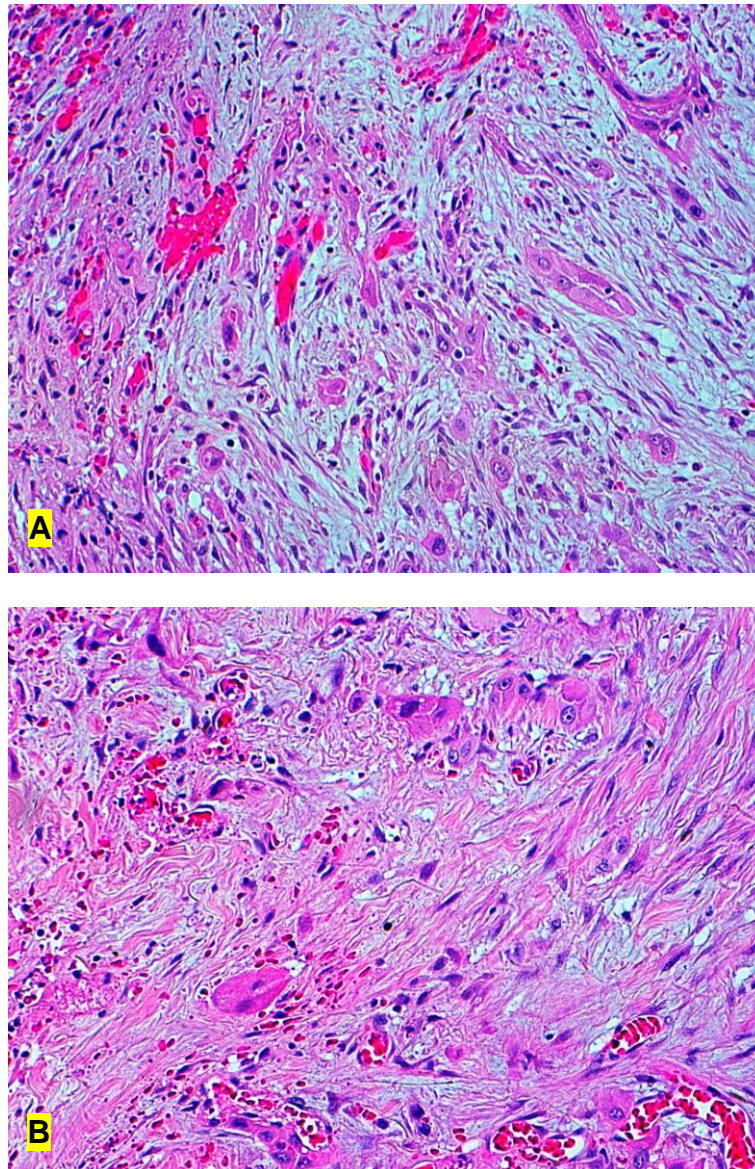


Figura 6: Padrão de invasão tipo 4. Marcada dissociação celular, em pequenos grupos, ou até em células tumorais isoladas. A) x100, B) x200 (coloração Hematoxilina & Eosina).

Este sistema de graduação demonstrou também ter uma aceitável reprodutibilidade intra e inter-observadores, antes e após calibração por diferentes patologistas (Bryne *et al.* 1992, Odell *et al.* 1994, Welkoborsky *et al.* 1995) sendo porventura de execução mais rápida do que outros sistemas, por incidir apenas numa zona específica do tumor.

As diferenças de valor prognóstico de cada parâmetro considerado individualmente são dependentes do local do tumor, do seu estágio e do observador. No entanto a maior parte dos estudos publicados apontam para o padrão de invasão como o factor de prognóstico mais importante e o pleiomorfismo como o menos importante (Yamamoto *et al.* 1983 e Odell *et al.* 1994).

Das quatro variáveis histológicas, só o grau de queratinização e em particular o padrão de invasão mostraram ter significado em análise multivariada. Ambas revelaram ser melhores indicadores de prognóstico do que o *score* total.

Estes parâmetros histopatológicos de invasão adquirem agora uma dimensão mais aprofundada à luz dos novos conhecimentos sobre os mecanismos celulares e vias moleculares de progressão tumoral.

Como refere Wernert (1997), a malignidade tumoral é um estado que emerge da relação tumor / microambiente do hospedeiro e no qual o hospedeiro participa na indução, selecção e expansão das células tumorais malignas.

Estas promovem a vascularização e o estroma através da produção e secreção de factores estimuladores do crescimento e de citocinas. Por seu lado, o microambiente activado do hospedeiro (quer os elementos celulares, quer os extracelulares) modifica o comportamento proliferativo e invasivo das células tumorais (Vaccariello *et al.* 1999, Aboseif 82 *et al.* 1999). Também Bãnkfalvi e Piffkò (2000) sublinham que as interacções entre o estroma e as células tumorais na FIT parecem ter um papel significativo na modulação da progressão tumoral pelo que a informação sobre as alterações das células estromais específicas podem constituir índices prognósticos independentes.

O processo de relação entre o epitélio e o mesênquima é, em condições normais, interactivo e sabe-se que durante ele alterações do estroma podem induzir uma transformação epitelial. Na verdade já há mais de trinta anos que foi demonstrada a importância dessas interacções não apenas na morfogénese epitelial durante o desenvolvimento embrionário, mas também na diferenciação e manutenção do epitélio oral adulto. Trabalhos subsequentes utilizando sistemas de células de cultura organotípicas mais definidos permitiram identificar um papel importante dos fibroblastos na morfogénese de epitélio oral reconstituído *in vitro*

(Igarashi *et al.* 2003) revelando ser necessários e suficientes para uma diferenciação epitelial oral óptima.

Duas hipóteses foram propostas para explicar a influência do tecido conjuntivo nas células epiteliais: o tecido conjuntivo fornece um substrato físico para a ligação e orientação dos queratinócitos basais; as células conjuntivas sintetizam proteínas difusíveis que influenciam quer o crescimento, quer a diferenciação das células epiteliais (cf. Costea, tese 2005). A primeira hipótese é sustentada por trabalhos que mostram que o crescimento de um epitélio oral completamente diferenciado pode ser conseguido na ausência de fibroblastos se os geles de colagénio simples tipo I forem cobertos com colagénio IV e laminina. No entanto outros trabalhos mostraram que não é necessário um contacto directo entre os queratinócitos e o tecido conjuntivo para uma diferenciação epitelial completa, tendo sido identificados factores difusíveis sintetizados pelos fibroblastos indutores exclusivos da morfogénese epitelial (El Ghalbzouri e Ponc 2004). O crescimento e diferenciação dos queratinócitos da pele foi totalmente recuperado por factores difusíveis sintetizados pelos fibroblastos quando co-cultivados com queratinócitos, mas não por factores difusíveis sintetizados por fibroblastos cultivados em monocamada. Esta observação sugere que os fibroblastos influenciam os queratinócitos suprajacentes e que os queratinócitos influenciam os fibroblastos subjacentes, existindo portanto uma interacção contínua entre os dois tipos de células.

Esta interacção envolve, ao nível da pele, um duplo mecanismo regulador parácrino: a interleucina-1 sintetizada pelos queratinócitos estimula a proliferação dos fibroblastos e a síntese do factor de crescimento dos queratinócitos (KGF) o qual por sua vez actua sobre os queratinócitos, estimulando a sua proliferação e a síntese de interleucina -1 (Maas – Szabowski *et al.* 2001) .

Porém no epitélio oral os mecanismos de controlo do crescimento e diferenciação epitelial são diferentes dos da pele. Os fibroblastos orais são mais activos na produção de KGF do que os da pele (Gron *et al.* 2002, Okazaki *et al.* 2002) e parecem possuir mecanismos adicionais de síntese de KGF e de factor estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) – Costea, 2005 – que modulam a diferenciação do epitélio oral humano reconstituído.

De qualquer forma é hoje geralmente aceite que os fibroblastos desempenham um papel fundamental na organização, crescimento e diferenciação do epitélio oral do adulto, embora os factores envolvidos na diferenciação epitelial oral sejam ainda pouco conhecidos.

A progressiva compreensão molecular dos mecanismos de adesão que regulam a migração e invasão pelas células do CPC oral (complexo processo sequencial que inclui a motilidade celular induzida por factores de crescimento, interacções das macromoléculas da MEC com os seus receptores e a elaboração de enzimas de degradação da matriz) tem permitido interpretar de forma mais clara muitos aspectos que tinham inicialmente apenas expressão histomorfológica, como é o caso da própria FIT.

Assim o conhecimento das alterações específicas da membrana basal (MB) no decurso do processo de invasão local do CPC torna-se importante para um entendimento integrado desse processo, para o estabelecimento de possíveis correlações clínico-patológicas e para o prognóstico .

A membrana basal do epitélio, ou lâmina basal, constitui um dos exemplos das matrizes pericelulares. Este compartimento pericelular está fundamentalmente envolvido em processos de modulação do comportamento celular, nomeadamente fenómenos de adesão, migração, proliferação/apoptose e diferenciação celular (*op cit.* Cidadão e Rodrigo 1999). Deve referir-se que existe uma grande heterogeneidade nas lâminas basais devida à variabilidade da generalidade das moléculas da MEC, de que é exemplo o colagénio IV.

Dentre os múltiplos componentes da MEC - colagénios, sistema elástico, glicosaminoglicanos e proteoglicanos e ainda as proteínas multifuncionais – destacam-se estas últimas não só pela sua capacidade de interacção entre si, com outras moléculas extracelulares e com receptores celulares, mas também pelo seu papel estrutural e ainda pelas suas funções adesivas de interacção com os seus substratos (laminina e fibronectina) ou funções antiadesivas (tenascina, trombospondina). As interacções que se estabelecem entre estas proteínas multifuncionais e as células são quase sempre mediadas por receptores de superfície celular denominados integrinas.

As duas principais redes de macromoléculas na MB são constituídas por lamininas e colagénio tipo IV às quais se juntam outras moléculas da MB que formam conjuntos supramoleculares definidos interagindo umas com as outras.

Nas lesões malignas a MB apresenta muitas alterações morfológicas, que vão desde a acumulação anormal de macromoléculas até à sua total ausência.

Considera-se hoje em dia que a MB é uma estrutura dinâmica e não estática que se remodela continuamente pela ruptura e síntese da glicoproteína, processos que ocorrem na inflamação e reparação tissular normal, mas que não se verificam se existirem células tumorais. Na verdade no decurso da invasão tumoral a síntese da glicoproteína na MB é muito mais lenta e desorganizada originando perdas permanentes de continuidade, como referem Kannan *et al.* (1994).

A degradação da MEC é condição necessária para a migração das células tumorais. Esse processo de degradação ocorre quer em condições fisiológicas, quer em condições patológicas e é regulado a diversos níveis.

Foram identificados por IHQ e microscopia electrónica diversos tipos de alterações estruturais da MB tais como descontinuidades, duplicação, espessamento e marcação intensa ou ausente (Jiang *et al.* 1993, Wilson *et al.* 1993).

Mas as descrições das alterações específicas da invasão epitelial nos vários componentes da MB são poucas e na maior parte dos casos qualitativas, tais como a marcação mais intensa da laminina e a marcação descontínua do colagénio tipo IV e as alterações na marcação das glicoproteínas trombospondina e tenascina (Wong *et al.* 1992, Howedy *et al.* 1990). Kannan *et al.* (1994) referem ainda alterações em três proteínas da MB – colagénio IV, laminina e fibronectina – na mucosa oral tumoral. A expressão de colagénio IV e laminina mostrou uma correlação inversa entre a intensidade de marcação, a espessura do tumor e a continuidade da MB em vários estádios da progressão tumoral, sendo mais fina e fracamente marcada nos casos de CPC do que nos casos de mucosa oral normal. Por outro lado existe a evidência de que a expressão de laminina se relaciona mais com a maior ou menor diferenciação do tumor do que com o seu grau clínico (Firth e Reade 1996). De resto esta observação já havia sido documentada por diversos AA e também estatisticamente definida por Kumagai *et*

al. (1994) que relacionou o grau de perda da MB com o grau de diferenciação das células tumorais, mas não com o tamanho do tumor. Encontrou ainda uma relação muito significativa com o modo de invasão tumoral e ainda com a incidência de metástases cervicais. Os tumores com uma frente invasiva bem definida exprimiam uma MB intacta e pelo contrário os tumores com uma frente invasiva difusa, ou discoesiva, exprimiam perdas importantes de componentes da MB e tinham ainda uma alta incidência de metastização cervical. Esta correlação do padrão de marcação da MB com o padrão de invasão do tumor foi também referido por Hirota *et al.* (1990) e Harada *et al.* (1994).

De igual modo foi descrita a perda mais frequente de componentes da MB na FIT do que nas áreas mais centrais ou superficiais do tumor.

É reconhecido ainda que as perdas de continuidade da MB se devem não só à degradação proteolítica enzimática activa como também à diminuição da produção ou deficiente combinação dos respectivos componentes. Harada *et al.* (1994) no mesmo trabalho referem ainda um dado que se considera muito significativo para a compreensão dos mecanismos de metastização cervical do cancro oral – o padrão de laminina, colagénio tipo IV e do proteoglicano sulfato de heparano na FIT dos CPCs orais primários é semelhante ao dos gânglios linfáticos metastáticos, podendo portanto concluir-se que a população celular das áreas mais profundas do tumor exprime o seu potencial invasivo e metastático.

2.2 Actividade proliferativa tumoral

O estudo da actividade proliferativa celular, em especial na frente invasiva tumoral, tem sido investigada de forma extensiva nos tumores da cabeça e pescoço, designadamente no CPC da cavidade oral.

Na verdade o estudo da cinética celular, dos seus mecanismos de regulação e da sua relação com outros factores, nomeadamente os factores de crescimento celular, os oncogenes e anti-oncogenes, é muito importante sobretudo pelo tipo de informação fornecida quanto ao prognóstico de diversos tumores.

Neste contexto, a utilização de marcadores de proliferação celular, têm adquirido importância considerável, apesar de possuírem validade e significado variáveis.

Os mecanismos responsáveis pela actividade proliferativa (P) são a velocidade do ciclo celular, a qual é inversamente proporcional ao tempo de geração (T) por um lado e à proporção de células envolvidas no ciclo – a fracção de crescimento (G) – por outro. A relação matemática entre a actividade proliferativa, a fracção de crescimento e o tempo de geração é: $P=G/T$ (Brugal 1995).

Uma alta actividade proliferativa pode portanto ser o resultado quer de uma elevada fracção de crescimento, quer de um tempo de geração curto, quer de ambos. Dos vários métodos e marcadores de proliferação que têm vindo a ser utilizados referem-se os que utilizam a incorporação de análogos nucleótidos marcados, como a bromodeoxiuridina (BrdU) e a timidina marcada; a contagem de figuras mitóticas habitualmente em 10 campos de alta ampliação (HPF), a citometria de fluxo na qual a fluorescência dos núcleos marcados é quantificada ou a citometria estática que mede a densidade óptica após a aplicação de uma coloração de absorção (reacção de Feulgen); a imunohistoquímica dos antigénios associados à proliferação, como o antigénio nuclear de células proliferativas (PCNA) e o Ki-67 e finalmente os AgNORs.

O PCNA, descrito inicialmente como um antigénio nuclear presente em células proliferantes e com aparecimento cíclico (Myiachi *et al.* 1978) foi depois caracterizado como uma proteína nuclear ácida funcionando como proteína auxiliar da DNA δ -polimerase, associada à replicação e também à reparação do DNA (Mc Mormick *et al.* 1992). Este último facto e ainda o poder ser expresso por influência de factores de crescimento em células que não estejam no ciclo celular permite admitir que o PCNA possa ter super-expressão em células não proliferantes (e sabe-se que muitos tumores têm células com reparação de DNA activa). Na verdade alguns tumores marcam 100% de PCNA o que o torna globalmente pouco fiável.

O antigénio pKi-67 é uma proteína codificada por um gene do cromosoma 10 e é expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo. A expressão antigénica aumenta

com a progressão do ciclo, com um pico nas fases G2 e M (Sasaki et al. 1987). A sua estrutura primária já foi estabelecida e sabe-se que a proteína sofre fosforilação e defosforilação durante a mitose, é susceptível às proteases e a sua estrutura implica que a sua expressão seja regulada pelas vias proteolíticas. pKi-67 compartilha ainda semelhanças estruturais com outras proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular.

A regulação de pKi-67 parece ser altamente controlada, sendo a quantidade presente ao longo do ciclo celular estável, provavelmente por sistemas de síntese e regulação muito precisos.

Apesar de se saber muito sobre a estrutura, localização e regulação do pKi-67, pouco se sabe sobre a função da proteína. Sabe-se por exemplo que é vital para a proliferação celular, uma vez que a sua remoção a inibe (Schluter *et al.* 1993). Parte da pKi-67 (a FHA) também é semelhante a outras proteínas que se sabe terem um papel na regulação do ciclo celular, como DUN1 e RAD53 (Hofmann e Bucher 1995). No entanto a função da zona FHA é ainda desconhecida. Foram ainda sugeridos um papel na organização de DNA, uma função arquitectural e estrutural dentro do nucléolo e ainda na síntese de ribosomas durante a divisão celular, sendo esta hipótese baseada no facto de a expressão de pKi-67 se correlacionar com a taxa de síntese proteica que é uma função dos ribosomas (Plaat *et al.* 1999).

O anticorpo Ki-67 original apenas podia ser utilizado em material fresco ou congelado, dado que a fixação reduzia ou impedia a imunocoloração. Foram entretanto preparados outros anticorpos que reconheciam pKi-67 em tecido fixado e montado convencionalmente, desde que submetido a irradiação de micro-ondas. O mais utilizado deles é o MIB-1, que permitiu a efectivação de estudos retrospectivos sobre material de arquivo e facilitou ainda os estudos prospectivos dado não ser necessário material a fresco. Mais recentemente a introdução de novos anticorpos monoclonais, como o MIB-5 e o TEC-3, vieram permitir o alargamento da sua utilização em animais correntemente usados em laboratório com fins experimentais, como o ratinho.

A validade prognóstica de Ki-67 tem sido largamente estudada, quer isoladamente, quer em conjunto com a utilização com outros marcadores nomeadamente PCNA e p53.

As regiões de organização nucleolar (NO) são segmentos de DNA intimamente relacionados com nucléolos que contêm genes codificantes para o DNA ribosómico. Contribuem pois fortemente para a regulação da síntese proteica. As NORs são argirófilas e podem ser visualizadas através de uma técnica de coloração argêntica, que conduziu ao termo regiões de organização nucleolar argirófilas (AgNORs).

As determinações de AgNOR podem ser utilizadas para avaliar o tempo do ciclo celular, uma vez que quanto mais curto o ciclo maior a síntese proteica por unidade de tempo, maior a produção de ribosomas e maior o índice de AgNOR. De resto o índice de AgNOR correlaciona-se com o tempo de duplicação da população celular.

O conteúdo de proteínas argirófilas das chamadas regiões de organização nucleolar argirófilas (AgNORs), juntamente com uma graduação histopatológica multiparamétrica, têm sido utilizados para avaliar a actividade nucleolar, parecendo estar directamente relacionado com o nível de rDNA (DNA ribosómico) e portanto com a actividade proliferativa celular e a capacidade invasiva do tumor, de forma estatisticamente significativa, tendo sido considerado como o mais significativo factor de prognóstico independente (Piffkò *et al.*, 1997) numa série de 80 casos de CPC oral. É no entanto um método de avaliação muito complexo e de execução demorada.

Sittel *et al.* (1999) fizeram um estudo comparativo em dois grupos de 28 doentes com CPC da cavidade oral e orofaringe, um com recidiva e outro sem recidiva, todos tratados primariamente com cirurgia seguida de radioterapia complementar. Foi utilizada a determinação por IHQ do estado de p53 e PCNA e ainda o índice de marcação com MIB1 (Ki-67). Concluíram que um alto índice de marcação com Ki-67 é um indicador de ocorrência de recidiva. Não encontraram relação entre o estado de p53 e PCNA com o prognóstico.

2.3 Espessura do tumor

A dimensão do tumor determinada no seu maior diâmetro e expressa no parâmetro T da classificação TNM tem sido considerada como um significativo factor de prognóstico para a ocorrência de metástases cervicais, recidiva local e sobrevivência do cancro oral.

No entanto não permite estabelecer uma relação estratificada da dimensão com o prognóstico dado que muitos tumores de pequena dimensão superficial têm maior agressividade evolutiva do que outros mais extensos mas com crescimento de tipo radiário. Moore *et al.* (1986) num estudo retrospectivo em 155 doentes com CPC oral verificou que para tumores com mais de 2cm o aumento de dimensão não se correlacionava fiavelmente com a metastização ou com um pior prognóstico e que a espessura do tumor poderia ser um melhor indicador prognóstico.

Tornou-se pois lógico dirigir a atenção para a espessura do tumor e deste modo há cerca de 20 anos que múltiplos estudos se têm efectuado sobre a espessura tumoral do CPC oral e/ou a profundidade da invasão tumoral e a correlação desse parâmetro com o risco de metastização cervical e também com o prognóstico.

Estes estudos dirigiam-se sobretudo ao esclarecimento da necessidade de esvaziamentos cervicais electivos em doentes clinicamente N0 mas adquiriram igualmente um papel importante na análise do risco de recidiva e do prognóstico global de sobrevivência.

Dadas as implicações de prognóstico e até terapêuticas da evolução metastática, consideramos que a avaliação da espessura tumoral poderá consituir um aspecto importante da caracterização do CPC oral, nomeadamente quanto à sua correlação com as características da frente invasiva tumoral.

2.4 Factores tumorais avaliados pós-cirurgia

A cirurgia continua a ser a opção terapêutica *major* no tratamento primário do cancro oral, reconhecendo-se a sua validade quer nos estádios iniciais, quer nas formas de apresentação mais avançadas, em particular aqueles casos em que existe invasão de estruturas para além da localização do tumor primário, como as estruturas ósseas, musculares, vasculares e neurais.

Nos casos de tratamento de recurso perante recidiva após tratamento com cirurgia, ou cirurgia com radioterapia complementar, ou ainda tumor residual após tratamento com quimioradioterapia concomitante, a cirurgia continua a ter indicação, sendo necessário avaliar cada caso de forma específica para justificar uma actuação ablativa por vezes nos limites da aceitabilidade.

Os princípios normativos da cirurgia oncológica são igualmente vigentes na cirurgia do cancro oral, designadamente a excisão do tumor em bloco com as estruturas invadidas, a obtenção de margens de segurança adequadas e o tratamento das áreas ganglionares cervicais.

A propagação tumoral para os gânglios linfáticos regionais faz-se no cancro oral de uma forma que é reconhecida e que depende, entre outros factores, do tamanho e da localização da lesão na cavidade oral. Deste modo a decisão de tratar as áreas ganglionares cervicais em conjunto com o tumor primário deve ser fundamentada não só na observação clínica, mas também na determinação da existência de gânglios com implantação metastática, ainda que não identificáveis através da observação clínica sendo neste caso necessário recorrer a outros meios de diagnóstico como a ultrassonografia e eventualmente a punção aspirativa guiada por ecografia.

Esta preocupação com os gânglios linfáticos cervicais é legítima e baseia-se no facto de que a presença de adenopatias metastáticas na altura do diagnóstico é o factor prognóstico mais importante de recidiva regional e também de sobrevivência (cf. O'Brien *et al.* 1986).

Múltiplos estudos demonstram que o número de gânglios cervicais positivos se correlaciona de forma consistente com a sobrevivência, em análise univariada, para todas localizações de CPC da cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral

(Grandi *et al.* 1985, Leemans *et al.* 1993, Pitman e Johnson 1999, Cerezo *et al.* 1992, Le Tourneau *et al.* 2005).

Assim o número de gânglios linfáticos histologicamente positivos no esvaziamento cervical é um dos mais importantes indicadores de prognóstico do cancro oral e também um elemento de análise multidisciplinar quanto à necessidade de efectuar terapêuticas complementares à cirurgia, nomeadamente radioterapia ou quimioradioterapia.

A presença de um único gânglio com metástase altera consideravelmente o prognóstico de sobrevivência. Kalnins *et al.* (1977) referem numa revisão de 340 doentes com CPC da cavidade oral que a existência de um único gânglio metastático cervical baixa a sobrevivência global aos 5 anos de 75% para 49%, para 30% com dois gânglios positivos e para 13% com três ou mais gânglios positivos.

Vários outros estudos corroboraram esta observação, demonstrando uma diminuição da sobrevivência proporcional ao número de gânglios positivos (Noone *et al.* 1974, Spiro *et al.* 1977, Rollo *et al.* 1981, Snow *et al.* 1982, Richard *et al.* 1987).

A existência de adenopatias metastáticas cervicais é ainda um factor preditor da metastização à distância, muito rara sem a existência de metástases regionais, mas que se observa por vezes em casos em que existe controle locoregional da doença. É esta a nossa experiência pessoal, que coincide com as observações de Vikram (1984) e Goepfert (1998).

Com a finalidade de avaliar o estado dos gânglios do primeiro nível de drenagem linfática do tumor, à semelhança do que foi efectuado no carcinoma da mama e no melanoma maligno cutâneo, foram efectuados para o cancro oral diversos estudos com taxas de identificação do gânglio sentinela de cerca de 91% e aproximando-se dos 100% se forem excluídos os carcinomas do pavimento bucal. Todavia nenhum destes estudos possui poder estatístico para demonstrar a eficácia da pesquisa do gânglio sentinela e nenhum foi randomizado ou cego. Foi recentemente fechado um ensaio clínico multicêntrico para pesquisa de gânglio sentinela em CPC oral em estágio precoce (ACOSOG-Z0360) cujo relatório final se aguarda e poderá esclarecer melhor este assunto.

Não pode ainda deixar de ser referido o significado pejorativo dos gânglios metastáticos com extensão extracapsular. Entre muitas séries que confirmaram esta relação entre a extensão extracapsular e o risco de recidiva cervical e/ou à distância, citam-se as de Close *et al.* (1989), Woolgar (1995) e Parsons *et al.* (1997) as quais se referem a CPC da língua, cavidade oral e orofaringe.

Os factores de risco *major* que são considerados como indicação para a terapêutica complementar após cirurgia com quimioterapia e radioterapia são a extensão extraganglionar das metástases e a existência de margens cirúrgicas positivas. Os factores de risco *minor* considerados são pT3, pT4, N2 ou N3, gânglios com metástase nos níveis IV ou V e a existência de invasão perineural ou de angioinvasão (Cooper *et al.* 2004).

A invasão linfovascular, definida como a presença de células tumorais dentro de vasos com revestimento endotelial, pode identificar tumores com natureza biologicamente agressiva e capacidade invasiva.

A sua identificação nos exames anatomopatológicos de rotina é difícil e talvez por essa razão tenha sido excluída dos sistemas de graduação. A sua relação com a existência de metástases cervicais de CPC oral foi encontrada, em análise uni e multivariada (Close *et al.* 1987, Resnick *et al.* 1995, Yilmaz *et al.* 1998) em diversos trabalhos. Na verdade torna-se razoável admitir, à luz dos conhecimentos actuais sobre a progressão metastática do CPC oral, que essa relação existe. Close *et al.* encontraram uma correlação altamente significativa entre a presença de invasão linfovascular no tumor primário e a metastização, e em trabalho de revisão de seguimento desse grupo de doentes estudado, foi o único parâmetro definido como tendo significado no prognóstico de sobrevivência, em análise uni e multivariada.

Jones *et al.* (2009) encontraram, num grupo de 72 doentes com CPC oral tratados com ressecção cirúrgica do tumor e esvaziamento cervical, um elevado significado prognóstico para a sobrevivência, em análise multivariada, modelo de regressão de Cox, embora sem significado em análise univariada.

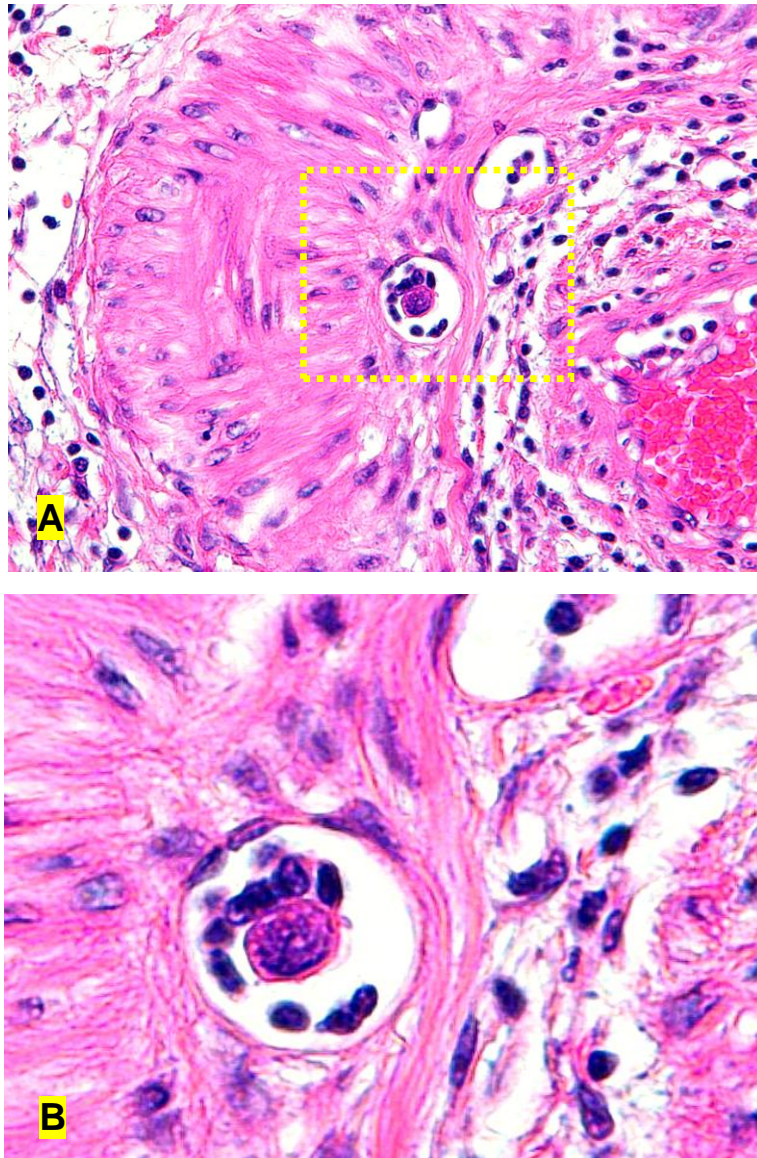


Figura 7: Invasão vascular. A) Observa-se a existência de êmbolo de células tumorais dentro do lume do vaso x100; B) pormenor x300 (coloração *Hematoxilina & Eosina*).

Quanto à invasão perineural ocorre em cerca de 52% dos CPCs da cabeça e pescoço (Fagan *et al.* 1998) embora outros trabalhos refiram valores inferiores. Essa discrepância deve-se ao facto de a avaliação histopatológica não ser efectuada em toda a peça operatória.

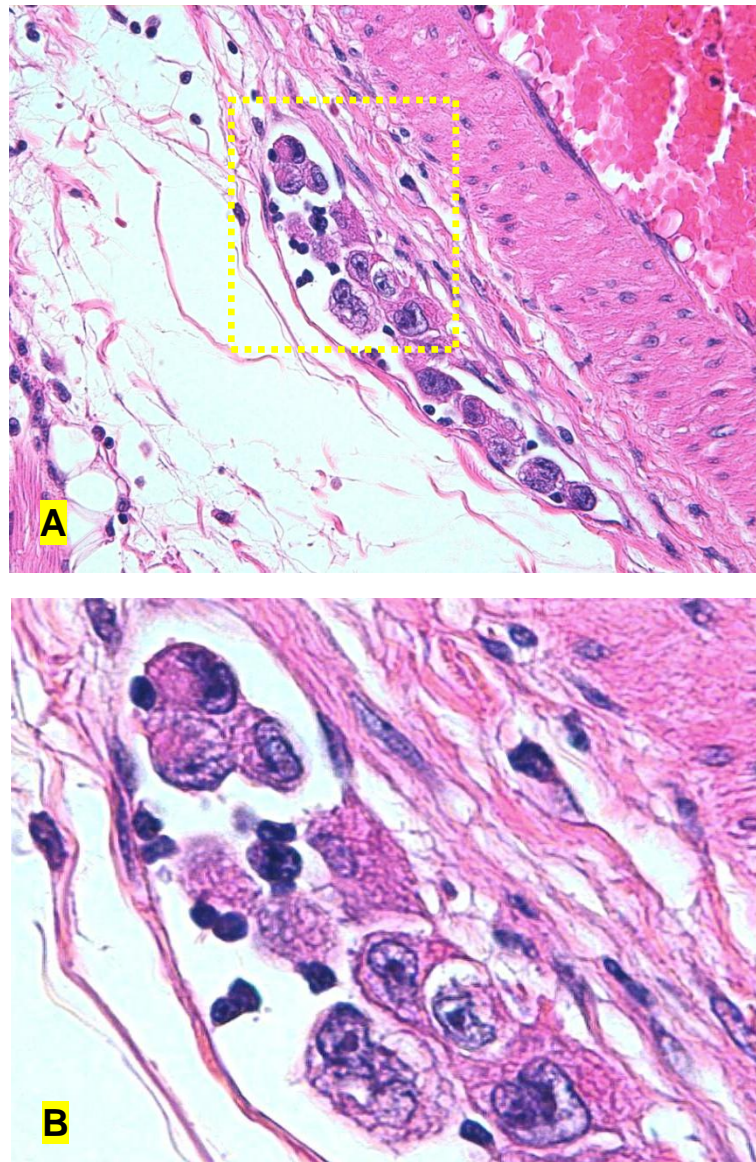


Figura 8: Invasão linfática. A) Observa-se a existência de êmbolo de células tumorais dentro do lume do vaso x100; B) pormenor x300 (coloração *Hematoxilina & Eosina*).

Ballantyne, em 1963, já referia a importância da invasão perineural na evolução do tumor. Numerosos estudos relacionam a invasão perineural com um mau prognóstico, também na língua e na cavidade oral (Maddox 1990, Martinez-Gimeno 1995, Woolgar 1995). A associação entre a invasão perineural e a recidiva

local tem a ver com a migração, centrípeta ou centrífuga, das células tumorais ao longo da bainha perineural.

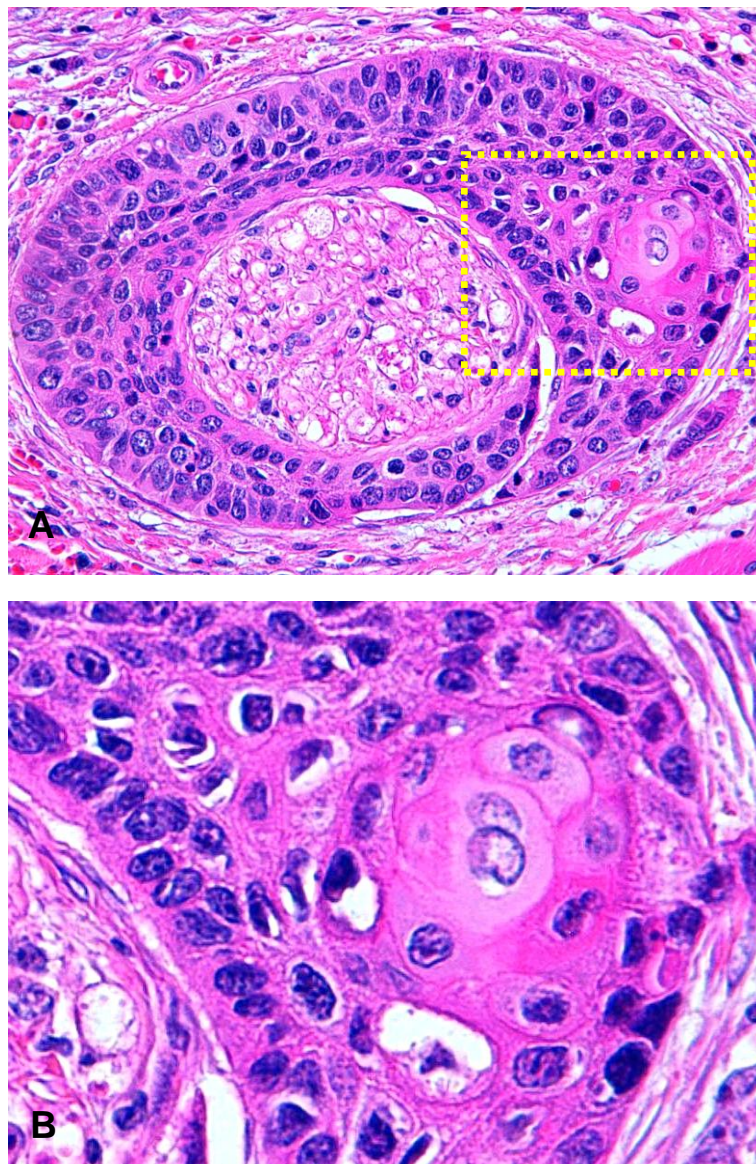


Figura 9: Invasão perineural. A) Observa-se a existência de células tumorais no perinervo x100 B) pormenor x300 (coloração Hematoxilina & Eosina).

3. OBJECTIVOS DO ESTUDO

São objectivos deste estudo, no grupo de carcinomas pavimentocelulares da da língua a estudar:

1. Avaliar a relação de alguns factores tumorais (dimensão do tumor, estado das margens, invasão perineural e angioinvasão, número de gânglios com metástase no esvaziamento cervical) com o risco de recidiva e com o prognóstico de sobrevivência global.
2. Avaliar a relação dos sistemas de gradação, em particular o padrão de invasão na frente invasiva, com o risco de recidiva e com o prognóstico de sobrevivência global.
3. Avaliar o índice de proliferação celular na frente invasiva tumoral com recurso ao marcador tumoral Ki-67/MIB1 e a sua relação com o risco de recidiva e com o prognóstico de sobrevivência global.
4. Correlacionar a espessura do tumor com os restantes elementos de gradação e em particular com o índice de proliferação celular de Ki-67/MIB1 nomeadamente avaliar se os tumores com maior espessura têm ou não um índice de proliferação mais elevado e se existe correlação com o prognóstico de sobrevivência global.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo.

SELECÇÃO DOS CASOS

Foram adoptados os seguintes critérios de inclusão:

- Doentes com diagnóstico histológico de carcinoma pavimentocelular da porção móvel da língua, T1 e T2, de acordo com a classificação TNM.
- Doentes não submetidos a tratamento prévio e todos tratados primariamente com cirurgia, com ou sem radioterapia complementar, seguidos clinicamente pelo menos durante 3 anos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do IPOLFG, EPE.
- Disponibilidade dos blocos de parafina dos tumores, tendo em conta a sua adequada conservação.

Foram adoptados os seguintes critérios de exclusão:

- Qualquer outro tumor maligno da mucosa oral com diagnóstico diferente de CPC.
- Qualquer outro tumor maligno das vias aerodigestivas superiores incluindo CPC, síncrono ou metacrónico.

- Tumores malignos prévios das vias aerodigestivas superiores.
- Existência de metástases à distância no momento do diagnóstico inicial.
- Reintervenção cirúrgicas por recidiva ou cirurgia de recurso pós-radioterapia em qualquer modalidade (braquiterapia ou radioterapia externa).
- Radioterapia prévia na área da cabeça e pescoço.
- Quimioterapia prévia.
- Síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA).
- Utilização prévia de terapêutica imunossupressiva.

POPULAÇÃO ESTUDADA

O Arquivo do ROR – Sul regista na sua base de dados 1356 casos de doentes com CPC da língua (incluindo base da língua) e pavimento da boca, em todos os seus estádios, entre 1998 e 2007. Destes foram seleccionados 149 que correspondiam à localização na língua móvel, T1 e T2, e que foram tratados quer cirurgicamente, quer com radioterapia, designadamente com braquiterapia. Finalmente, após exclusão dos casos não tratados cirurgicamente e daqueles que apresentavam insuficiências de registo ou outras que não permitiam uma avaliação completa, foram seleccionados os casos que são objecto deste estudo.

Foi obtida aprovação prévia para o trabalho pela Comissão de Ética do IPOLFG-EPE e seguidas as suas recomendações nomeadamente quanto ao termo de consentimento informado.

Foram assim seleccionados 65 casos, todos correspondentes a doentes inscritos, tratados e seguidos clinicamente no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do IPOLFG-EPE entre 1999 e 2005 e que correspondiam totalmente aos critérios estabelecidos.

Nesta série de 65 doentes (Figura 10), cuja mediana de idades foi de 62 anos (34-89), 42 eram do sexo masculino e 23 do sexo feminino (razão H:M 1,8) .

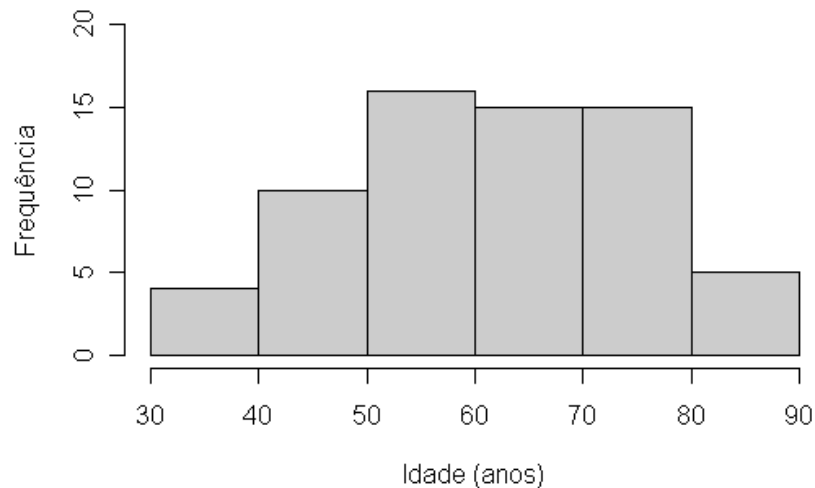


Figura 10: Distribuição da idade na data do diagnóstico.
35 doentes (54%) com mais de 60 anos.

Dos dados constantes no processo clínico foram colhidos para este trabalho os seguintes: idade (na altura do diagnóstico), sexo, data do diagnóstico (que foi a data do exame anátomo-patológico confirmativo da lesão), estado actual (para o qual foi considerada a situação na data da última observação clínica), sobrevivência expressa em meses, data da recidiva quando existente, intervalo livre de doença expresso em meses (definido como o período entre a data do tratamento inicial e a data do diagnóstico de recidiva) e ainda data de eventual óbito. Para efeito da estratificação do estado de recidiva foram considerados como tendo recidiva os doentes perdidos para o *follow up*.

Todos os blocos das peças operatórias dos casos se encontravam no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do IPOLFG-EPE. Todas as amostras foram fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina.

Foram seleccionados de cada caso os cortes mais representativos da lesão tumoral.

Dos dados anatomopatológicos da peça operatória foram colhidos os seguintes elementos: estágio pTNM, margem mínima, existência ou não de tumor

na margem da peça operatória, número de gânglios do esvaziamento cervical quando efectuado e número de gânglios que apresentavam metástase.

O estadiamento foi definido com base nos exames anatomopatológicos das peças operatórias, incluindo o T.

Foram considerados como tendo tumor na margem os casos com margem igual ou inferior a 1mm e como não tendo tumor na margem os casos com margem superior a 1mm.

Foram avaliados e revistos, os seguintes parâmetros histopatológicos: máxima profundidade de invasão do tumor expressa em milímetros, arredondada às décimas (medida no aparelho LEICA DMD 108) determinada desde a zona mais superficial da mucosa até à zona mais profunda em que se verificava invasão. No caso de haver ulceração superficial a determinação da máxima profundidade de invasão foi feita a partir da linha de reconstrução que correspondia à linha da superfície mucosa normal, seguindo-se assim o critério referido por Woolgar *et al.* (1995). Nas lesões exofíticas a determinação foi feita a partir da base mucosa da lesão, por se considerar que assim se exprime melhor a sua capacidade invasiva; para a avaliação dos sistemas de graduação histológica utilizaram-se os cortes seleccionados que incluíam a espessura completa do tecido tumoral (abrangendo as margens invasivas).

A graduação histológica foi analisada segundo os sistemas de classificação que a seguir se apresentam.

Sistema de diferenciação OMS/Brodors

A avaliação do grau de diferenciação tumoral é bastante subjectiva porque no mesmo tumor podem existir variações de uma área para outra (Lucas 1998).

De acordo com a Classification Histologique Internationale des Tumeurs (OMS, Genève 1971) consideraram-se três graus:

- Grau I: numerosas pérolas de queratina; queratinização celular considerável com pontes intercelulares; menos de duas mitoses por campo microscópico de grande aumento; mitoses atípicas e células gigantes plurinucleadas raras; fraco pleiomorfismo nuclear e celular.
- Grau II: pérolas de queratina raras ou mesmo ausentes; nenhuma queratinização de células isoladas nem pontes intercelulares; 2 a 4 mitoses (as quais algumas atípicas) por campo de grande aumento; pleiomorfismo moderado das células e dos núcleos; células gigantes plurinucleadas pouco frequentes.
- Grau III: pérolas de queratina raramente observadas; queratinização celular negligenciável e pontes intercelulares ausentes; mais de 4 mitoses (frequentemente atípicas) por campo de grande aumento; pleiomorfismo celular e nuclear notável; células gigantes polinucleadas frequentes.

O número de mitoses foi avaliado contando as figuras de mitose em 10 campos de grande ampliação escolhidos de forma aleatória, num microscópio óptico, com uma área de campo 0,16 mm² (x400).

A invasão linfovascular foi definida como a existência ou ausência de células tumorais na parede ou dentro do lume dos vasos sanguíneos ou linfáticos.

A invasão perineural foi definida como o envolvimento por células tumorais no tecido envolvente aos nervos intratumorais ou dentro do próprio nervo.

***Sistemas de graduação de malignidade Anneroth / Batsakis e de Bryne
(Tabelas I, II e III)***

As grelhas de avaliação e atribuição do *score* foram as seguintes:

Tabela I: Graduação de malignidade (Anneroth e Batsakis, 1987)
I – População celular.

Score	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (>50% das células)	Moderadamente queratinizado (20-50% das células)	Queratinização mínima (5-20% das células)	Sem queratinização (0-5% das células)
Pleiomorfismo nuclear	Pouco pleiomorfismo (>75% das células maduras)	Pleiomorfismo moderadamente abundante (50-75% das células maduras)	Pleiomorfismo abundante (25-50% das células maduras)	Extremo pleiomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
Número de mitoses	0-1	2-3	4-5	>5

Tabela I: Graduação de malignidade (Anneroth e Batsakis, 1987)
II – Relação tumor-hospedeiro.

Score	1	2	3	4
Grau de queratinização	Queratinização marcada (>50% de células)	Moderadamente queratinizado (20-50%)	Queratinização ligeira (5-20%)	Queratinização ausente (0-5%)
Pleiomorfismo nuclear	Escasso (>75% células maduras)	Pleiomorfismo nuclear mod. abundante (50-75% cél.maduras)	Pleiomorfismo nuclear abundante (25-50% cél.maduras)	Pleiomorfismo nuclear extremo (0-25% células maduras)
Padrão de invasão	Frente bem delineada e compressiva	Infiltrativa, cordões sólidos e/ou bandas e/ou ilhas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Dissociação celular marcada e generalizada em pequenos grupos e/ou células isoladas (n<15)
Resposta do hospedeiro (infiltração linfoplasmocitária)	Marcada	Moderada	Ligeira	Ausente

Tabela III: Graduação de malignidade da frente invasiva (Bryne, 1989).

Score	1	2	3	4
Grau de queratinização	Queratinização marcada (>50%de células)	Moderadamente queratinizado (20-50%)	Queratinização ligeira (5-20%)	Queratinização ausente (0-5%)
Pleiomorfismo nuclear	Escasso (>75% células maduras)	Pleiomorfismo nuclear mod. abundante (50-75% cél.maduras)	Pleiomorfismo nuclear abundante (25-50% células maduras)	Pleiomorfismo nuclear extremo (0-25% células maduras)
Padrão de invasão	Frente bem delineada e compressiva	Infiltrativa, cordões sólidos e/ou bandas e/ou ilhas	Pequenos grupos ou cordas de cél.infiltrativas (n>15)	Dissociação celular marcada e generalizada em pequenos grupos e/ou células isoladas (n<15)
Resposta do hospedeiro (infiltração linfoplasmocitária)	Marcada	Moderada	Ligeira	Ausente

A marcação imunocitoquímica de Ki-67 foi efectuada com o anticorpo Anti-Ki-67 – DAKO Cytomation ref.^a M 7240, monoclonal de rato, clone MIB 1, diluição 1:200, com controlo positivo em amígdala, de acordo com o procedimento técnico referido por Cattoretti (*J Pathol* 1992; 168:357-363).

Foram colhidos dos blocos de parafina cortes de 4 µm, desparafinados em xileno e rehidratados com etanol graduado.

A recuperação antigénica foi obtida com tampão citrato 0,01M pH 6,0, durante 6 minutos em panela de pressão à pressão máxima.

O sistema de visualização utilizado foi o DAKO REAL™ En Vision™, Ref.^a K 5007.

A técnica imunocitoquímica foi efectuada manualmente em câmara húmida a 21° Celsius.

Estes procedimentos foram efectuados no Laboratório de Técnicas Especiais – Imunocitoquímica, do Serviço de Anatomia Patológica do IPOLFG EPE.

Foram contadas opticamente 1000 células da frente invasiva tumoral, em campos sequenciais e contadas todas as células marcadas e não marcadas, sendo consideradas positivas para a marcação as que apresentassem coloração acastanhada intranuclear definida. O *índice de marcação* (LI) foi definido como a percentagem relativa de células marcadas com o anticorpo neste conjunto de 1000 células.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os procedimentos estatísticos aplicados pretenderam:

- Correlacionar o pT tumoral, o estado das margens, a invasão perineural e angioinvasão e o número de gânglios metastáticos no esvaziamento com a metastização cervical e/ou recidiva e o prognóstico de sobrevivência.
- Correlacionar os scores de graduação histológica com a metastização cervical e/ou recidiva e o prognóstico de sobrevivência.
- Correlacionar a espessura do tumor com a metastização cervical e/ou recidiva e o prognóstico de sobrevivência.
- Correlacionar o índice de marcação (LI) de Ki-67/MIB1 com a espessura do tumor.
- Correlacionar a expressão do índice de marcação (LI) de Ki-67 com a metastização cervical e/ou recidiva e o prognóstico de sobrevivência.

Na análise univariada da associação entre variáveis categóricas foi usado o teste de Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exacto de Fisher (quando valores esperados <5). A avaliação da associação entre a expressão do índice de marcação Ki-67 e a espessura do tumor com a recidiva foi feita com recurso a modelos de regressão logística.

A estimativa da sobrevivência global e do intervalo livre de doença foi feita usando o estimador produto-limite de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevivência comparadas através do teste logrank e do teste de Peto (mais sensível a diferenças observadas no início da curva). Foi ainda realizada uma análise multivariada com recurso ao modelo de Cox de riscos proporcionais para o estudo das variáveis com impacto na sobrevivência global.

O estudo da correlação entre variáveis quantitativas foi feito com recurso aos coeficientes de correlação de Pearson e/ou de Spearman. A comparação da espessura e do índice de marcação Ki-67 entre subgrupos foi feita com recurso aos testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (>2 grupos).

Excepto quando explicitamente referido o contrário, todos os testes são bilaterais tendo sido considerado o nível de significância de 5%. A análise foi realizada utilizando o software *R versão 2.5.0*.

A fim de facilitar a análise estatística dos resultados e considerando a pontuação original dos sistemas de graduação utilizados, foram analisadas as seguintes *variáveis dicotómicas*:

- Anneroth / Batsakis
 - Valor I Anneroth/Batsakis ≤ 11
 - Valor II Anneroth/Batsakis > 11
- Bryne
 - Valor I Bryne ≤ 7
 - Valor II Bryne > 7

Quanto à espessura, foram consideradas as seguintes variáveis :

- Valor I espessura ≤ 3 mm
- Valor II espessura ≥ 4 mm e ≤ 7 mm
- Valor III espessura ≥ 8 mm

Quanto ao índice de marcação Ki-67/MIB 1, consideraram-se as seguintes variáveis:

Baixo	$LI \leq 20\%$
Médio/Baixo	$LI > 20\% \text{ e } \leq 50\%$
Médio/Alto	$LI > 50\% \text{ e } \leq 70\%$
Alto	$LI > 70\%$

5. RESULTADOS

5.1 Análise descritiva das características clinicopatológicas

Os dados analisados reportam-se a um tempo mediano de seguimento global, desde o diagnóstico até morte ou última observação (Figura 11), igual a 29 meses (mínimo 0 meses e máximo 127 meses). Neste período observaram-se no total 32 óbitos de causa não reportada e 24 casos de recidiva local ou metastática.

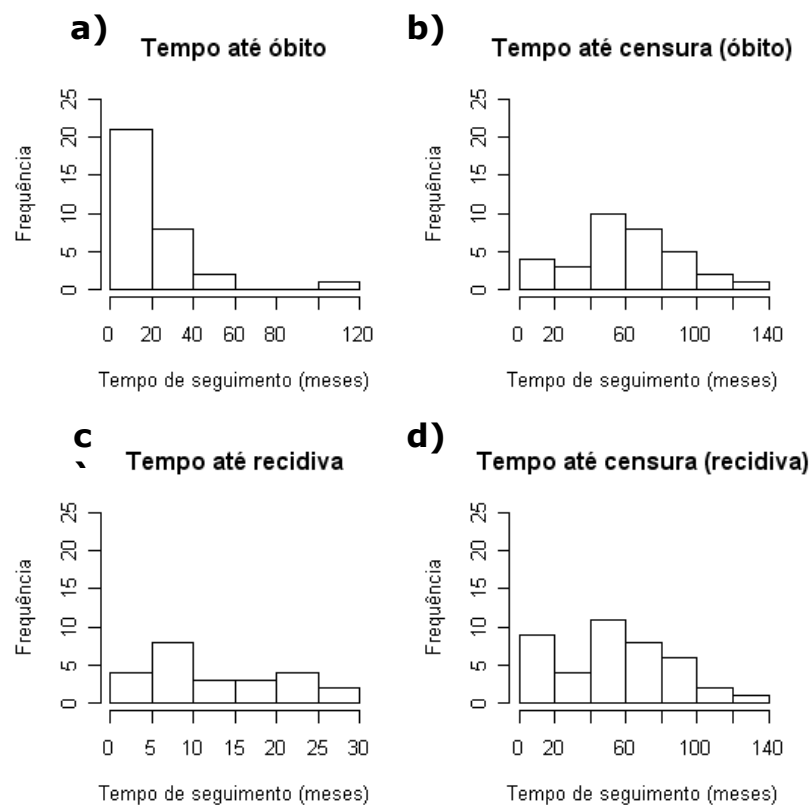


Figura 11: Histogramas de tempo de seguimento até óbito ou recidiva.

A análise dos histogramas revela que a maior parte dos óbitos ocorreu nos primeiros 20 meses após diagnóstico (Figura 11a); os tempos de censura relativos a casos perdidos para *follow-up* encontram-se distribuídos ao longo do período de

seguimento com predomínio no período compreendido entre os 40 e 80 meses após diagnóstico (Figura 11b); todos os casos de recidiva foram reportados no período de 30 meses após cirurgia, sendo observada uma distribuição relativamente uniforme dos tempos de recidiva neste intervalo (Figura 11c); os tempos de censura relativos a casos perdidos para *follow-up* ou casos de morte sem recaída de doença estão dispersos ao longo do período de seguimento e apresentam uma distribuição bimodal com um pico entre 0-20 meses após cirurgia e um segundo pico entre os 40-60 meses após cirurgia (Figura 11d).

Para o estudo das funções de sobrevivência foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier (Figura 12).

O intervalo livre de doença foi definido como o tempo (em meses) entre a cirurgia e a detecção de recidiva local ou metastática. De acordo com esta definição, os casos perdidos para *follow-up* sem evidência de recidiva à data do último contacto e os doentes falecidos sem evidência de recidiva foram considerados observações censuradas.

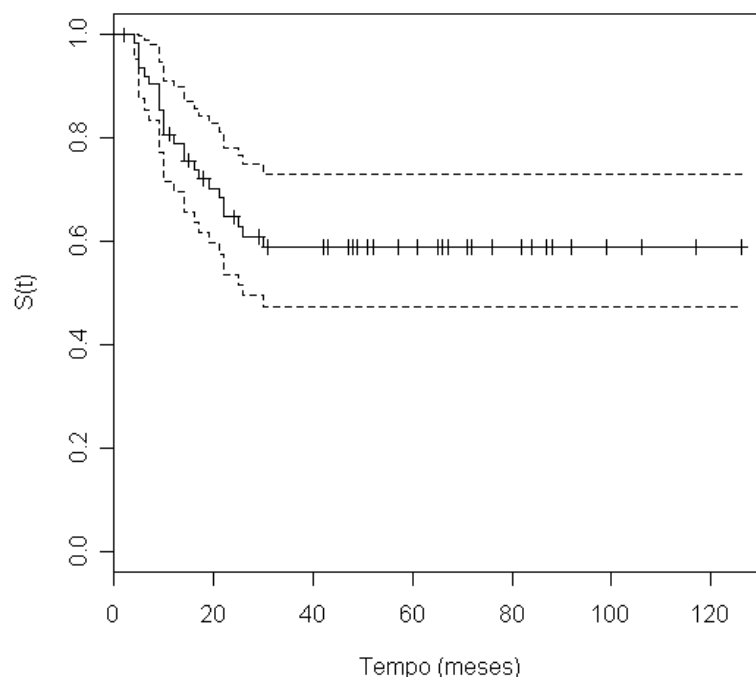


Figura 12: Estimativa Kaplan-Meier do intervalo livre de doença.

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
4	63	1	0.984	0.0157	0.954	1.000
5	62	3	0.937	0.0307	0.878	0.999
6	58	1	0.920	0.0342	0.856	0.990
7	57	1	0.904	0.0372	0.834	0.980
9	56	3	0.856	0.0445	0.773	0.948
10	53	3	0.807	0.0500	0.715	0.912
12	48	1	0.791	0.0517	0.695	0.899
14	47	2	0.757	0.0547	0.657	0.872
16	43	1	0.739	0.0562	0.637	0.858
17	41	1	0.721	0.0576	0.617	0.844
19	39	1	0.703	0.0591	0.596	0.829
21	38	1	0.684	0.0603	0.576	0.813
22	37	2	0.647	0.0625	0.536	0.782
25	34	1	0.628	0.0635	0.515	0.766
26	32	1	0.609	0.0645	0.495	0.749
30	30	1	0.588	0.0654	0.473	0.732

Tabela IV: Tabela de Kaplan-Meier. Estimativa do intervalo livre de doença.

Após cirurgia, a probabilidade de um indivíduo estar livre de doença (sem recidiva) por mais do que 30 meses é igual a 0,588 (intervalo de confiança a 95%: 0,473-0,732), isto é, a probabilidade de um indivíduo ter uma recidiva até aos 30 meses após cirurgia é igual a 0,412 (Tabela IV).

Com estes dados, o número de eventos observados não permite estimar a mediana do intervalo livre de doença nem o respectivo intervalo de confiança a 95%.

A sobrevivência global foi definida como o tempo em meses entre o diagnóstico e a morte, independentemente da causa. De acordo com esta definição, os doentes perdidos para follow-up que se encontravam vivos à data do último contacto e os doentes vivos na última visita foram considerados

observações censuradas.

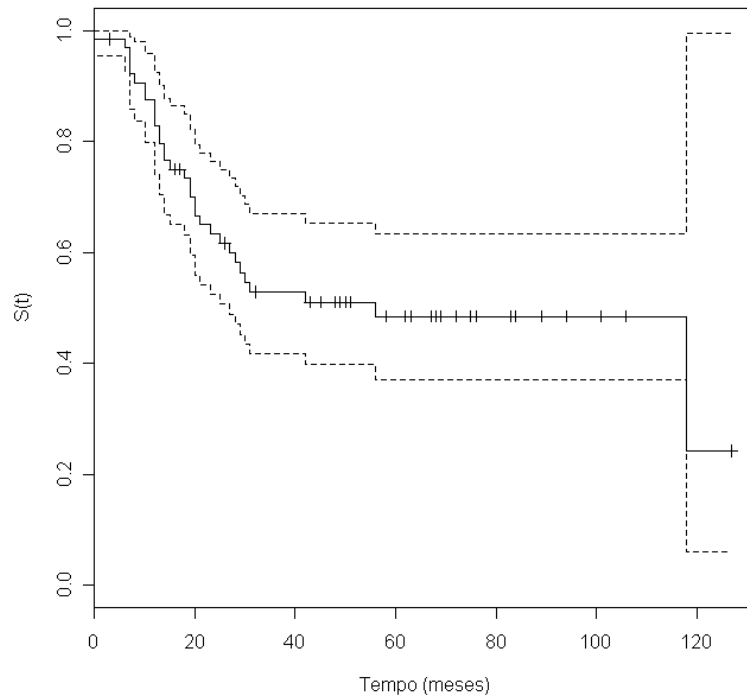


Figura 13: Estimativa Kaplan-Meier da sobrevivência global.

O gráfico da curva de sobrevivência (Figura 13) deve ser interpretado atendendo ao pequeno número de indivíduos em risco na fase final de seguimento. Aos 118 meses o número de indivíduos em risco era apenas de 2 (Tabela V). O que significa que em termos práticos a parte final do gráfico deve ser ignorada.

Após o diagnóstico, a probabilidade de um indivíduo sobreviver mais do que 12 meses é igual a 0,828, mais do que 23 é igual a 0.633 e mais do que 30 meses é igual a 0.546.

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower 95% CI	upper 95% CI
0	65	1	0.985	0.0153	0.9551	1.000
6	63	1	0.969	0.0216	0.9276	1.000
7	62	3	0.922	0.0335	0.8588	0.990
8	59	1	0.906	0.0364	0.8379	0.981
10	58	2	0.875	0.0413	0.7979	0.960
12	56	3	0.828	0.0471	0.7409	0.926
13	53	2	0.797	0.0503	0.7044	0.902
14	51	2	0.766	0.0529	0.6688	0.877
15	49	1	0.750	0.0541	0.6513	0.864
18	45	1	0.734	0.0554	0.6326	0.851
19	44	2	0.700	0.0577	0.5958	0.823
20	42	2	0.667	0.0596	0.5597	0.794
21	40	1	0.650	0.0604	0.5420	0.780
23	39	1	0.633	0.0611	0.5244	0.765
25	38	1	0.617	0.0617	0.5070	0.750
27	35	1	0.599	0.0624	0.4886	0.735
28	34	1	0.582	0.0630	0.4703	0.719
29	33	1	0.564	0.0635	0.4522	0.703
30	32	1	0.546	0.0639	0.4344	0.687
31	31	1	0.529	0.0642	0.4166	0.671
42	29	1	0.510	0.0646	0.3984	0.654
56	20	1	0.485	0.0662	0.3711	0.634
118	2	1	0.242	0.1746	0.0591	0.995

Tabela V – Tabela de Kaplan-Meier. Estimativa da sobrevivência global.

A mediana da sobrevivência global é igual a 56 meses (Tabela VI). No entanto, o baixo número de doentes em risco na fase final de seguimento não permite estimar o limite superior do intervalo de confiança a 95%.

n events median 0.95LCL 0.95UCL

65 32 56 27 Inf

Tabela VI – Estimativa da mediana da sobrevivência global.

Dos 65 casos da série, 24 (36,9%) eram T1 e 37 (56,9%) eram T2. 4 casos clinicamente estadiados como T2 foram estadiados de novo como T3.

38 casos (58,5%) eram N0, 13 (20,0%) eram N1 e 14 (21,5%) eram N2. O número de gânglios avaliados variou entre um mínimo de 4 e um máximo de 81 (esvaziamento cervical bilateral), tendo sido igual ou superior a 20 em pelo menos 50% dos doentes. Em 15 doentes a informação não estava disponível, porque o esvaziamento cervical não foi nesses casos efectuado.

O estadiamento pós-operatório (p TNM) remeteu 17 casos (26,2%) para o estágio I, 18 (27,7%) para o estágio II, 16 (24,6%) para o estágio III e 14 (21,5%) para o estágio IV.

23 dos casos (35,4%) apresentavam Grau I de diferenciação, 36 (55,4%) Grau II e apenas 4 (6,2%) Grau III. Em 2 casos não foi possível determinar o grau de diferenciação.

A positividade das margens cirúrgicas do tumor (definida segundo o critério de margem positiva se igual ou inferior a 1mm, ainda que focalmente) foi encontrada em 15 casos (23,1%). Os restantes 42 (64,6%) apresentavam margens cirúrgicas superiores a 1mm. Em 8 casos não foi possível determinar o estado das margens.

A aplicação do sistema de graduação de Anneroth/ Batsakis, estratificando dois níveis, definiu dois grupos de casos: 21 casos (32,3%) com *score* total inferior ou igual a 11; 44 casos (67,7%) com *score* total superior a 11.

Quanto ao sistema de graduação de Bryne, estratificando dois níveis, definiu dois grupos de casos: 25 casos (38,5%) com *score* total inferior ou igual a 7; 40 casos (61,5%) com *score* total superior a 7.

Idade	Mediana (mín-máx)	62 anos (34-89)
	≤ 20	0 (0,0%)
	21 – 40	4 (6,2%)
	41 – 60	26 (40,0%)
	> 60	35 (53,8%)
Género	Masculino	42 (64,6%)
	Feminino	23 (35,4%)
	Razão H:M	1,8
Espessura (mm)	Mediana (mín-máx)	11,2 mm (1,3 – 21,9)
	Média (Desv Padrão)	11,1 mm (5,67 mm)
	≤ 3,0 mm	6 (9,2%)
	3,1 – 7,0 mm	11 (16,9%)
	> 7,0 mm	48 (73,8%)
Ki-67	Mediana (mín-máx)	42,50 (14,0-79,0)
	Média (Desv Padrão)	43,22 (12,17)
	Baixo: ≤ 20%	3 (4,6%)
	Médio/Baixo: >20% & ≤50%	45 (69,2%)
	Médio/Alto: >50% & ≤70%	14 (21,5%)
	Alto: >70%	2 (3,1%)
	Desconhecido	1 (1,5%)
pT	T1	24 (36,9%)
	T2	37 (56,9%)
	T3	4 (6,2%)
pN¹	N0	38 (58,5%)
	N1	13 (20,0%)
	N2	14 (21,5%)
	I	17 (26,2%)

¹ O número de gânglios analisados variou entre o mínimo de 4 até ao máximo de 81, tendo sido igual ou superior a 20 em pelo menos 50% dos doentes. Em 15 doentes esta informação não estava disponível.

Estádio pTNM	II	18 (27,7%)
	III	16 (24,6%)
	IV A	14 (21,5%)

Tabela VII- Análise descritiva das características clínicas e patológicas (n=65).

Diferenciação	G1	23 (35,4%)
	G2	36 (55,4%)
	G3	4 (6,2%)
	Desconhecido	2 (3,1%)
Tumor na margem	Positivo (≤ 1 mm)	15 (23,1%)
	Negativo (> 1 mm)	42 (64,6%)
	Desconhecido	8 (12,3%)
Score Bryne	≤ 7	25 (38,5%)
	> 7	40 (61,5%)
Padrão de Invasão	1	6 (9,2%)
	2	38 (58,5%)
	3	18 (27,7%)
	4	2 (3,1%)
	Desconhecido	1 (1,5%)
Score Anneroth/Batsakis	≤ 11	21 (32,3%)
	> 11	44 (67,7%)
Angioinvasão	Presente	9 (13,8%)
	Ausente	56 (86,2%)
Neuroinvasão	Presente	14 (21,5%)
	Ausente	50 (76,9%)
	Desconhecido	1 (1,5%)

Tabela VII (continuação) – Análise descritiva das características clínicas e patológicas (n=65).

Considerando isoladamente o padrão de invasão na frente invasiva (1, 2, 3 e 4) foram determinados quatro grupos, respectivamente: 6 (9,2%), 38 (58,5%), 18 (27,7%) e 2 (3,1%). Num caso não foi possível avaliar o padrão de invasão.

A presença de angioinvasão foi determinada em 9 casos (13,8%) e de neuroinvasão em 14 casos (21,5%).

5.2 Estudo dos factores de prognóstico para a sobrevivência global

Análise Univariada

Factor		Observações	p-value log rank	p-value Peto
Score Bryne	≤ 7		p= 0.857	p= 0.989
	> 7			
Padrão de Invasão	1		p= 0.357	p= 0.438
	2			
	3			
	4			
Padrão de invasão	1+2		p= 0.107	p= 0.153
	3+4			
Score Anneroth/Batsakis	≤ 11		p= 0.893	p= 0.785
	>11			
Ki-67	Baixo	≤20	p= 0.365	p= 0.473
	Médio-Baixo	>20 & ≤50		
	Médio-Alto	>50 & ≤70		
	Alto	>70		
Ki-67	≤50		p= 0.497	p= 0.493
	>50			
Diferenciação	G1		p= 0.733	p= 0.753
	G2			
	G3			
Tumor na margem	Pos		p= 0.262	p= 0.315
	Neg			
Angioinvasão	Pos		p= 6e-06	p= 2.24e-05
	Neg			
Neuroinvasão	Pos		p= 0.0169	p= 0.0154
	Neg			

Tabela VIII – Análise univariada da relação dos parâmetros clinicopatológicos com a sobrevivência global.

Factor		Observações	p-value (log rank)	p-value (Peto)
Espessura	≤3,0 mm	n=6	p= 0.359	p= 0.292
	3,1-7,0 mm	n=11		
	>7,0 mm	n=48		
pT	T1		p= 0.18	p= 0.179
	T2			
	T3			
pN	N0		p= 2.28e-05	p= 2.43e-05
	N1			
	N2			
Estádio TNM	I		p= 6.62e-05	p= 6.64e-05
	II			
	III			
	IV A			
Gênero	Feminino		p= 0.329	p= 0.463
	Masculino			
Idade	21-40 anos	n=4	p= 0.202	p= 0.219
	41-60 anos	n=26		
	>60 anos	n=35		
Recidiva	Não	n=41	p= 3.67e-11	p= 2.76e-09
	Sim	n=24		

Tabela VIII (Continuação)– Análise univariada da relação dos parâmetros clinicopatológicos com a sobrevivência global.

Face aos dados e para o nível de significância usual de 5%, na análise univariada (teste log rank) os factores com significado prognóstico na sobrevivência global encontrados foram os seguintes: angiomas, neuroinvasão, classificação pN, estágio p TNM e recidiva (Tabela VIII)

A estratificação por grau de diferenciação (Figura 14), tumor na margem (Figura 14), espessura do tumor (Figura 15), presença de angio e neuroinvasão (Figura 16), sistemas de graduação (Figura 17) e estágio (Figura 18) são apresentadas a seguir.

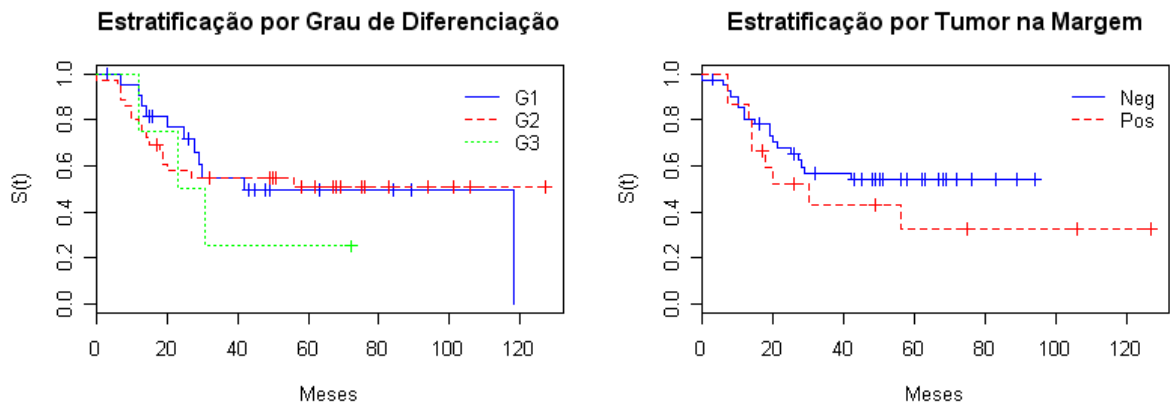


Figura 14: Gráficos de estratificação por grau de diferenciação e pela existência de tumor na margem.

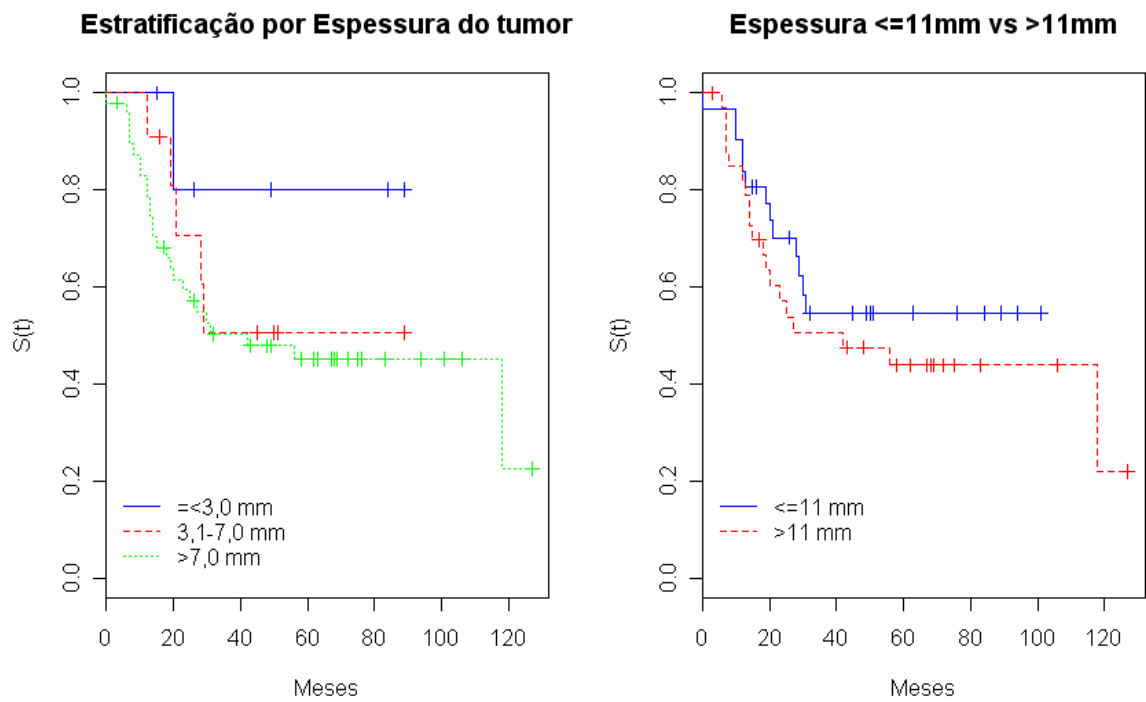


Figura 15: Gráficos de estratificação por espessura do tumor.

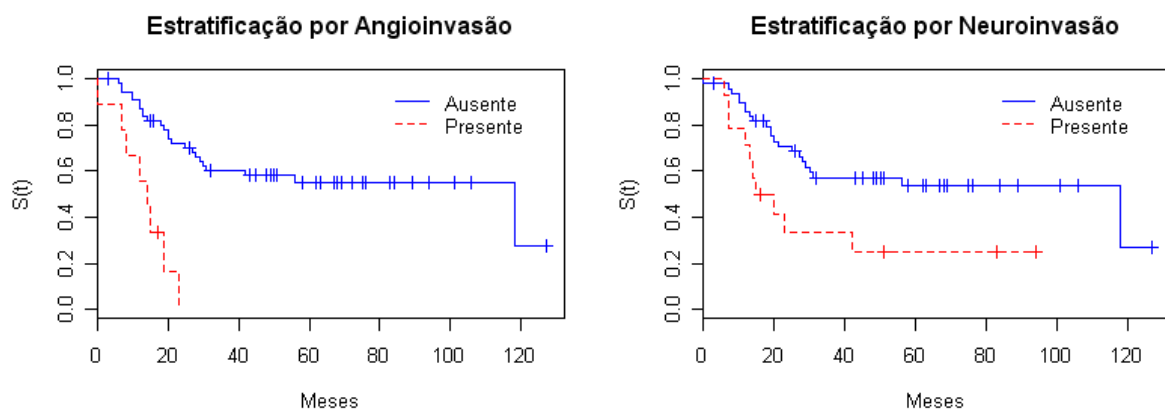


Figura 16: Gráficos de estratificação por angioinvasão e por neuroinvasão.

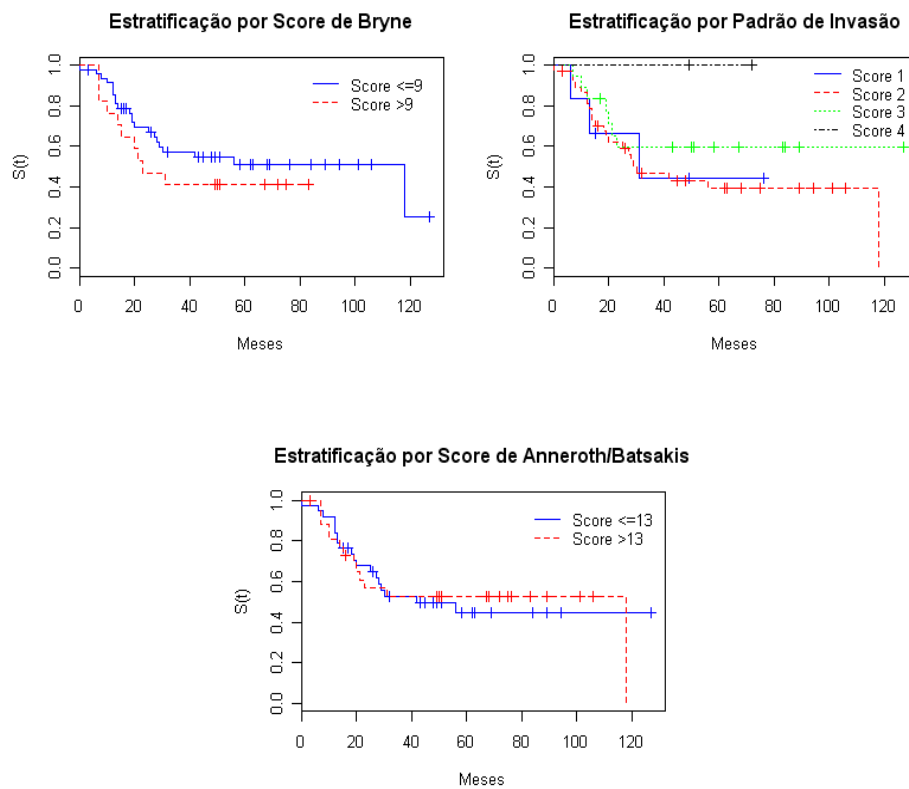


Figura 17: Gráficos de estratificação por score de graduação e padrão de invasão..

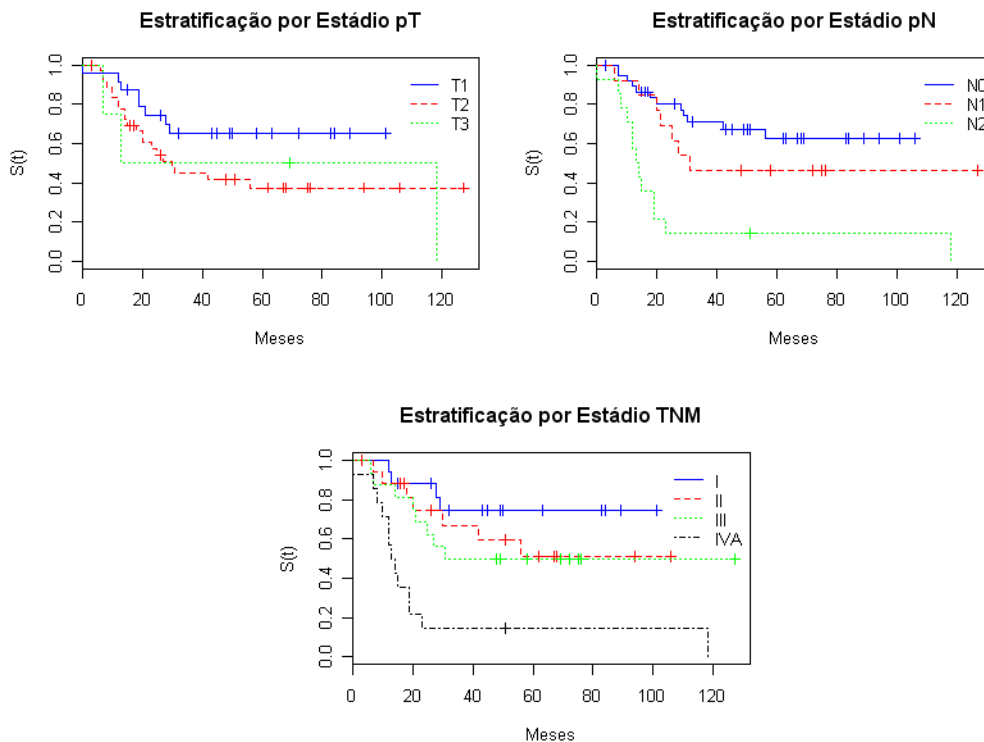


Figura 18: Gráficos de estratificação por estágio do tumor.

Análise multivariada – Modelo de Cox de riscos proporcionais

Esta análise reporta-se apenas a casos com classificação pT, T1 ou T2 e diferenciação de grau 1 ou 2 (foi eliminado um caso com T3 e outro com G3).

Foram ainda eliminados todos os casos com observações omissas em relação a pelo menos uma das covariáveis em estudo. Foi assim utilizado um *data set* com 50 doentes (Tabela IX).

Foram testadas as seguintes covariáveis: idade; género; espessura do tumor; índice de marcação Ki-67/MIB1; grau de diferenciação; *score* Bryne (≤ 7 vs > 7); padrão de invasão (1-2 vs 3-4); *score* Anneroth / Batsakis (≤ 11 vs > 11); tumor na margem (positivo vs negativo); angioinvasão; neuroinvasão; pT; pN e recidiva.

A selecção do modelo foi feita com base no Teste da Razão de Verossimilhanças segundo o método *forward* usando como critérios de entrada *p-value* $< 0,10$ e de saída *p-value* $> 0,15$.

n = 50				
	coef	exp(coef)	se(coef)	z
p				
Recidiva	2.244	9.435	0.511	4.39
1.1e-05				
pN1	0.717	2.048	0.623	1.15
2.5e-01				
pN2	2.754	15.713	0.636	4.33
1.5e-05				
Tumor na margem	1.020	2.774	0.484	2.11
3.5e-02				
	exp(coef)	exp(-coef)	lower.95	
upper.95				
Recidiva	9.435	0.1060	3.464	

Tabela IX – Modelo de Cox de riscos proporcionais. Modelo final. *exp(coef)* corresponde ao *Hazard Ratio* (ou razão de riscos); valores acima de 1 indicam aumento do risco de morte e valores inferiores a 1 indicam diminuição; o intervalo de confiança para o *Hazard Ratio* é apresentado nas colunas *lower.95* e *upper.95*. Classes de referência: doente sem recidiva; pN0 ou N0; sem tumor na margem; padrão de invasão 1-2.

O modelo permite explicar 58,7% da variabilidade total encontrada na sobrevivência global neste conjunto de dados (Rsquare=0,587) o que o torna perfeitamente aceitável.

Em análise multivariada o modelo final permite definir como variáveis com efeito independente para a sobrevivência as seguintes: pN2, a ocorrência de recidiva, pN1 e a existência de tumor na margem de excisão cirúrgica.

5.3 Estudo dos factores de risco para recidiva

Análise univariada

Para a análise univariada dos factores de risco para recidiva foram utilizados o teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exacto de Fisher. Testes bilaterais, tendo sido considerado o nível de significância de 5% (Tabela X).

Factor		Obs.	p-value Qui-quadrado	p-value Fisher
Score Bryne	≤ 7		p-value = 0.903	p-value = 1
	> 7			
Padrão de Invasão	1		p-value = 0.6544	p-value = 0.7648
	2			
	3			
	4			
Padrão de invasão	1+2		p-value = 0.7806	p-value = 1
	3+4			
Score Anneroth/Batsakis	≤ 11		p-value = 0.4934	p-value = 0.5858
	>11			
Ki-67	Baixo	≤20	p-value = 0.9802	p-value = 1
	Médio-Baixo	>20 & ≤50		
	Médio-Alto	>50 &		

		<=70		
	Alto	>70		
Ki-67	<=50		p-value = 0.8804	p-value = 1
	>50			
Diferenciação	G1		p-value = 0.2898	p-value = 0.3837
	G2			
	G3			
Tumor na margem	Pos		p-value = 0.6424	p-value = 0.7552
	Neg			
Angioinvasão	Pos		p-value = 0.2121	p-value = 0.2721
	Neg			
Neuroinvasão	Pos		p-value = 0.08587	p-value = 0.1200
	Neg			
Espessura	≤3,0 mm	n=6	p-value = 0.5476	p-value = 0.6318
	3,1-7,0 mm	n=11		
	>7,0 mm	n=48		
pT	T1		p-value = 0.1191	p-value = 0.09395
	T2			
	T3			
pN	N0		p-value = 0.1730	p-value = 0.1965
	N1			
	N2			
Estádio TNM	I		p-value = 0.2760	p-value = 0.3018
	II			
	III			
	IV A			
Género	Feminino		p-value = 0.4225	p-value = 0.5916
	Masculino			
Idade	21-40 anos	n=4	p-value = 0.2851	p-value = 0.4193
	41-60 anos	n=26		
	>60 anos	n=35		

Tabela X - Análise univariada da associação entre os parâmetros clinicopatológicos e a ocorrência de recidiva.

Face aos dados e para o nível de significância usual de 5%, a análise univariada com recurso ao teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste exacto de Fisher, não foi possível demonstrar estatisticamente qualquer associação entre qualquer das variáveis avaliadas e a recidiva da doença.

Efeito da espessura do tumor e do índice de Ki-67 na probabilidade de recidiva

Foi avaliado o efeito da espessura do tumor e do índice de Ki-67 na probabilidade de recidiva com recurso a um modelo de regressão logística.

Desta forma foi possível fazer uma avaliação sem necessidade de categorização das covariáveis. Foram obtidos os seguintes resultados:

Espessura do tumor – face aos dados e para os níveis de significância usuais de 1% e 5% , não foi possível demonstrar uma associação entre a espessura do tumor e a probabilidade de recidiva (teste de Wald: p-value = 0,180; teste de razão de verosimilhanças-*deviance*: p-value=0,173).

Ki-67 – face aos dados e para os níveis de significância usuais de 1% e 5%, não foi possível demonstrar uma associação entre espessura do tumor e probabilidade de recidiva (teste de Wald: p-value=0,547; teste de razão de verosimilhança – *deviance*: p-value=0,544).

Relação entre pN / Espessura do tumor

Foi avaliado se existiria uma associação entre pN e a espessura, concretamente se existiria uma diferença estatisticamente significativa na espessura do tumor entre os vários grupos pN (N0 vs N1 vs N2). Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (dada a reduzida dimensão dos grupos : N0 = 38; N1=13; N2=14)- Figura 19.

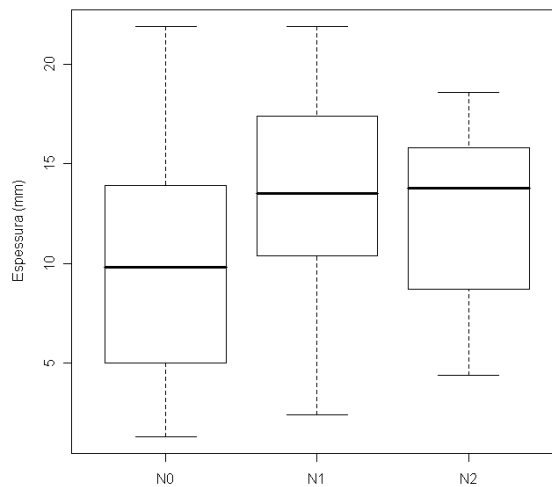


Figura 19: Espessura do tumor por classificação pN (n=65).

Embora não fosse possível, face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1%, demonstrar uma diferença significativa entre estes 3 grupos (Kruskal-Wallis: $p=0,0764$, para um valor *borderline* de 0,05), é patente uma tendência para os casos com gânglios positivos apresentarem valores medianos de espessura superiores (mediana de espessura: N0 – 9,8mm; N1- 13,5mm; N2 – 13,8mm).

Relação entre Índice Ki-67 / pN

Foi avaliado se existe uma diferença estatisticamente significativa no índice Ki-67 entre os vários grupos pN (N0 vs N1 vs N2). Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis .

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1% não foi possível demonstrar uma diferença significativa entre os 3 grupos (Kruskal-Wallis: $p=0,5935$).

Relação entre pN / Angioinvasão

Foi avaliado se existe uma associação entre angioinvasão (presente vs ausente) e a classificação pN. Foi utilizado o teste exacto de Fisher.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1%, existe evidência para afirmar que há uma associação estatisticamente significativa entre a classificação pN e a presença de angioinvasão (teste exacto de Fisher: $p=0,0002710$).

Relação entre pN / Neuroinvasão

Foi avaliado se existe uma associação entre neuroinvasão (presente vs ausente) e a classificação pN. Foi utilizado o teste de Fisher.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1% não foi possível demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre a classificação pN e a presença de neuroinvasão (teste exacto de Fisher: $p=0,1519$).

Relação entre Ki-67 / Espessura

Foi avaliado se existe uma correlação entre a espessura do tumor e o índice de Ki-67. Foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Spearman (alternativa ao coeficiente de correlação de Pearson sem pressuposto de normalidade).

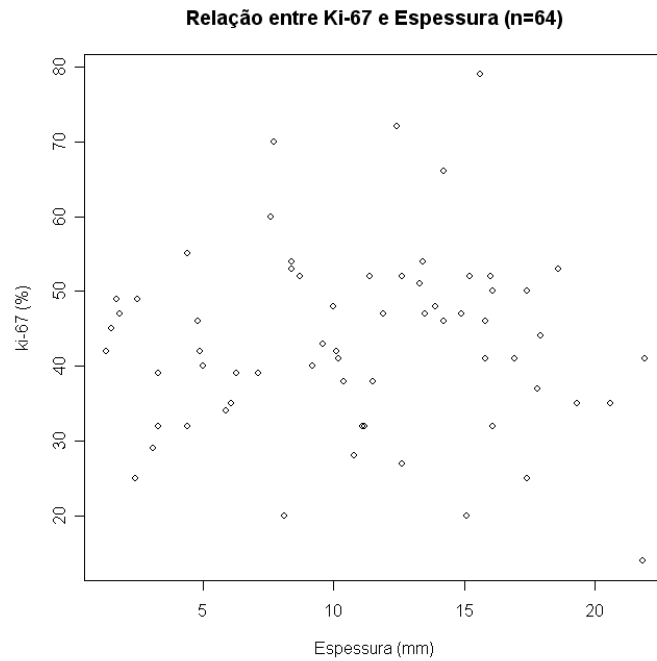


Figura 20: A dispersão dos dados não permite evidenciar qualquer correlação entre o índice de marcação Ki-67 e a espessura do tumor.

Face aos dados não é possível evidenciar qualquer correlação entre Ki-67 e a espessura do tumor no grupo de doentes analisado (coeficiente de correlação de Spearman = 0.031; $p=0,804$) - Figura 20.

Foi ainda avaliado se é adequado considerar que as variáveis Ki-67 e espessura seguem uma distribuição normal.

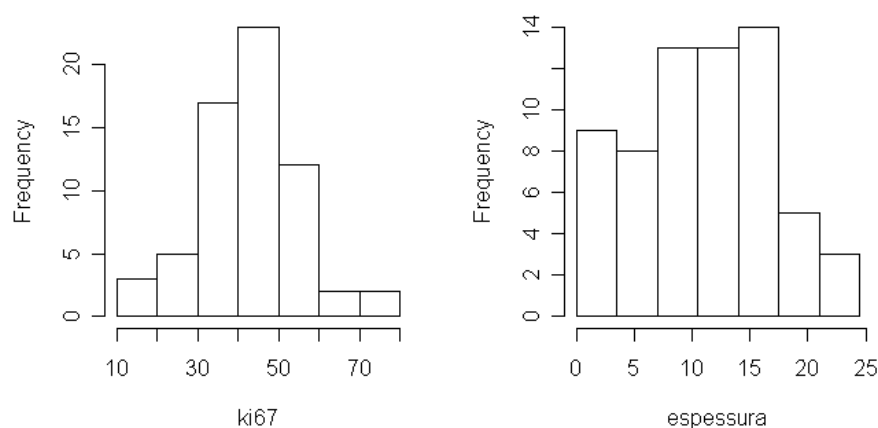


Figura 21: Histograma de Ki-67 e espessura. Em ambos os casos não existe evidência para rejeitar a “normalidade”.

O teste Shapiro-Wilk ($p= 0,2595$ para Ki-67 e $p= 0,1180$ para espessura) mostra que em ambos casos não existe evidência para rejeitar a “normalidade” (Figura 21), pelo que também se poderia utilizar em alternativa ao teste de Spearman a correlação de Pearson.

Os resultados obtidos foram concordantes com o que foi obtido com recurso à alternativa não paramétrica de Spearman, ou seja, não há evidência de que estas variáveis estejam correlacionadas.

Relação entre índice Ki-67 / Angioinvasão

Foi avaliado se existe uma diferença estatisticamente significativa no índice de Ki-67 entre os grupos com e sem angioinvasão. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (alternativa não paramétrica ao teste t-Student).

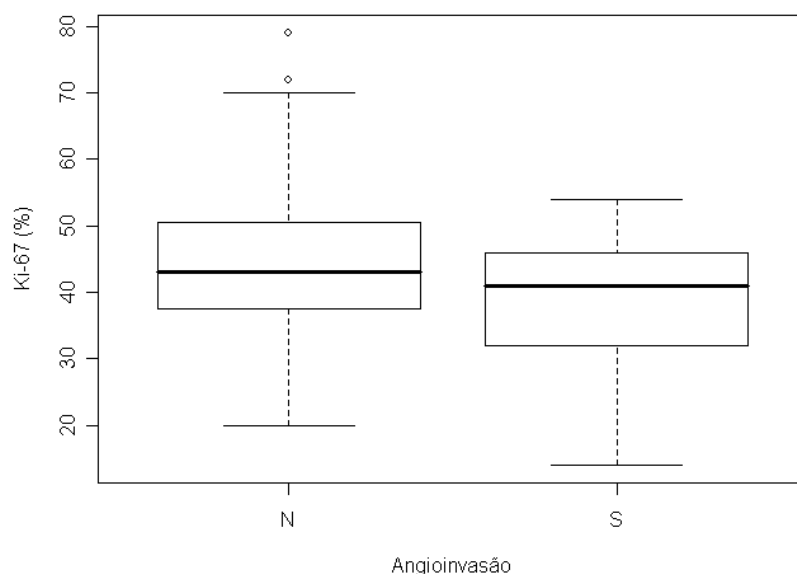


Figura 22: Relação entre índice de Ki-67 e angioinvasão.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1% não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os tumores

com e sem angioinvasão quanto ao índice Ki-67 (Mann-Whitney: $p=0,3791$) -
Figura 22.

Relação entre índice Ki-67 / Neuroinvasão

Foi avaliado se existe uma diferença estatisticamente significativa no índice Ki-67 entre os grupos com e sem neuroinvasão. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (alternativa não paramétrica ao teste t-Student).

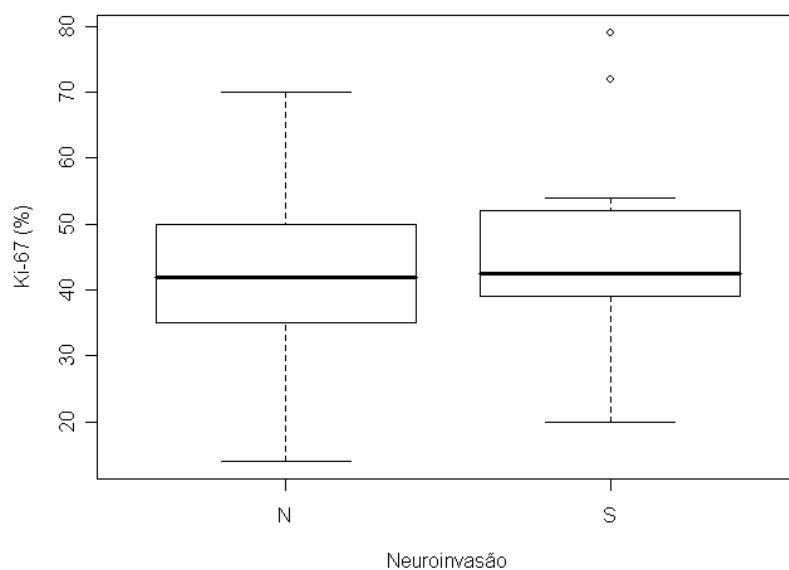


Figura 23: Relação entre índice de Ki-67 e neuroinvasão.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1%, não foi possível demonstrar uma diferença significativa entre os tumores com e sem neuroinvasão quanto ao índice Ki-67 (Mann-Whitney: $p=0,6791$) – Figura 23.

Relação entre Espessura / Angioinvasão

Foi avaliado se existe uma diferença estatisticamente significativa na espessura do tumor entre os grupos com e sem angioinvasão. Foi utilizado o teste Mann-Whitney (alternativa não paramétrica ao teste t-Student).

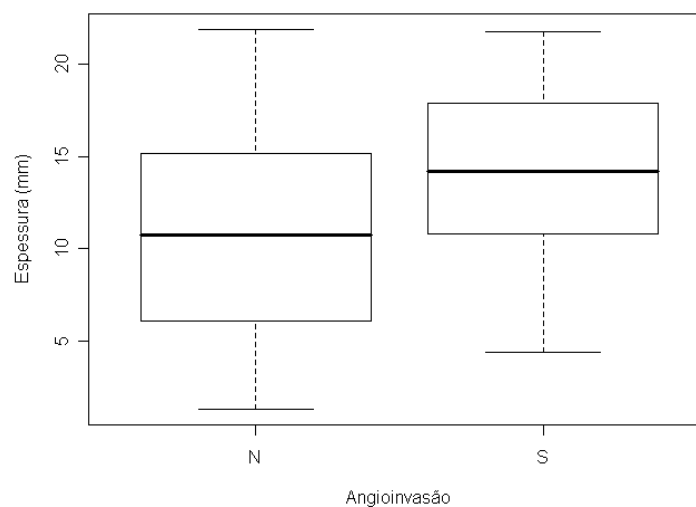


Figura 24: Relação entre espessura e angioinvasão.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1%, não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os tumores com e sem angioinvasão quanto à espessura.

No entanto documenta-se uma tendência para que os tumores com maior espessura apresentem angioinvasão (Figura 24).

Relação entre Espessura / Neuroinvasão

Foi avaliado se existe uma diferença estatisticamente significativa na espessura do tumor entre os grupos com e sem neuroinvasão. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (alternativa não paramétrica ao teste t-Student).

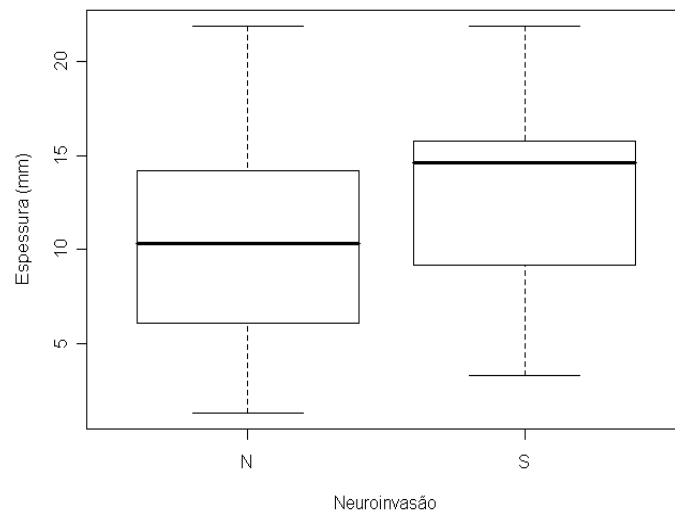


Figura 25 : Relação entre espessura e neuroinvasão.

Face aos dados e para os níveis de significância usuais de 5% e 1%, não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os tumores com e sem neuroinvasão quanto à espessura.

No entanto documenta-se uma tendência para que os tumores com maior espessura apresentem neuroinvasão (Figura 25).

Nas figuras seguintes (Figuras 26 e 27) são apresentados aspectos da marcação imunocitoquímica das células da frente invasiva com o anticorpo Ki-67/MIB1.

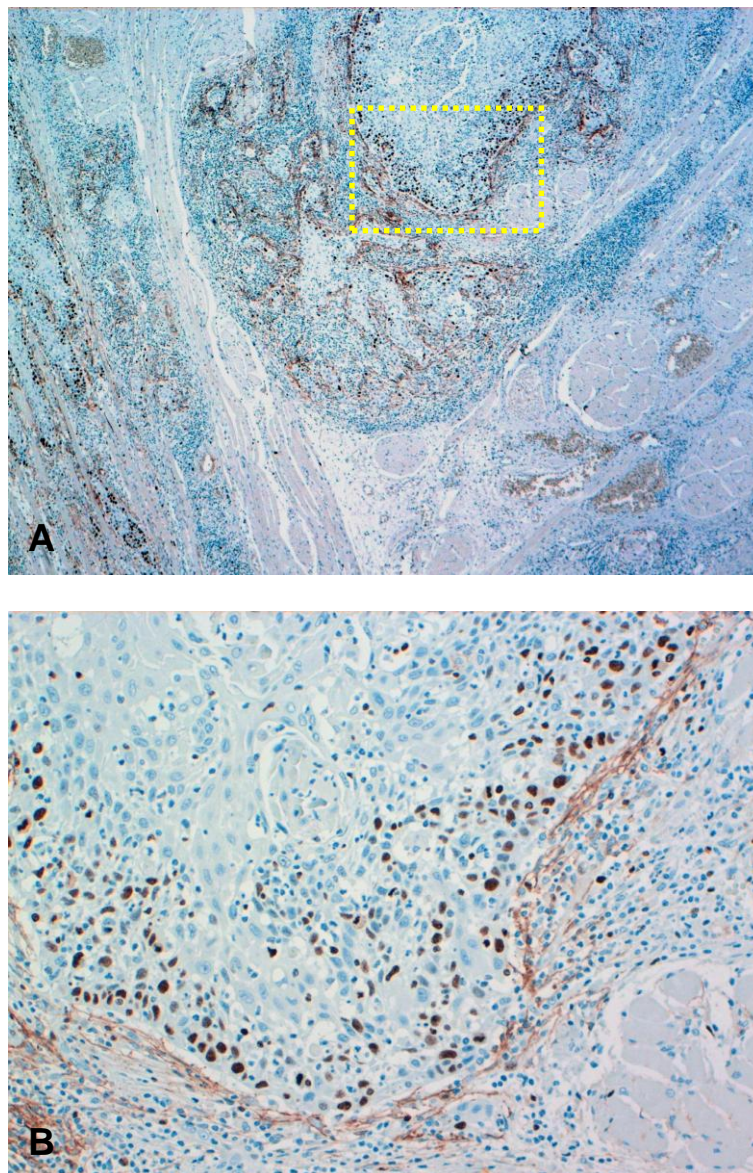


Figura 26: A) aspecto da marcação com Ki-67 / MIB1 na frente invasiva tumoral; B) imagem de pormenor.

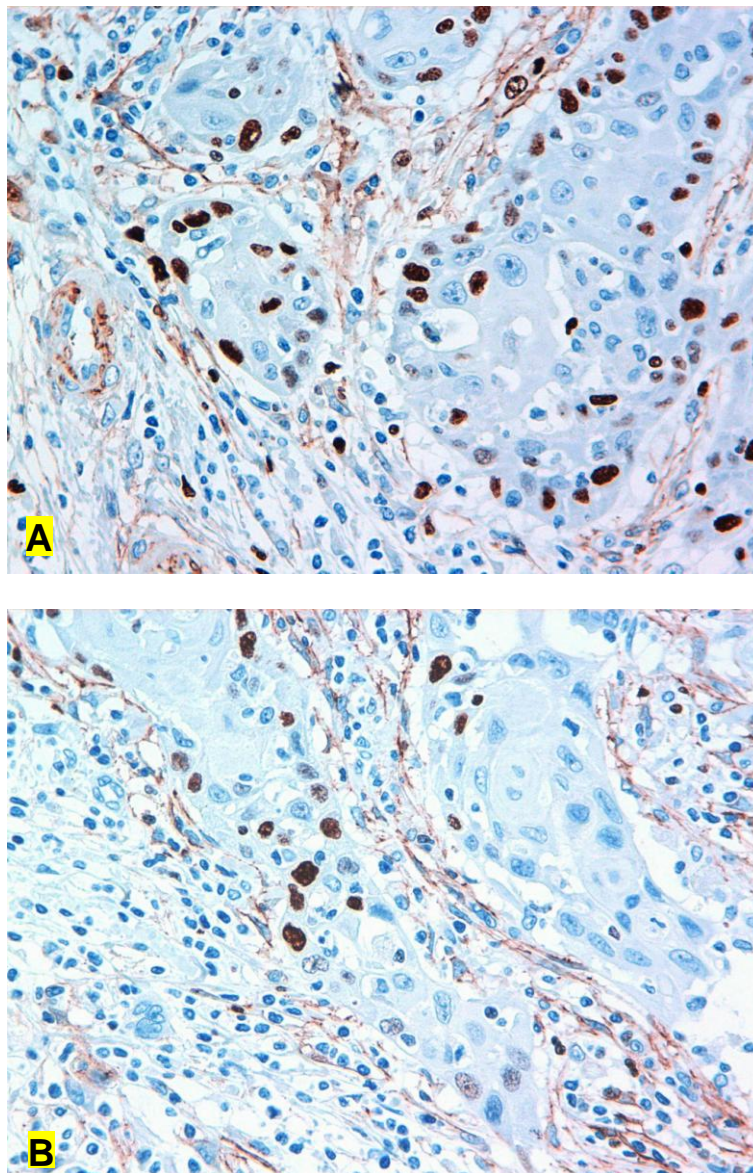


Figura 27: Variabilidade da marcação celular com Ki-67 / MIB1. A) maior proporção de células tumorais marcadas; B) menor proporção de células tumorais marcadas.

5. DISCUSSÃO

O estudo e a interpretação dos marcadores ou indicadores de prognóstico no cancro constitui uma área de investigação primordial.

No entanto o valor contributivo de muitos dos trabalhos efectuados para um melhor conhecimento dos processos da cancerigénese e da progressão tumoral é variável e o seu valor intrínseco pode ser prejudicado por uma menor qualidade metodológica e o seu significado diminuído pela variabilidade dos métodos de laboratório e estatísticos, bem como pela sua dimensão.

Estas considerações são válidas também para a investigação dos factores de prognóstico do cancro oral, particularmente os factores histomorfológicos que são os que mais directamente se relacionam com o próprio tumor e que portanto melhor poderão exprimir a sua capacidade evolutiva, quer localmente, quer loco-regionalmente, quer à distância.

Neste estudo a população foi seleccionada num universo de 1356 casos de doentes com CPC da língua (incluindo a base da língua) registados na base de dados do Arquivo do ROR-Sul, entre 1998 e 2007. Dos 149 casos com localização na língua móvel, T1 e T2, foram depois seleccionados todos os casos tratados primariamente com cirurgia e com registo clínico completo, incluindo o relatório anatomo-patológico pós-operatório, perfazendo um total de 65 casos. Ficou assim assegurada a homogeneidade da amostra do ponto de vista da localização do tumor, estágio clínico, modalidade terapêutica inicial e tempo de seguimento.

O tratamento primário consistiu na ressecção cirúrgica do tumor e, em 50 casos (76,6%), foi associado um esvaziamento ganglionar cervical: selectivo de tipo supra-omoióideo, para estadiamento, nos tumores T2 sem evidência clínica ou imagiológica de adenopatias cervicais; radical modificado quando havia evidência de adenopatias cervicais, com citologia aspirativa confirmativa de metastização ou com critérios imagiológicos de metastização ou suspeita de metastização. O

número de gânglios do esvaziamento variou entre um mínimo de 4 e um máximo de 81, sendo superior a 20 em pelo menos em 50% dos doentes.

Os doentes com gânglios metastáticos, com margem tumoral escassa ou coincidente com o tumor, ou com ambos, e ainda com extensão extraganglionar das metástases, foram ulteriormente submetidos a terapêutica complementar com radioterapia externa, de acordo com o protocolo seguido até então no IPOLFG. Assim foram submetidos a radioterapia externa complementar 24 doentes (36,9%).

Actualmente a decisão de efectuar não apenas radioterapia, mas quimioradioterapia complementar, fundamenta-se na análise dos chamados "factores de risco": factores de risco *major* (margens tumorais positivas e/ou extensão extra-capsular das metástases ganglionares cervicais) e factores de risco *minor* (pT3 ou pT4; gânglios com metástase nos níveis IV ou V; invasão vascular e/ou invasão perineural). É ainda avaliada a situação clínica global do doente, nomeadamente quanto ao índice de Karnofsky. Deste modo alguns dos doentes acima referidos seriam actualmente propostos para quimioradioterapia complementar.

O estadiamento pTNM destes 65 casos dispersou-os pelos 4 estádios, sendo 35 (53,9%) dos estádios I e II, e 30 (46,1%) dos estádios III e IVa. Admite-se que exista muitas vezes um sub-estadiamento clínico dos casos de CPC oral T1 e T2, razão pela qual é mandatário efectuar uma avaliação cervical com ultrassonografia e eventual citologia aspirativa ecoguiada, cujo valor preditor está muito dependente da experiência do radiologista que a efectua, o que de algum modo lhe condiciona esse mesmo valor.

Quer o estádio pTNM, quer pN, evidenciaram neste estudo possuir um elevado significado prognóstico na sobrevivência global em análise univariada. pN (pN1 e pN2) mostrou ainda em análise multivariada possuir elevado significado prognóstico para a sobrevivência global. Em especial pN2 exprimiu um $exp(coef)$ muito elevado em análise multivariada - modelo de Cox.

Pode pois admitir-se que, num conjunto de casos apenas T1 e T2 com localização circunscrita à língua, todos tratados primariamente com cirurgia e alguns submetidos ulteriormente a radioterapia complementar, um dos factores

determinantes do prognóstico de sobrevivência seja o estado dos gânglios cervicais. Este condiciona também e muito o estadiamento TNM final.

Segundo os critérios definidos neste trabalho quanto à positividade das margens de ressecção cirúrgica (positiva se margem ≤ 1 mm) verifica-se que em 15 casos (23,1%) a mesma foi positiva. Não deve todavia esquecer-se que a fixação dos tecidos em formalina e a sua inclusão em parafina determina uma diminuição da dimensão real entre a 15% a 25%.

Embora o parâmetro margem positiva não tenha mostrado possuir significado prognóstico para a sobrevivência global e recidiva em análise univariada, já em análise multivariada tal não acontece. Neste modelo a positividade das margens representou um aumento do risco de morte, nos intervalos de confiança 1,075 e 7,16.

A existência de margens cirúrgicas positivas é na realidade considerada como um factor de risco para a recidiva local do tumor. A definição de positividade das margens depende do estudo e pode significar a existência de tumor na margem cirúrgica inicial, na margem cirúrgica final após re-excisão, na área de 5mm periférica ao tumor e carcinoma *in situ* ou displasia na margem cirúrgica final. Woolgar (2006) refere os critérios seguidos no Reino Unido e que definem como negativas margens superiores a 5 mm margens escassas entre 1 e 5 mm e positivas inferiores a 1 mm, coincidentes com o tumor ou o tumor transeccionado. Consideramos estes critérios totalmente razoáveis e descritivos e são os que utilizamos na prática cirúrgica e também neste estudo.

Num extensivo trabalho efectuado por Looser, Shah e cols. no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, publicado em 1978, no qual foram avaliados quanto ao estado das margens cirúrgicas 1775 casos e seleccionados 62 com margens microscopicamente positivas (menos de 5 mm do limite do tumor, tumor na margem e atipia, displasia ou carcinoma *in situ* na margem), encontraram recidiva local entre 64 e 85% destes e doentes e apenas 35% no grupo de doentes com margens negativas.

Ulteriormente muitos outros trabalhos confirmaram a importância prognóstica das margens cirúrgicas no CPC oral, quer quanto à recidiva local ou

loco-regional, quer quanto à sobrevivência global em análise univariada. No entanto não foi encontrada relação com a metastização regional ou à distância.

Existe uma significativa evidência da importância dos factores histomorfológicos do CPC oral na determinação do prognóstico, pelo que têm vindo progressivamente a ser cada vez mais estudados, não só para melhor definir o estadiamento, mas também para integrar os protocolos de decisão terapêutica.

O critério de tamanho superficial do tumor, expresso por T, define apenas uma apreciação unidimensional, anatómica e incompleta, uma vez que ignora a dimensão da espessura ou profundidade de invasão do tumor e necessariamente outros dos seus parâmetros como os de natureza histomorfológica. Já Woolgar (1995) referia que embora T possa ser avaliado clinicamente de uma forma fácil não tem uma correlação definida com a espessura do tumor.

Um dos parâmetros histomorfológicos mais analisados nos tumores T1 e T2 do CPC oral, sobretudo pela sua possível correlação com a metastização cervical, tem sido a espessura. Pretende-se assim identificar doentes clinicamente N0 com maior risco de metastização com vista a serem submetidos a um esvaziamento cervical electivo. Fukano *et al.* (1996) chegam a propor um *cut-off* de 5mm de espessura para os tumores com maior risco de metastização cervical.

Na verdade torna-se razoável admitir que uma maior profundidade de invasão, associada a um maior crescimento determinado pela proliferação celular tumoral, bem como uma maior proximidade de vasos linfáticos e sanguíneos, poderão no seu conjunto aumentar a capacidade de metastização do tumor.

Já em 1975 Breslow, num estudo retrospectivo de 97 casos e prospectivo de 41 casos de melanoma maligno cutâneo de estágio I, concluía que a espessura tumoral era um melhor indicador de prognóstico do que o nível de invasão do tumor, sendo a possibilidade de recidiva directamente proporcional à espessura tumoral. Na sequência destas observações o parâmetro espessura do tumor foi estudado no CPC oral e da orofaringe, principalmente em relação com o envolvimento ganglionar e também em relação com a recidiva loco-regional e com a sobrevivência. Assim, foram efectuados estudos transversais ou de prevalência avaliando a relação da espessura com a presença de metástases cervicais na

altura do tratamento primário mas não durante o *follow-up*, e estudos longitudinais ou de incidência que avaliaram a ocorrência de metástases cervicais durante o *follow-up*.

Dos múltiplos trabalhos registados na literatura destacam-se: Spiro *et al.* (1986), referindo aumento do risco com tumores excedendo os 2 mm de espessura; Mohit-Tabatabai *et al.* (1986), aumento do risco para tumores acima de 1,5 mm de espessura; Urist *et al.* (1987), pior sobrevivência acima dos 6 mm de espessura; Brown *et al.* (1989), maior probabilidade de metastização para tumores acima de 3 mm de espessura e impacto na sobrevivência; Rasgon *et al.* (1989), significativo aumento da incidência de metástases cervicais para tumores acima de 5 mm de espessura; Jones *et al.* (1992) e O'Brien *et al.* (2003), aumento do risco de recidiva para tumores acima de 5 mm de espessura; O-Charoenrat *et al.* (2003), maior risco de micrometastização ganglionar cervical para tumores com espessura superior a 5 mm.

A espessura crítica acima da qual o risco de metastização aumenta consideravelmente varia com a localização anatómica do tumor talvez devido à densidade linfática e à vascularização. Na maior parte dos casos referidos na literatura este *cut-off* situa-se entre os 3 e os 5 mm de espessura tumoral.

Estes estudos dirigiam-se sobretudo ao esclarecimento da necessidade de esvaziamentos cervicais electivos em doentes clinicamente N0 mas adquiriram igualmente um papel importante na análise do risco de recidiva e do prognóstico global de sobrevivência.

Fukano *et al.* (1996) num estudo efectuado em 34 casos de CPC da língua tratados cirurgicamente e em que foi analisada a relação da espessura do tumor com a metastização cervical, concluiu que esta existia e era fortemente significativa e que a incidência de metastização cervical aumentava de forma considerável quando a profundidade de invasão excedia os 5 mm. Em análise univariada, a profundidade da invasão mostrou definir uma diferença estatisticamente significativa entre os doentes com e sem metástases ganglionares cervicais.

González-Moles *et al.* (2002) num estudo retrospectivo de 81 doentes com CPC da língua submetidos a tratamento cirúrgico também concluiu que a espessura do tumor é o parâmetro mais influente na sobrevivência e que esta piora

significativamente quando a espessura tumoral é superior a 3 mm. Este Autor considera ainda haver evidência de que a espessura do tumor pode ter maior influência na sobrevivência do que factores como o estágio clínico e o estágio patológico.

Dada a importância destas conclusões foi sugerida por alguns Autores a necessidade da revisão do sistema de estadiamento TNM quanto ao parâmetro T, considerando especificamente a espessura tumoral. Assim numa extensa revisão de 1532 casos de cancro oral o Grupo Austro-Suíço-Germânico para o Estudo dos Tumores da Região Maxilofacial (DÖSAK) propôs que a espessura do tumor fosse incorporada como parâmetro na classificação TNM (Howaldt *et al.* 1999).

Na série de 65 casos estudados no nosso trabalho, 48 (73,8%) apresentavam espessura superior a 7mm. Essa medição está ligeiramente acima da espessura média descrita na literatura para T1 e T2 da língua móvel. Cremos que tal se deve ao facto de termos procedido à determinação da espessura até ao limite microscópico da frente invasiva com recurso à visualização de grande aumento. Foram também estratificados os valores de espessura em três categorias (≤ 3 mm, 3,1mm a 7.0 mm e >7 mm).

O parâmetro espessura não mostrou neste estudo possuir em análise univariada significado prognóstico, nem na sobrevivência global, nem na ocorrência de recidiva.

Também não foi possível demonstrar uma relação significativa entre a espessura e pN. No entanto deve referir-se que se demonstrou uma tendência para os casos com gânglios positivos apresentarem valores medianos de espessura superiores (mediana da espessura: N0 - 9,8mm; N1 - 13,5mm; N2 - 13,8mm). De qualquer modo não foi possível definir um *cut-off* da espessura para um maior risco de metastização cervical, sendo que este valor será certamente sempre bastante arbitrário.

Igualmente não foi possível demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem angioinvasão e a espessura do tumor. O mesmo se verificou entre a espessura e a neuroinvasão. Todavia, em ambos os

casos, foi demonstrado que existe uma tendência para que os tumores com angioinvasão e neuroinvasão tenham maior espessura.

Podendo ser, se considerado isoladamente, um elemento de análise relativamente simplista como factor de prognóstico, a importância da espessura tumoral está porém documentada sobretudo quando se conjuga com a análise de outros factores tumorais, em particular os que se relacionam com a FIT. Deste modo não se considera razoável deixar de o incluir nesse contexto.

Através dos sistemas de graduação de malignidade do CPC oral, cuja referência primordial é o sistema de Broders, tem sido tentado estabelecer uma correlação entre as características histopatológicas do tumor e o seu comportamento biológico, tendo em vista o prognóstico.

Da diferenciação celular evoluiu-se para sistemas multifactoriais de graduação, como o de Jakobsson e suas ulteriores modificações, valorizando parâmetros histológicos que tivessem revelado possuir valor prognóstico.

Foram assim introduzidos diversos parâmetros como o padrão de invasão, a frequência de mitoses, o grau de queratinização e o pleiomorfismo nuclear.

Estes sistemas acabaram por se concentrar no estabelecimento do grau (*score*) de malignidade em detrimento de outros factores.

Ulteriormente foi introduzido por Anneroth, Batsakis e Luna (1987) um sistema de graduação que considerava, de forma inovadora, para além da caracterização da população celular tumoral, a relação tumor-hospedeiro. Refira-se que o critério “invasão vascular”, referido originalmente por Jakobsson em 1973, foi omitido no sistema de Anneroth/Batsakis.

Bryne introduziu o conceito de que as características celulares na frente invasiva tumoral bem como a relação tumor-hospedeiro a este nível poderiam fornecer uma melhor informação prognóstica sobre o tumor. Este conceito, que constitui a base do sistema de graduação por ele proposto, encontrou suporte em trabalhos que afirmavam o significado prognóstico independente da graduação da FIT na recidiva e na metastização.

Bryne, em trabalhos publicados em 1989 e depois em 1991 e 1992, demonstrou que as áreas histologicamente mais invasivas dos CPCs da área oral ou frente invasiva tumoral (FIT) apresentavam frequentemente características morfológicas e moleculares diferentes das zonas mais superficiais dos tumores. A observação de que as células tumorais na parte mais invasiva dos tumores malignos diferiam substancialmente das células na parte central ou mais superficial existia de resto já anteriormente .

Bryne sugeriu que a localização mais superficial ou central das células no tumor as impede de exprimir as suas capacidades de invasão e metastização, ao contrário das células da FIT. Para além disso existe uma heterogeneidade celular tumoral na FIT, com uma desdiferenciação gradual das células, já referida por Nicolson (1987) bem como um maior grau de dissociação celular, que lhe conferiria uma potencial capacidade de invasão. Este fenómeno é frequentemente observado no CPC e ainda no melanoma maligno e ainda em vários adenocarcinomas (gástrico, colrectal e prostático).

Bryne considerou ainda as diversas interacções entre o tumor e o hospedeiro a nível da FIT, já reconhecidas e que têm a maior importância na progressão tumoral local conforme foi definido em diversos trabalhos (Liotta *et al.* 1991; Folkman 1995; Bernstein e Liotta, 1994; Gregoire e Lieubeau 1995; Kerbel 1995; Mac Dougall e Matrisian 1995; Basbaum e Werb 1996; Price *et al.* 1997).

Com base nestas observações, Bryne *et al.* (1989, 1992) introduziram a hipótese de que as características celulares tumorais na FIT bem como da relação tumor – hospedeiro nesta FIT profunda forneceriam uma melhor informação prognóstica sobre o tumor. Propuseram assim um novo sistema de graduação histológica centrado nas características histopatológicas da FIT. Propuseram ainda a hipótese de que a exclusão das partes central e superficial destes tumores podiam aumentar a capacidade prognóstica do sistema de graduação uma vez que estas áreas seriam menos relevantes para o comportamento do tumor (Bryne *et al.* 1992, 1997).

Foi analisada neste estudo a graduação histológica segundo os sistemas de classificação de Broders, Anneroth/Batsakis e Bryne e foi ainda determinado o padrão de invasão na FIT.

Não foi encontrado significado prognóstico na sobrevivência global ou na ocorrência de recidiva para os parâmetros grau de diferenciação, *score* Anneroth-Batsakis, *score* Bryne ou padrão de invasão, em análise univariada.

Vários estudos evidenciaram uma correlação entre estes sistemas de graduação e particularmente do padrão de invasão com a sobrevivência e com a metastização, mas alguns autores apontam a pouca utilidade do sistema de Jakobsson quando aplicado ao CPC da língua (Holm *et al.* 1982, Lund *et al.* 1975). Deve referir-se também que os sistemas de graduação multifactorial atribuem igual peso a todos os seus parâmetros de avaliação o que constitui um possível erro estrutural, uma vez que tal não está completamente esclarecido e eventualmente deverá ser necessário estratificar o seu valor relativo.

A complexidade da progressão tumoral do CPC oral é reconhecida, não sendo um processo simplesmente mecânico de invasão e disseminação metastática. Na verdade sabe-se que este processo de invasão e metastização implica a perda de adesão intercelular, depois a ligação das células à membrana basal, a proteólise da matriz extracelular e finalmente a migração celular.

A interacção das células tumorais com a MEC envolve a intervenção de diversos factores, conduzindo à proteólise da MEC através das MMPs. Por seu lado o epitélio está em relação com o mesênquima circundante, constituído por fibroblastos, microvasos e linfáticos, com influência reconhecida na carcinogénese epitelial.

Foi referida a relação de tipo bidireccional entre o epitélio e o mesênquima, bem como o facto de na maior parte dos carcinomas a progressão tumoral se acompanhar de uma perda de diferenciação epitelial das células tumorais e a sua conversão num fenotipo mesenquimatoso, processo este designado de transição epitelial-mesenquimatosa (EMT).

O processo biopatológico de invasão do CPC da mucosa oral desenvolve-se num interface tumor-hospedeiro, no qual se sabe que as células tumorais e o estroma trocam enzimas e citocinas que modificam o microambiente.

As células malignas estimulam continuamente o estroma e as células vasculares do hospedeiro conduzindo a invasão, enquanto que a nível do microambiente os vasos progridem no sentido da massa tumoral, parecendo

estabelecer-se uma zona local permissiva de actividade recíproca, heterotópica, que se poderia definir, segundo Liotta (2001) como um verdadeiro “campo de invasão”.

No decurso do processo maligno de relação epitelial-mesenquimatosa as células redistribuem-se progressivamente ou subregulam as suas ligações epiteliais específicas apicais e basolaterais (incluindo a E-caderina e as citoqueratinas) e reexprimem as moléculas mesenquimatosas (incluindo vimentina e N-caderina) – Grunert et al. 2002, Thiery *et al.* 2002, Huber¹⁴⁷ *et al.* 2005. Estas alterações conduzem à perda de adesão intercelular e ao ganho de motilidade, indispensáveis para a invasão tumoral.

Esta transição epitelial-mesenquimatosa é induzida por vários factores de crescimento que são produzidos quer pelas próprias células tumorais, quer pelas células do estroma, e incluem o factor transformador de crescimento- β (TGF- β), o factor de crescimento hepatocitário (HGF), EGF, factores de crescimento insulina-like (IGFs) e factor de crescimento dos fibroblastos, bem como a actividade proteolítica das MMPs.

Sugerida a importância do padrão de invasão na frente invasiva tumoral, têm sido muito valorizadas as alterações nas características do estroma peritumoral e as suas possíveis interrelações com as alterações epiteliais do próprio tumor.

Como refere Liotta (2001) pode afirmar-se que, a nível molecular, a remodelação do citoesqueleto bem como a adesão e anti-adesão não só estão relacionadas com a motilidade celular, como também se ligam com a proliferação celular e com as vias de sobrevivência. Para que uma célula invada e migre para o microambiente mesenquimatoso é necessário que ocorram conjuntamente sinais pró-invasivos e de resistência à anoiquia, ou seja, à capacidade de escapar à apoptose pela separação das células da membrana basal. Esta resistência pode ser um pré-requisito crítico para o desenvolvimento de um fenótipo tumoral invasivo, conforme referem Swan et al. 2003. O fenótipo anoiquia-resistente do CPC oral tem um padrão de expressão diferente, marcado por alterações cromossómicas que podem contribuir para uma expressão diferencial de genes envolvidos em várias funções celulares (Campo-Trapero *et al.* 2008).

O compartimento estromal contém uma grande variedade de tipos celulares – células imunitárias (linfócitos e células dendríticas), células inflamatórias (monócitos e granulócitos), miofibroblastos e células musculares, células vasculares (células linfoendoteliais, vasculoendoteliais e pericitos) – cuja abundância relativa é variável no local da invasão celular tumoral, não estando bem determinado se essas alterações ocorrem antes ou depois da invasão se verificar.

Foi demonstrado que os fibroblastos do estroma de diversos tumores não são idênticos aos fibroblastos normais e que são ricos em alterações genéticas e podem potencialmente definir o fenotipo tumoral ou ainda induzir ou impedir a transformação do epitélio pré-neoplásico em carcinoma. Weber e cols. (2007), utilizando uma abordagem genómica global, determinaram a extensão das alterações genómicas no estroma do CPC da cabeça e pescoço (122 casos, dos quais 118 da cavidade oral e orofaringe, todos fumadores) e a sua correlação clínico-patológica, tendo concluído que o estroma peri-tumoral aparentemente não maligno em fumadores é rico em alterações genómicas e que o mesênquima é tão afectado pelos carcinogénios como o epitélio do CPC e que contribui de uma forma fundamental para o seu fenótipo clínico.

Podemos portanto admitir, num interessante modelo conceptual de investigação, que o estroma peritumoral facilite e talvez promova a comunicação com as células epiteliais do tumor e que as alterações genéticas das células do estroma possam determinar a codificação de proteínas aberrantes e subverter a interligação entre o epitélio e o estroma promovendo e facilitando a invasão tumoral (Weber 2005, Mueller 2004, Edlund 2004).

Neste sentido parece ser de considerar que, mais do que uma frente invasiva tumoral, existe um verdadeiro campo de invasão tumoral, para utilizar aqui a expressão de Liotta.

De qualquer forma a deslocação da célula invasiva através da barreira da MEC por proteólise pode ser conduzida ou influenciada por quimioatração e pela construção de vias de adesão preferenciais. Esta migração pode ser singular ou colectiva, embora pareça haver vantagem da migração colectiva sobre a singular. Na verdade uma maior massa tumoral de células com diferentes filiações clonais

pode, através de um funcionamento tipo “clone misto”, ser mais eficiente na embolização e sobreviver melhor na metastização em ambiente hostil.

Já se referiu o conceito de que na maior parte dos carcinomas a progressão tumoral se acompanha da perda de diferenciação epitelial das células tumorais e a sua conversão num fenótipo mesenquimatoso. No decurso deste processo as células perdem os seus marcadores epiteliais (como a E-caderina) e adquirem expressão de marcadores mesenquimatosos, como a N-caderina e vimentina, marcadores que adquirem então significado.

Sabe-se também que a chave patológica da EMT é a redução da força de adesão célula-célula, produzida pela repressão transcricional das caderinas (fundamentalmente da E-caderina), com dissolução de junções, separação das células, perda de polaridade e aquisição de uma forma celular mais fusiforme, o que facilita a dispersão e a migração celulares.

O estudo dos mecanismos de invasão das células do CPC (Sahai 2005), num modelo organotípico, mostrou de forma clara que existe um processo celular de invasão colectiva em cordões, nos quais as células mantêm junções célula-célula e muitas outras características epiteliais. Gaggioli e Hooper (2007) mostraram depois que os fibroblastos são as células condutoras do processo invasivo, remodelando a MEC e conduzindo as células invasoras.

As alterações morfológicas das células invasoras são igualmente significativas, designadamente projecções celulares de penetração da membrana basal, profundamente infiltrantes, as invadopodia. Esta pseudopodia invasiva utiliza uma cascata enzimática no ponto celular invasivo (Liotta 2001), podendo a direcção da invasão celular e da migração ser influenciados por factores circundantes, como a atracção química e a criação de vias de adesão preferenciais (Friedl 2004).

No contexto deste modelo morfológico de invasão pode admitir-se que no seio de tecido tumoral a proliferação vascular de neo-vasos com parede fragmentada e células endoteliais alongadas e disseminadas facilite a entrada e a migração das células invasoras com baixa adesividade na circulação, quer linfática, quer sanguínea.

Os vasos capilares linfáticos diferem dos capilares sanguíneos por, apesar de possuírem também uma única camada de células endoteliais estas terem junções menos desenvolvidas e existirem grandes espaços interendoteliais, sendo igualmente desprovidas de fenestrações. Os capilares linfáticos também não possuem uma membrana basal contínua, ao contrário dos capilares sanguíneos. Têm pois uma estrutura morfológica mais permissiva em relação à invasão celular tumoral. A falta de marcadores específicos para o endotélio linfático tem também dificultado a sua distinção do endotélio vascular sanguíneo. A questão da relação entre a linfangiogénese tumoral e a metastização ganglionar não está completamente esclarecida, nomeadamente quanto à relação da hiperexpressão de VEGF-C com a metastização, quanto à possível existência de funções de VEGF-C promotoras da metastização e ainda quanto à efectiva função dos linfáticos. Discute-se se os linfáticos serão simples canais de passagem de células tumorais ou se intervirão directamente na modulação do transporte e na adesão das células tumorais.

Quanto à angiogénese tumoral sabe-se, desde as observações de Folkman no início da década de 70, que os tumores malignos possuem uma vascularização mais aumentada, de resto factor fundamental para o crescimento do próprio tumor. Esta vascularização resulta da formação de microvasos a partir de células endoteliais de capilares justa-tumorais. O crescimento tumoral induz a produção de promotores da angiogénese, fenótipo tumoral angiogénico que também se encontra no CPC oral (como por exemplo a interleucina 8). O VEGF, citocina multifuncional de actividade relacionada com as células endoteliais e o mais estudado dos potenciais mediadores da angiogénese, tem níveis elevados de expressão no CPC oral.

Existe também evidência da relação entre a angiogénese e a metastização, sendo possível que a proliferação e formação de neo-vasos com parede fragmentada e células endoteliais disseminadas e alongadas, expostas a células tumorais de baixa adesão, constituam factor favorável à entrada e migração dessas células na circulação sanguínea e linfática.

Jakobsson havia incluído no seu sistema de graduação multifactorial original uma avaliação da invasão vascular, embora a mesma tivesse sido retirada

nas modificações subseqüentes por causa de alegadas dificuldades na sua correcta detecção. Crissman *et al.* (1984), Brow *et al.* (1989), Shingaki *et al.* (1988) atribuem-lhe significado no prognóstico. No entanto nem o sistema de graduação de Anneroth-Batsakis, nem o de Bryne o incluem.

Neste trabalho a invasão vascular mostrou ter um elevado significado prognóstico da sobrevivência global, em análise univariada.

O mesmo se passa também com a invasão perineural.

A invasão vascular e perineural não têm porém significado no prognóstico de recidiva, em análise univariada.

No estudo da relação entre pN e a angioinvasão foi também encontrada uma associação estatisticamente muito significativa entre os dois parâmetros.

Esta relação entre a invasão linfovascular a nível do carcinoma da língua e o estado dos gânglios cervicais merece uma análise mais detalhada.

Close *et al.*(1987), Sparano *et al.*(2004), Woolgar (1996 e 1999), Yilmaz *et al.* (1998) referiram uma correlação muito significativa entre a invasão linfovascular e a metastização ganglionar cervical. Close *et al.* numa revisão subseqüente (1989) concluíram que a invasão linfovascular mostrou aumentar o risco de recidiva loco-regional do CPC oral tratado cirurgicamente.

Que seja do nosso conhecimento apenas um trabalho (Chandu *et al.* 2005) refere a invasão linfovascular como factor de prognóstico de sobrevida do CPC oral, em análise univariada. A maior parte dos trabalhos referenciados nem consideram a invasão vascular na análise de sobrevida.

Em relação a outros tumores (bexiga, tireoideia, mama e próstata) a relação da invasão linfovascular com a metastização está bem documentada, mas são tumores com reconhecida tendência para a metastização à distância e não para a metastização regional cervical, como é o caso do CPC oral.

Muñoz-Guerra *et al.* (2004) relacionam a presença de linfáticos intratumorais no CPC oral com um mau prognóstico. Noutro trabalho de 2006 os mesmos autores concluem que a expressão de VEGF-C e ainda a presença de linfáticos intratumorais podem ser marcadores de prognóstico úteis no CPC oral. Kyzas *et al.* (2005) também relacionam a presença de êmbolos de células neoplásicas no interior dos linfáticos intratumorais com um maior risco de morte.

A invasão directa do espaço perineural pelas células tumorais é um fenómeno conhecido no CPC oral e permite a sua propagação para além do tumor primitivo.

A existência de invasão perineural tem sido referida como possuindo um significado importante no prognóstico e no controlo loco-regional de vários tipos de carcinoma. O seu papel no risco de metastização linfática foi estudado em relação ao cancro cutâneo (Lever *et al.* 1990), lábio inferior (Frierson *et al.* 1986) e língua móvel (Maddox 1984, Crissman *et al.* 1984, Brown *et al.* 1989). Para além do risco de recidiva loco-regional no CPC oral, foi ainda estudada a influência na sobrevivência global (Myers *et al.* 2000, Soo *et al.* 1986).

Neste estudo foi determinado um significado prognóstico da invasão perineural na sobrevivência global, mas não na recidiva.

No entanto esta relação com a recidiva loco-regional está referida na literatura (de Visscher *et al.* 1998, Fagan *et al.* 1998, Yilmaz *et al.* 1998, Lydiatt *et al.* 1993). Num estudo prospectivo de 622 doentes com CPC oral tratados no M.D.Anderson Cancer Center entre 1991 e 1994 (Galer & Myers, 2008) foi possível determinar o estado da invasão perineural em 404, dos quais 88 (22%) apresentavam invasão. Esta associou-se significativamente com a recidiva local e com a recidiva regional e ainda com a sobrevivência.

A associação entre a invasão perineural e a recidiva local pode resultar quer da propagação centrípeta, quer da propagação centrífuga das células tumorais ao longo dos espaços perineurais. Por outro lado torna-se evidente que estes tumores têm uma maior agressividade biológica.

Deve porém referir-se que o registo de invasão perineural na literatura é muito variável (de 5% a 52%) o que traduz de algum modo a sua sub-valorização histopatológica.

O índice de marcação com Ki-67/MIB1 das células tumorais na frente invasiva foi determinado neste trabalho e não mostrou possuir qualquer significado prognóstico quer em relação à sobrevivência, quer em relação à recidiva.

Igualmente não se demonstrou qualquer relação do índice de Ki-67 com o pN, com a espessura do tumor, com a angioinvasão ou com a invasão perineural.

Esta observação coincide com a referência de Pich, Chiusa e Navone (2004) em artigo de revisão para ausência de valor prognóstico de Ki-67 / MIB-1 em oito trabalhos envolvendo 804 doentes. Os mesmos autores referem ainda que embora se registem muitos trabalhos que mostram correlação da alta actividade proliferativa com mau prognóstico no cancro da cabeça e pescoço, muitos outros não mostram qualquer relação significativa.

No entanto Tumuluri *et al.* (2002, 2004) utilizando o anticorpo Ki-67 e determinando o índice de marcação pela contagem do número de núcleos marcados/mm² de epitélio efectuada a nível da frente invasiva tumoral, encontraram uma relação directa da densidade de proliferação com o estágio clínico, a espessura tumoral e ainda com os hábitos tabágicos e alcoólicos dos doentes da série estudada. Este trabalho revela-se interessante por se coordenar com as observações de Bryne e também de Piffkò (1996) quanto à importância da avaliação da actividade proliferativa do CPC oral na FIT, este último aliás mostrando uma relação significativa do índice com o próprio sistema de graduação de Bryne. Wangsa *et al.*, do Karolinska Institute de Estocolmo, num trabalho publicado em 2008 e que analisou 76 casos de CPC da língua móvel, encontraram uma relação significativa entre a alta actividade proliferativa expressa pelo padrão de marcação com o anticorpo Ki-67 e uma maior incidência de recidiva locoregional no estágio I após tratamento primário com cirurgia e ainda uma relação tendencial com a sobrevivência global, embora não significante.

Pich *et al.* (2004) num estudo de revisão casuística representando um total de 1613 casos de CPC oral referem que, em geral, uma alta actividade proliferativa do tumor está associada com um mau prognóstico. Cerca de 30% destes casos (492) foram investigados usando a análise AgNOR. No entanto noutra conjunto de trabalhos representando um total de 1271 casos a actividade proliferativa celular no CPC oral não demonstrou qualquer valor prognóstico, embora nenhum deles refira a falta de valor prognóstico da análise de AgNOR. Este facto pode talvez significar que a rapidez de proliferação celular avaliada e expressa pela quantificação de AgNOR seja o parâmetro cinético que melhor se poderia

correlacionar com a evolução do CPC oral. Pich considera finalmente que há um grande número de estudos nos quais não se consegue estabelecer uma relação significativa entre a actividade proliferativa e o prognóstico.

Esta variação de resultados pode ter a ver, entre outros factores, com a localização anatómica do tumor, o tipo de tratamento efectuado, a falta de uniformidade dos vários métodos de avaliação da proliferação celular e a sua própria leitura, com o local em que a avaliação foi efectuada (p. ex. áreas de maior ou menor actividade tumoral) e bem assim com a definição e medida da verdadeira actividade proliferativa do tumor.

6. CONCLUSÕES

1. Quer o estágio pTNM, quer pN evidenciaram neste estudo possuir um elevado significado prognóstico na sobrevivência global, em análise univariada. pN (pN1 e pN2) mostrou ainda em análise multivariada possuir elevado significado prognóstico para a sobrevivência global. Em especial pN2 exprime significância muito elevada em análise multivariada (Modelo de Cox de riscos proporcionais).
2. Neste conjunto de casos nos estádios T1 e T2 com localização circunscrita à língua, todos tratados primariamente com cirurgia, um dos factores determinantes do prognóstico de sobrevivência é o estado dos gânglios cervicais quanto à existência ou não de metástases.
3. No conjunto dos factores clinicopatológicos, constata-se o elevado significado prognóstico para a sobrevivência de pN, da recidiva tumoral e da existência de tumor na margem de excisão cirúrgica. Na verdade os parâmetros clinicopatológicos com maior importância foram pN2, recidiva local, pN1 e tumor nas margens de excisão, por ordem decrescente de influência. Em análise multivariada - Modelo de Cox de riscos proporcionais, os parâmetros clinicopatológicos com maior importância foram: pN2, recidiva local, pN1 e tumor nas margens de excisão, por ordem decrescente de influência.
4. O parâmetro espessura não mostrou possuir em análise univariada significado prognóstico, nem na sobrevivência global nem na ocorrência de recidiva.
5. Os sistemas de gradação considerados (Broders, Anneroth-Batsakis e Bryne), o padrão de invasão e o índice de marcação com Ki-67/MIB1 na frente invasiva tumoral, não provaram neste estudo possuir significado no prognóstico de sobrevivência e no prognóstico de recidiva.
6. A angioinvasão revelou, neste estudo, possuir um elevado significado

prognóstico da sobrevivência global, em análise univariada.

7. A invasão perineural revelou também, neste estudo, possuir um elevado significado prognóstico da sobrevivência global em análise univariada.
8. Porém quer a angioinvasão quer a invasão perineural não demonstraram ter significado no prognóstico de recidiva, em análise univariada.
9. Existe também uma associação estatisticamente muito significativa entre pN e a angioinvasão.
10. Existe uma tendência para que os tumores com maior espessura apresentem angioinvasão e neuroinvasão.
11. Há uma tendência para os casos com gânglios positivos apresentarem valores medianos de espessura superiores (mediana da espessura: N0 - 9,8mm; N1 - 13,5mm; N2 - 13,8mm). Não foi, no entanto, possível demonstrar uma relação significativa entre a espessura e pN.

7. COMENTÁRIO FINAL

PERSPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGAÇÃO

Conjugando a importância prognóstica da invasão linfovascular na sobrevivência global e na metastização ganglionar cervical, não pode deixar de ser sublinhado o interesse no prosseguimento da investigação nesta área. Na verdade a maior parte dos trabalhos incidem apenas sobre o significado prognóstico da metastização cervical (de resto também confirmado neste estudo). Sugere-se um estudo mais alargado, prospectivo multicêntrico, por forma a definir a influência da invasão linfática e vascular na sobrevida e seleccionar eventualmente doentes para quimio-radioterapia adjuvante após tratamento cirúrgico ou ainda para uma eventual terapêutica molecular dirigida.

Finalmente sugere-se que, face aos resultados obtidos neste trabalho, o objectivo de trabalhos futuros incida no estudo da relação da angiogénese e linfangiogénese com a invasão linfovascular e desta com a metastização linfática regional cervical. Sugere-se também que, sendo o padrão de metastização linfática cervical reconhecidamente previsível no cancro oral, indiciando um muito possível processo linfodependente, se aprofunde o estudo de mediadores biológicos bem como de pressões selectivas subjacentes. Sugere-se ainda que, no contexto do estudo dos mecanismos de intravasão, se investigue o papel promotor das células do estroma correspondente à transição epitelial-mesenquimatosa, onde convergem células epiteliais destacadas do tumor, mesênquima, fibroblastos, vasos linfáticos e sanguíneos.

8. BIBLIOGRAFIA

Aboseif S, El-Sakka A, Young P, Cunha G. Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation. *Differentiation* 1999; 65:113-118.

Adamson R, Jones JA, Field JK. Loss of heterozigosity studies on chromosome 17 in head and neck cancer using microsatellite markers. *Oncogene* 1994;9:2077- 82.

Ah-See K, Cooke T, Pickford I, Soutar D, Balmain A. An allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 1994; 54:1617-21.

Ahomadegbe GB, Barrois M, Fogel S, *et al.* High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastasis; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; 10:1217-27.

Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, *et al.* Vascular endotelial growth factor- C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000; 83:887- 91.

Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, *et al.* Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997;79:380-389.

Alvi A, Johnson JT. Extracapsular spread in the clinically negative neck (N0): implications and outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114. 65-70.

American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. New York; John Wiley & Sons, 2003.

Ang KK, Berkey BA, Tu X, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7350-6.

Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res* 1984; 92:448-468 .

Anneroth G, Batsakis JG, Luna M. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma in the floor of mouth related to clinical evaluation. *Scand J Dent Res* 1986;94:347-350.

Anneroth G, Hansen LS, Silverman S Jr. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth : histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol Med* 1986;15:162-168.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res* 1987 ;95:229-249.

Baba Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, *et al.* Inostamycin, an inhibitor of cytidine 5'-diphosphate 1,2-diacyl-sn-glycerol (CDP-PG):Inositol transferase suppresses invasion ability by reducing productions of matrix metalloproteinase-2 and -9 and cell motility in HSC-4 tongue carcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:273-279.

Balch CM, Soong S-J, Gershenwald JE, *et al.* Prognostic factors analysis of 17 600 melanoma patients : validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging. *J Clin Oncol* 2001; 20: 3622-3634.

Ballantyne AJ, Mc Carten AB, Ibanez ML. The extension of cancer of the head and neck through peripheral nerves . *Am J Surg* 1963; 106:651-667.

Bandrés E, Barricarte R, Cantero C, *et al.* Epidermal growth factor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2007; 43: 713-719.

Banerji S, Ni J, Wang S, *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein , is a lymph-specific receptor for hyluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789-901.

Bànkfalvi A, Piffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:291- 298.

Basbaum LR, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:731-738.

Batsakis JG. Tumors of the head and neck, 2nd ed., Baltimore ,Williams & Wilkins, 1979.

Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, *et al.* Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:1315-20.

Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidranski D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res* 1996; 56:2484-87.

Behrens J, Marcel MM, van Roy *et al.* Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989; 108:2435-47.

Bei R, Budillon A, Masuelli L, *et al.* Frequent overexpression of multiple ArB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 2004; 204: 317-325.

Belair CD, Yeager TR, Lopea PM, Reznikoff CA. Telomerase activity : a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl acad Sci USA* 1997; 94: 13677-82.

Berenson J, Yan J, Mickle R. Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1989; 4:1111-16.

Berkowitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Anatomia , Embriologia e Histologia Bucal, 3^a ed. Cap. 14, ARTMED Ed. 2004.

Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:106-113.

Bilde A, von Buchwald C, Therkildsen MH, Mortensen J, Kirkegaard J, Charabi B, Specht I. Need for intensive histopathologic analysis to determine lymph node metastasis when using sentinel node biopsy in oral cancer. *Laryngoscope* 2008; 118:408-414.

Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, *et al.* Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999;5:2810-2819.

Bowden E, Barth M, Thomas D, *et al.* An invasion related complex of cortactin, paxillin and PCK μ associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 1999; 18:4440-49.

Boyle JO, Hakim J, Koch W, *et al.* The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:4477- 80.

Breslow A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Annals of Surgery* 1975; 182(5):572-575.

Broders AC. Carcinoma. Grading and practical application. *Arch Pathol* 1926;2:376- 81.

Brown B, Barnes L, Mazariegos J. Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer* 1989; 64:1195-1202.

Brugal G. Interpretation of proliferation markers, in Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J (eds) : Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Arch* 1995; 27:323-341.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, *et al.* New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18:432-437.

Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, *et al.* Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:369-372.

Bryne M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med* 1991;20:413-420.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol (Lond)* 1992; 166:375-381.

Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 1995; 427-277-281

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication ? *Oral diseases* 1998; 4:70-77.

Buckley JG, Mac Lennan K. Cervical node metastasis in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution. *Head Neck* 2000; 22:380-385.

Budillon A. Molecular genetics of cancer. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer* 1995; 76: 1869-1873.

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumours and correlation with clinical-pathologic features. *Am J Pathol* 1999; 155: 1967-76.

Califano J, van der Riet P, Westra W, *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11):2488-2492.

Callender T, el-Naggar AK, Lee MS. PRAD-1 (CCND) / cyclin D1 gene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994; 74:152-158.

Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, *et al.* Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res* 2008; 28:1197-1206.

Carew JF, Shah JP. Advances in multimodality therapy for laryngeal cancer. *CA Cancer J Clin* 1998; 48:211-28.

Carey TE, Nair TS, Chern C, *et al.* Blood group antigens and integrins as biomarkers in head and neck cancer. Is aberrant tyrosine phosphorylation the cause of altered $\alpha 6\beta 4$ integrin expression? *J Cell Biochem* 1993; 17F (Suppl): 213-222.

Cattoretti G, Becker MHG, Key G, *et al.* Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-363.

Cerezo L, Millan I, Torre A, *et al.* Prognostic factors for survival and tumor control in cervical lymph node metastases from head and neck cancer. A multivariate study of 492 cases. *Cancer* 1992; 69:1224-1234.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1260-70.

Chandu A, Adams G, Smith AC. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(5):514-520.

Charous SJ, Sricklin GP, Nanney LB, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106:271-8.

Chiang CP, Huang JS, Wang JT, *et al.* Expression of p53 protein correlates with decreased survival in patients with areca quid chewing and smoking associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:72-6.

Chow V, Yuen AP, Lam KY, *et al.* A comparative study of the clinico-pathological significance of E-cadherin and catenin (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:59-63.

Christensen D. The Will Rogers phenomenon: roping the effects of a new cancer staging system. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1105-6.

Christiansen JJ, Ayyappan KR. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:(17)8319-26.

Cidadão AJ, Rodrigo FG. Matriz Extracelular *in* Biologia Celular e Molecular , 4ª ed. 2005 ; 77-89, C. Azevedo (Coord.) Ed. LIDEL, Lisboa.

Close LG, Burns DK, Keisch J, Schaeffer S. Microvascular invasion in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113:1191-1195.

Close LG, Brown PM, Vuitch MF, Reisch J, Schaefer SD. Microvascular invasion and survival in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115(11):1304-1309.

Cooper JS, Pajak TF, Foarastiere AA, *et al.* Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med* 2004; 350:1937-1944.

Costea DE. Epithelial-mesenchymal interactions in normal and neoplastic human oral mucosa. Tese, Universidade de Bergen, 2005

Crissman JD, Gluckman J, Witheley J, Quanelle O. Squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck Surg* 1980; 3:2-7.

Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 1984; 54:2995-3001.

Dassonville O, Formento JL, Francoual M, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993 , 11:1973-1978.

de Visscher JG, van den Elsaker K, Grond AJ, *et al.* Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the lower lip: evaluation of long-term results and prognostic factors-a retrospective analysis of 184 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56:814-820.

Denoix PF. *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1944;1:69. 1944;2:82.1950;5:81.1952;7:743.

Departamento de Estudos e Planeamento em Saúde (1997), *Inquérito Nacional de Saúde 1995-1996*, Ministério da Saúde, Lisboa.

Departamento de Estudos e Planeamento em Saúde (1988), *Inquérito Nacional de Saúde 1988*, Ministério da Saúde, Lisboa.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 2001; 29:117-129.

Don DM, Anzai Y, Lufkin RB, Fu Y-S, Calcaterra TC. Evaluation of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1995; 105:669-74.

Edlund M, Sung SY, Chung LW. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *J Cell Biochem* 2004;91:686-705.

El Ghalzbzouri, Ponc M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound repair and regeneration*, 2004; 12:359-367.

Enneroth CM, Hjertman L, Moberger G. Squamous cell carcinomas of the palate. *Acta Otolaryngol* 1972; 73:418-427.

Fagan JJ, Collins B, Barnes L, et al. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124:637-640.

Farmer GE, Bargonetti J, Shu H, et al. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 1992;358:817-822.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.

Feinstein AR, Sosin DM, Wells CK. The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *N Eng J Med* 1985;312:1604-8.

Ferlito A, Partridge M, Brennan J, Hamakawa H. Lymph node micrometastasis in head and neck cancer: a review. *Acta Otolaryngol* 2001; 121:660-665.

Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, *et al.* Prognostic significance of microscopic and macroscopic extracapsular spread from metastatic tumor in the cervical lymph nodes . *Oral Oncol* 2002; 38:747-751.

Firth NA, Reade PC. The prognosis of oral mucosa squamous cell carcinomas: a comparison of clinical and histopathological grading and of laminin and type IV collagen staining. *J Aust Dent* 1996; 83-86.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175:409-416.

Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995: 206-232.

Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis . *New Engl J Med* 1995; 333:1757-1763.

Fonseca I, Pereira T, Rosa Santos J, *et al.* Expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinoma of the border of the tongue: a correlation with histological grade, pattern of stromal invasion and cell differentiation. *J Surg Oncol* 2001; 76(2):155-20.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidranski D. Head and neck cancer – review article, *N Eng J Med* 2001, vol 345- 26 , 1890-1900.

Franchi A, Gallo O, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamouscell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101:973-8.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:362-374.

Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 2004; 48:441-449.

Frierson HF, Cooper PH. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol* 1986; 17:346-354.

Fujimoto R, Kamata N, Yokoyama K, *et al.* Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001; 37:132-140.

Fukami-Kobaiashi J, Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res* 1999; 246(2):338-347.

Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck* 2007; 205-210.

Fukuiwa T, Takebayashi Y, Akiba S, *et al.* Expression of thymidine phosphorylase and vascular endothelial cell growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma and their different characteristics. *Cancer* 1999; 85:960-969.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(12): 1392-1400.

Galer C, Myers J. In *Head and Neck Cancer- a Multidisciplinary Approach*, 3rd. Ed. Lippincott 2008, 876-877.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5:623-8.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;1:13-20.

Giatromanolaki A, Fountzilas G, Koukourakis MI, *et al.* Neo-angiogenesis in locally advanced squamous cell head and neck cancer correlates with thymidine phosphorylase expression and p53 nuclear oncoprotein accumulation. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16:665-672.

Glick AB, Weinberg WC, Wu IH, Quan W, Yuspa SH. Transforming growth factor –beta 1 supresses genomic instability independent of a G1 arrest , p53 and Rb. *Cancer Res* 1996; 56:3645-3650.

Gluckman JL, Stambrook PJ, Pavelic ZP. Prognostic significance of p53 protein accumulation in early stage oral cavity cancer [letter]. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30:281.

Goepfert H. Squamous cell carcinoma of the head and neck: past progress and future promise. *CA Cancer J Clin* 1998; 48(4): 195-198.

González-Moles MA, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, *et al.* p16 expression in squamous cell carcinomas of the tongue. *Onkologie* 2002;25:433-436.

González-Moles MA, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, González-Moles S. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncology* 2002; 38:394-397.

González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Ávila I, *et al.* Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncology* 2004; 40:281-286.

Gotte K, Tremmel SC, Popp S, *et al.* Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 38-48.

Grabenbauer GG, Muhlriedel C, Rodel F, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oropharynx : ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2000; 48:1041-1050.

Grandi C, Alloisio M, Moglia D, *et al.* Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas : therapeutic implications. *Head Neck Surg* 1985; 8:67-73.

Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, *et al.* Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:824-832.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy . *Pharmacol Ther* 2004; 102:37-46.

Gregoire M, Lieubeau B. The role of fibroblasts in tumor behaviour. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14:339-350.

Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells . *J Cell Biol* 1982; 95:333-339.

Grøn B, Stoltze K, Andersson A, dabelsteen E. Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratynocytes. *APMIS* 2002; 110:892-898.

Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:657-665.

Grüttgen A, Reichenzeller M, Jünger *et al.* Detailed gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers. *J Pathol* 2001; 194:311-317.

Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-468.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Handley WS. Dissemination of mammary carcinoma. *Brit Med J* 1905; 1:663-664.

Harada T, Shinohara M, Nakamura S, Oka M. An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Arch (A)*1994; 424:257-266.

Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005; 233:706-720.

Helweg-Larsen K, Graem N, Meintrup-Larsen K-J, Meintrup-Larsen U. Clinical relevance of histological grading of cancer of the larynx. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1978; 86:499-504.

Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 1997; 177:1-56.

Hill RP. Metastasis. In: Tannoc IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology*. New York : Pergamon Press, 1987:160.

Hirota J, Yoneda K, Osaki T. Basement membrane type IV collagen in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1990; 12:400-405.

Hoegy S, Ob H-R, Corcoran M, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) supresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 2001; 276: 3203-3214.

Hofmann K, Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:347-349.

Högmo A, Kuylenstierna R, Lindholm J, *et al*. Predictive value of malignancy gradind systems, DNA content , p53, and angiogenesis for stage I tongue carcinomas. *J Clin Pahol* 1999; 52:35-40.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis : dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18:5536-62.

Holm LE, Lundquist PG, Silfverswärd G, Sobin A. Histological grading of malignancy in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Acta Otolaryngol* 1982; 94:185-192.

Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. DÖSAK. *J Craniomaxillofac Surg* 1999; 27(5): 275-288.

Howeedy AA, Virtanen I, Laitinen L, Gould NS, Koukoulis GK, Gould VE. Differential obstruction of tenascin in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Lab Invest* 1990; 63:798-806.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial – mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:548-558.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 85. Betel- quid and Areca-nut Chewing and some Areca-nut-derived Nitrosamines, 2004.

Igarashi M, Irwin CR, Locke M, Mackenzie IC. Construction of large organotypical cultures of oral mucosa and skin. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(7):422-430.

Izzo J, Papadimitrakopoulou V, Li X, *et al.* Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis : in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 1998; 17:2313-22.

Jakobsson PA. Glottic carcinoma of the larynx. Factors influencing prognosis following radiotherapy. Stockholm Karolinska Institute (Tese), Uppsala, Printlab AB, 1973.

Jakobsson PA. Histologic grading of malignancy and prognosis in glottic carcinoma of the larynx. Workshop No. 14. In: Alberti PW, Bryce DP, eds. Centennial Conference on Laryngeal Cancer. New York : Appleton-Century –Crofts,847-852, 1976.

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun N. Cancer statistics, *C A Cancer J Clin* . 2002; 52:23-47.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, *et al.* Cancer statistics. *C A Cancer J Clin* . 2004; 54 :8-29.

Jiang D-J, Wilson DF, Wiebkin OW. Ultrastructural features of normal epithelium and 4-nitroquinolein-1-oxide (4NQO) induced carcinomas of the rat tongue. *J Comp Pathol* 1993; 108:375-381.

Jones K, Lodge-Rigal D, Reddick R. Prognostic factors in the recurrence of stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity . *Arch Otolaryngol. Head and Neck Surg* 1992; 118:483-485.

Jones HB, Sykes A, Bayman N, Sloan P, *et al.* The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncology* 2009; 45:10-15.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al.* A novel vascular endothelial growth factor , VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15:290-298.

Joukov V, Sorsa T, Kumar V *et al.* Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16:3898-11.

Juarez J, Clayman G, Nakajima M, *et al.* Role and regulation of expression of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous- cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 1993;55:10-18.

Kademani D. Oral cancer . *Mayo Clin Proc* 2007; 82:878-887.

Kadish JL, Butterfield LF, Folkman J. The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tissue Cell* 1979; 11:99-108.

Kainulainen T. Epithelial adhesion molecules and matrix metalloproteinases in oral precancers and squamous cell carcinoma. Tese, 1998, *Acta Univ. Oul.* Universidade de Oulu, Finlândia.

Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, *et al.* Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg* 1977;134-450 .

Kannan S, Balaram P, Chandran GJ, Pillai MR, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK. Alterations in expression of basement membrane proteins during tumour progression in oral mucosa. *Histopathology* 1994; 24:531-537.

Kantak SS, Kramer RH. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273:16953-16961.

Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW *et al.* Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985;82:1810-14.

Koster MI, Kim S, Mills AA. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev* 2004; 18: 126-131.

Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, *et al.* Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* 2000; 22:207-14.

Kowalski LP, Carvalho AL. General tumor factors, in *Prognosis in head and neck cancer* 2006;ed. De Jong RGB, Taylor & Francis, London.

Kramer RH, Bensch KG, Wong J. Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res* 1986; 46: 1980-1989.

Kropveld A, Rosemuller EH, Leppers FGJ *et al.* Sequencing analysis of RNA and DNA exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell carcinomas. *Lab Invest* 1999; 79:347-55.

Kukk E, Lymboussaki A, Tair S, *et al.* VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development (Camb.)* 1996; 122:3829-37.

Kumagai S, Kojima S, Imai K, Nakagawa K, *et al.* Immunohistologic distribution of basement membrane in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1994; 16:51-57.

Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(2): 114-120.

Kurokawa H. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34:329-333.

Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study . *Am J Clin Pathol* 1993;99:18-23.

Kusukawa J , Sasaguri Y, Morimatsu M, *et al.* Expression of matrix-metalloproteinase – 3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53:530- 4.

Kusukawa J, Harada H, Shima I, *et al.* The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer* (Part B), Oral Oncol 1996; 32B: 217-221.

Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-177.

Lane DP. p53 , guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.

Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P, *et al.* Increased β -actin expression in an invasive Moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* 1998 ; 58 :1631-5.

Le Tourneau C, Velten M, Jung GM, *et al.* Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas : analysis of a series of 621 cases. *Head Neck* 2005 ;27 :801-808.

Lee J, Gray A, Yuan J, *et al.* Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1988-92.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. *J Cell Biol* 2006; 172:973-981.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, *et al.* Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastasis in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993; 71:452-456.

Lever WF, Schaumburg-Lever G. Tumors and cysts of the epidermis. In: *Histopathology of the skin*, 7th ed. Philadelphia; JB Lippincott, 1990:523-577.

Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, *et al.* Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Nat Cancer Inst* 1999; 92:143-147.

Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M. telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol* 2000; 36: 347-352.

Lindberg R. distribution of cervical lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972; 29:1446-1449.

Lingen MW. Angiogenesis in the development of head and neck cancer and its inhibition by chemopreventive agents. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999 ; 10: 153-164.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, *et al.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284:67-68.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis : an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991 ; 64 :327-336.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001,411 :375-379.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, *et al.* Beta and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinoma . *Anticancer Res* 1999; 19:3817-26.

Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of « positive » margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg* 1978 ; 1 :107-111.

Lorenz M, Yamaguchi H, Wang T, Singer RH, Condeelis J. Imaging sites of N-wasp activity in lamelliopodia and invadopodia of carcinoma cell. *Curr Biol* 2004 ; 14 : 697-703.

Lucas . Pathology of tumors of oral tissues. 5th edition 1998, Churchill Livingstone , pg. 234.

Lund G, Sögaard H, Elbrönd O, *et al.* Epidermoid carcinoma of the tongue. Histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1975 ; 14 :513-521.

Lydiatt DD, Robbins KT, Byers RM, *et al.* Treatment of stage I and II oral tongue cancer. *Head Neck* 1993 ; 15 :308-312.

Maas–Szabowski N, Szabowski A, Stark H-J, Andrecht S, *et al.* Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 2001 ; 116 :816-820.

MacDougall JR, Matrisian LM. Contribution of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1995 ; 14 :351-362.

Maddox WA. Vicissitudes of head and neck cancer. *Am J Surg* 1984 ; 148 :428-432.

Maddox WA, Urist MM. Histopathological prognostic factors of certain primary oral cavity cancers. *Oncology (Huntingt)* 1990 ; 4 :39-42.

Maiorano E, Favia G, Maisonneuve P, Viale G. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol* 1998; 185:167-174.

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, *et al.* Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1994; 168:494-8.

Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer cell* . 2004; 5 :311-16.

Marks JE, Breauz S, Smith PG, *et al.* The need for elective irradiation of occult lymphatic metastasis from cancers of the larynx and pyriform sinus. *Head Neck* 1985; 8:3-8.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, *et al.* Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166: 913-921.

Martinez-Gimeno C Rodriguez EM, Vila CN, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis . *Laryngoscope* 1995; 105:725-733.

Matrisian LM, Sledge Jr GW, Mohla S. Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res* 2003; 63:6105-6109.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, *et al.* E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993; 55:580-5.

Maula SM, Luukkaa M, Grenman RF, *et al.* Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003; 63:1920-26.

Mc Cawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression : defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol* 2001; 11: R25-R27.

Mc Clure CFW. The endothelial problem. *Anat Rec* 1921; 22:219-237.

Mc Mormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigens. *Histopathology* 1992; 6:591-594.

Michalides R, van Veelan N, Hart A, *et al.* Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty- seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55:975-978.

Mineta H, Miura K, Ogino T, *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83: 775-781.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 6:2228-2234.

Mohit-Tabatabai MA ,Sobel MJ, Rush BF .Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis.*Am J Surg* 1986; 152-351-353.

Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer* 1986; 58(1):158-162.

Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, *et al.* Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 369-374.

Motokura T, Bloom T, Kim HG. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512-515.

Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:839-49.

Muller D, Breathnach R, Engelmann A, *et al.* Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung and head and neck tumours. *Int J Cancer* 1991; 48: 550-6.

Muñoz-Guerra MF, Marazuela E, Martín-Villar E, *et al.* Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2004; 100:553-560.

Muñoz-Guerra MF, Capote Moreno AL, Marazuela EM, Amat CG. Estadios precoces de cancer oral: pronóstico, linfangiogénesis intratumoral y expresión de factor de crecimiento endotelial vascular Tipo-C (VEGF-C). *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2006; 28,1, 25-40.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adult: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:44-51.

Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, Chen WT. Transmembrane/Cytoplasmatic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7959-7964.

Nakayama S, Sasaki A, Mese H, et al. Establishment of high and low metastasis cell lines derived from a human tongue squamous cell carcinoma. *Invasion Metastasis* 1999; 18:219-228.

Ten Cate R. Oral Histology , 5th edition 1998, Mosby Inc ; 350-385.

Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, et al. Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis. *Laryngoscope* 1999; 109:1253.

Nawroz H, van der Riet P, Hruban R, et al. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:1152-55.

Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* 1998; 273: 5400-5404.

Nicolson GL. Tumor cell instability , diversification and progression to the metastatic phenotype : from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res* 1987;47:1473-1487.

Niki T, Iba S, Tokunou M, et al. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C and D and their relationship to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6:2431-9.

Noone RB, Booner H Jr, Raymond S, *et al.* Lymph node metastasis in oral cancer: A correlation of histopathology with survival. *Plast Reconstr Surg* 1974; 53:158.

Nordemar S, Kronenwett U, Auer G, *et al.* Laminin-5 as a predictor of invasiveness in cancer in situ lesions of the larynx. *Anticancer Res* 2001; 21 (1B):509-512.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-28.

O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ, *et al.* Neck dissection with and without radiotherapy : prognostic factors, patterns of recurrence and survival. *Am J Surg* 1986 ;152 :456-63.

O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S *et al.* Tumour thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer – but what thickness ? *Head Neck*. 2003; 937-944.

O-charoenrat P, Pilai G, Patel S, Ficher C *et al.* Tumor thickness predicts cervical nodal metastasis and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2003; 39:386-390.

Odell EW, Jani P, Sherriff M, *et al.* The prognostic value of individual histological grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. *Cancer* 1994;74:789-794.

Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor –c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:804-813.

Okazaki M, Yoshimura K, Uchida G, Harii K. Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2002; 30(2):108-115.

Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:71-76.

Ono Y, Nakanishi Y, Ino Y, *et al.* Clinicopathologic significance of laminin- 5 gamma 2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. *Cancer* 1999; 85(11):2315-2321.

Ortega F, González-Moles MA, Ruiz Avila I. Gradación histopatológica de la malignidad y pronóstico del cancer de cabeza y cuello. *Medicina Oral* 1998; 3:148-162.

Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, *et al.* Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883-6.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-841 .

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 52:326-341.

Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, *et al.* An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 39:137-148.

Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, *et al.* A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. *Cancer Res* 2000;60:3893-8.

Pich A, Chiusa , Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumours, *Annals of Oncolog* 2004; 15:1319-29.

Piccirillo JF, Huff CM, Pugliano FA. Evaluation, classification and staging *in* Cancer of the head and neck, 49-66, 4th. ed. Saunders, 2003.

Pickett KL, Harber GJ, De Carlo AA, *et al.* 92K-GL (MMP-9) and 72K-GL (MMP-2) are produced in vivo by human oral squamous cell carcinomas and can enhance FIB-CL (MMP-1) activity in vitro. *Dent Res* 1999; 78:1354-61.

Piffkó J , Bãnkfalvi A, Öfner D, Bryne M, *et al.* Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral SCC. *Br J Cancer* 1997; 75(10):1534-6.

Piffkó J, Bãnkfalvi A, Tory K, *et al.* Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck* 1998;20:8-15.

Pignon JP, Bourhis J, Domengue C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma : three meta-analysis of chemotherapy on head and neck cancer. *Lancet* 2000; 355:949-55.

Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995; 6:63-72.

Pinheiro JJV, Freitas VM, Moretti AIS, *et al.* Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity . *Histopathology* 2004; 45(1): 65-72.

Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Miranda AC, Limbert E Cancer in Portugal. IARC Technical Publication nº 38, Lyon , 2002.

Pitman KT, Johnson JT. Skin metastasis from head and neck squamous cell carcinoma: incidence and impact. *Head Neck* 1999; 21:560-565.

Plaat B, Kole A, Mastik M, Hoekstra H, Molenaar W, Vaalburg W. Protein synthesis rate measured with L-[1-¹¹C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas. *Eur J Nucl Med* 1999; 26:328-332.

Platz H, Fries R, Hudec M. Prognosis of oral cavity carcinomas: results of a multicentric retrospective observational study. Carl Hanser Verlag 1986;48-49.

Polette M, Clavel C, Muller D, *et al.* Detection of mRNAs encoding collagenase I and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization. *Invasion Metastasis* 1991; 11:76-83.

Prevo R, Banerji S, Ferguson D, *et al.* Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan. *J Biol Chem* 2001; 276:19420-19430.

Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination . *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32:175-253.

R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna , Austria. ISBN 3-900051-07-0.
URL <http://R-project.org>

Rasgon B, Cruz R, Hilsinger R. Relation of lymph node metastasis to histopathologic appearance in oral cavity and oropharyngeal carcinoma : a case series and literature review . *Laryngoscope* 1989; 99:1103-1110.

Renan MJ . How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.

Resnick JM, Uhlman D, Niehans GA, *et al.* Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma : prognostic factors. *Ann Otol Rhynol Laryngol* 1995; 104:685-694.

Riedel F, Gotte K, Schwalb J, *et al.* Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 17:1099-1105.

Richard JM, Sancho-Gamier H, Micheau C, *et al.* Prognostic factors in cervical lymph node metastasis in upper respiratory and digestive tract carcinomas: Study of 1 713 cases during a 15-year period. *Laryngoscope* 1987; 97:97.

Roberts AB, Wakefield L. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; 100:8621-23.

Rollo J, Rozenbom CV, Thawley S, *et al.* Squamous cell carcinoma of the base of the tongue: a clinicopathologic study of 81 cases. *Cancer* 1981;47:333.

Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:87-96.

Sahai E, Garcia-Medina R, Pouyssegur J, Vial L. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* 2007; 176(1):35-42.

Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 1992; 7:927-33.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor – related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232.

Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:645-662.

Sasaki K, Murakami T, Masahiro K, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; 33:579-584.

Satthaporn S, Eremin O. Dendritic cells (II): Role and therapeutic implications in cancer. *J R Coll Surg Edinb* 2001; 46:159-167.

Sawair FA. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32:1-9.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, *et al.* Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166:913-921.

Schipper JH, Unger A, Jahnke K. E-cadherin as a functional marker of the differentiation and invasiveness of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1994; 19:381- 4.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 233-245.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, *et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67 : a very large ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123:513-522.

Schmid-Sconbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990; 70:987-1028.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein : from the known to the unknown. *J Cellular Physiol* 2000 ; 182:3, 311-322.

Schuller DE, Gecula JC, Agrawal A, *et al.* Multimodal intensification therapy for previously untreated advanced resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx or hypopharynx. *Cancer* 2002; 94:3169-78.

Senger DR, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion Metastasis* 1994-92; 14:385-394.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.

Shah JP, Patel S. Cervical lymph nodes *in* Head and Neck Surgery and Oncology. 2003 Mosby 3rd. edition, New York .

Shen X, Kramer RH. Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *AJP* 2004; 165: 1315-1329.

Shin DM, Ro JY, Hong WK, *et al.* Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994 ; 54 :3153-3159.

Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, *et al.* p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer. Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:603-609.

Shintani S, Rafael A, Yoshihama Y, *et al.* Immunohistochemical detection of microvessels in oral squamous cell carcinoma. *Japanese Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 1994; 40:645-650.

Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, *et al.* Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996 ; 122: 865-868.

Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:807-819.

Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, *et al.* VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61:103-108.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncology* 1999; 35:583-589.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8.

Smith BD, Smith GL, Carter D, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2046-52.

Snow GB, Annyas AA, Van Slooten EA . Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol* 1982; 185.

Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ. *et al.* Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 1986;96:1145-1148.

Sorrells DI, Ghali GE, Meschonat C, *et al.* Competitive PCR to detect eIF4E gene amplification in head neck cancer. *Head Neck* 1999; 21:60-65.

Sorrells DI, Meschonat C, Black D, *et al.* Pattern of amplification and overexpression of the eukaryotic initiation factor 4E gene in solid tumor. *J Surg Res* 1999; 85:37.

Sparano A, Weinstein G, Chalian A, *et al.* Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:472-476.

Spiro RH, Alfonso AE, Farr HW, *et al.* Cervical lymph node metastasis from epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx: A critical assessment of current staging. *Am J Surg* 1974; 28:562.

Spiro R, Huvos A, Wong G. Predictive value of tumour thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and the floor of the mouth. *Am J Surg* 1986; 152:345-350.

Spiro RH, Guillaumondegui Jr O, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head & Neck* 1998; August, 408-413.

Srivastava A, *et al.* Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-9.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, *et al.* The stromal proteinase MMP-3/stromelysin -1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98:137-146.

Stoll C, Baretton G, Lohrs U. The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1998;433:427.

Stoltzfus P, Högmo A, Lindholm J, *et al.* The gamma 2 chain of laminin-5 as an indicator of increased risk for recurrence in T1 stage tongue cancer. *Anticancer Res* 2004 ; 24(5B) : 3109-3114.

Stoof TJ, Boorsman DM, Nickkolloff BJ. Keratinocytes and immunological cytokines. In : Leigh IM, Lane EB, Watt FM, eds. *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge : Cambridge University Press 1994 ; 365-399.

Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 e -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 e-3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1998; 12:2239-45.

Swan EA, Jasser SA, Holsinger FC, Doan D, Bucana C, Myers JN. Acquisition of anoikis resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2003; 39:648-655.

Tabor MA, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, *et al.* Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002; 161:1051-1060.

Teichgraber JF, Clairmont AA. The incidence of occult metastasis for cancer of the oral tongue and floor of the mouth : treatment rationale. *Head Neck* 1984;7:15-21.

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, *et al.* Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 16:2164-2170.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:442-454.

Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 2000; 150:15-21.

Tremain R, Marko M, Kinnimulki V, *et al.* Defects in TGF- β signalling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras . *Oncogene* 2000; 19:1698-1709.

Tryggvason K, Höyhty M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987; 907:191-217.

Tsuji T, Mimura Y, Wen S, *et al.* The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors . *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;24:221-5.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J *et al.* The t(14-18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229:1390-3.

Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis . *Br J Cancer* 1999; 80:309-313.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma . *J Oral Pathol Med* 2002; 31(10):598-604.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(4):204-208.

Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 1987; 154:411-414.

Vaccariello M, Javaherian A, Wang Y *et al.* Cell interactions control the fate of malignant keratinocytes in an organotypic model of early neoplasia. *J Invest Dermatol* 1999; 113:384-391.

Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, *et al.* Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994; 54: 1156-8.

Van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51: 716-724.

Van Dyke DL, Worsham MJ, Benninger MS, *et al.* Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 9:192-206.

Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001; 75(9):4467-4472.

Vikram B, Strong EW, Shah JP, *et al.* Failure at distant sites following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* 1984; 6(3):730-733.

Wahi PN. Histological typing of oral and oropharyngeal tumors. WHO, Genebra, 1972.

Wangsa D, Ryott M, Åvall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J, Ried T, Auer G, Munck-Wikland E. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *British Journal of Cancer* 2008; 99:1121-1128.

Weber F, Fukino K, Sawada T, *et al.* Variability in organ-specific EGFR mutational spectra in tumour epithelium and stroma may be biological basis for differential responses to tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2005; 92:1922-26.

Weber F, Xu Y, Zhang Li, *et al.* Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA* 2007; 297:187-195.

Weinberg R. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 758:331-338.

Weiss L. The pathobiology of metastasis within the lymphatic system. *Surg Oncol Clin N Am* 1996; 5:15-24.

Welkoborsky H-J, Hinni M, Dienes H-P *et al.* Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:503-10.

Welkoborsky HJ, Gluckman JL, Jacob R, *et al.* Tumor biologic prognostic parameters in T1N0M0 squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngorhinootologie* 1999; 78:131-138.

Williams JK, Carlson GW, Cohen C, *et al.* Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 1994; 168:373-380.

Wernert N. The multiple roles of tumor stroma. *Virchows Arch* 1997; 430:433-443.

Wicki A, Lehembre F, Wick N, *et al.* Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006; 9:261-272.

Wilson DF, De-Jun J, Leong AS-Y, Wiebkin OW. Laminin and type IV collagen in experimental rat oral carcinomas. *J Comp Pathol* 1993; 108:369-374.

Wilting J, Neeff H, Christ B. Embryonic lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 1999; 297:1-11.

Woessner Jr JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York :Oxford University; 2000.

Wolf GT, Carey TR. Tumor antigen phenotype , biologic staining and prognosis in head and neck squamous carcinoma. *J Natl Cancer Inst Monograph* 1992; 13:67-74.

Wong SY, Purdie AT, Han P. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. *Am J Pathol* 1992; 140:1473-1482.

Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995; 17:463-472.

Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, *et al.* Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Col Surg Eng* 1995; 77:325-331.

Woolgar JA. Carcinoma of the tongue: pathological considerations in management of the neck. *J R Soc Med* 1996; 89:611-615.

Woolgar JA, Rogers S, West CR, *et al.* Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999; 35:257-265.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42:229-239.

Wu H, Lotan R, Menter D, *et al.* Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinoma . *Anticancer Res* 2000; 20:1385-90.

Wu AW *et al.* COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;15:2323-6.

Wurman LH, Adams GL, Meyerhoff WL. Carcinoma of the lip. *Am J Surg* 1985; 130:470-474.

Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H *et al.* Mode of invasion, bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1983; 51:2175-2180.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale N, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors in blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-248.

Yang H, Kyo S, Takatura M, Sun L. Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12:119-127.

Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, *et al.* Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol* 1998;19:83-88.

Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, *et al.* Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer . *Clin Cancer Res* 1999; 5:1823-29.

Zheng ZH, Sun XJ, Zhou HT, *et al.* Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2000-3.

Ziober BL, Silverman SS, Kramer RH. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(6):499-510.

Zöller M, Goodman ML, Cummings CW. Guidelines for prognosis in head and neck cancer with nodal metastasis. *Laryngoscope* 1978; 88:135-140.

