

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

KELLY BIENK DIAS

AVALIAÇÃO DAS MIOSINAS II NÃO MUSCULARES EM DIFERENTES
ZONAS NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E
SUA RELAÇÃO COM GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA, TNM E EVOLUÇÃO

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Kelly Bienk

Avaliação das miosinas II não musculares em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com graduação histológica, TNM e evolução / Kelly Bienk Dias. -- 2015.

42 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

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

1. Neoplasia Maligna Bucal. 2. Migração Celular.
3. Miosina II não Muscular. I. Sant'Ana Filho, Manoel, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ainda mais difícil do que a própria pesquisa, e todas as etapas que me fizeram chegar ao presente momento, são os agradecimentos. Não pela falta de gratidão às pessoas que foram elementares nesta etapa de vida, mas sim, por medo de não fazer jus, com estas palavras, à importância delas nesta trajetória.

Primeiramente agradeço a Deus e ao meu Anjo da Guarda por estarem sempre ao meu lado, nos momentos mais tensos e difíceis. Sou grata pela vida e pelo privilégio de viver cada dia, com saúde e capacidade de correr atrás dos meus ideais.

Aos meus pais, Ângela e João Carlos, agradeço pelo apoio incondicional, vocês são a minha fortaleza. Amo vocês demais!

Mãe, obrigada pela dedicação, amizade e companheirismo. Mesmo nos períodos mais difíceis estive ao meu lado, acreditando no meu sucesso.

Pai, obrigada pelos exemplos de vida e caráter. Você me apresentou para a Odontologia e me mostrou o amor pela profissão, compartilhando ensinamentos e experiências.

Às amigas mais queridas e “corujas” que alguém poderia ter: Valmiria, Letícia A., Natalya, Letícia R., Gabriela e Tanise. Minha eterna gratidão por acreditarem na minha competência em todos os momentos, e me darem aquelas injeções de ânimo sempre que fraquejei. Vocês foram e sempre serão a minha luz no fim do túnel.

Especialmente à Letícia A. e Valmiria por serem minhas confidentes e me darem apoio em todos os momentos. O que seria de mim sem vocês? Amo vocês.

Às professoras queridas, responsáveis pela minha primeira formação em Cirurgia, que compartilharam comigo todo o seu conhecimento e muito acreditaram na minha pessoa, Taís Weber Furlanetto de Azambuja e Francesca Bercini. O conhecimento adquirido através do carinho e dedicação de vocês para me ensinar, fez abrir muitas portas no início da minha história profissional.

Ao professor e agora “chefe” Sérgio Schiefferdecker que me recebeu no Hospital Ernesto Dornelles durante a especialização em C.T.B.M.F e não exitou em abrir as portas de sua própria casa para me receber junto à família. Muito obrigada por compartilhar de toda sua experiência e principalmente pelo incentivo para que eu ingressasse no curso de Mestrado.

Ao professor Jorge Omar Lopes da Silveira por oportunizar minha presença na Odontopós como professora. Acreditar em mim como pessoa capacitada é o motivo que me fez realizar o curso de Mestrado.

À Odontopós e, principalmente aos alunos que, por serem merecedores de professores qualificados, me estimulam à procura de conhecimento.

À UFRGS por me proporcionar um ensino de qualidade com os melhores professores que eu poderia ter tido, motivo pelo qual me fez voltar. Foi uma satisfação

reencontrar a professora Anna Fossati e o professor Manoel Sant'Ana Filho, que foram meus professores de graduação.

À “Grande Família Patológica” que me recebeu de braços abertos no início dessa caminhada. Especialmente aos colegas, sem exceção, que me acolheram e fizeram com que eu me sentisse em casa, sendo que sempre pude contar com o apoio de todos eles: Anacláudia, Thaíse, Grasi, Bruna, Viviane, Alessandra, Vivian, Artur, Alessandro, Felipe, Carlos, Frã, Liana, Isadora, Marina, Natalia K, Natália D., Luciano, Rúbia e Taiane. Vocês são especiais!!!

Aos parceiros de rotina Alessandro e Felipe, obrigada pela paciência! Sem vocês jamais seria capaz de identificar, entre os “borrões”, roxo e rosa de hematoxilina e eosina, o mundo celular ao qual aprendi a gostar.

O fato mais inesperado e mais satisfatório de toda esta trajetória foi uma coisa que jamais substituirá título algum, pois nada vale mais do que uma amizade verdadeira. Anacláudia, a vida me deu a oportunidade deste encontro! E agradeço a Deus todos os dias por ter você na minha vida. Obrigada pelo apoio, pelo carinho, por me estender à mão sempre que precisei. Tua presença foi imprescindível para esta conquista. Amo você amiga!

À Chris Alessandra e Pedro pelo empenho em realizar a parte laboratorial da minha pesquisa.

Aos professores, Laura, Márcia, Ana, Vinícius, Marcelo, Lisi, Manoela, Marco e Fernanda, agradeço por estarem sempre dispostos a colaborar em tudo aquilo que foi possível na minha formação.

Ao meu professor orientador Manoel Sant'Ana Filho, que serei eternamente grata pela paciência e pelo convívio, sendo que cada minuto foi essencial e, eu não poderia quantificar o aprendizado que obtive nestes dois anos. Tenho muito orgulho de ter tido o privilégio de ser orientada por você.

À professora Laura de Campos Hildebrand pelo apoio e parceria no meu projeto de pesquisa.

À professora Márcia Gaiger de Oliveira que sempre se dispôs, em todos os momentos, a me ajudar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a CAPES, por apoiarem e financiarem meu curso de pós-graduação e o presente projeto.

RESUMO

DIAS, Kelly. **Avaliação das miosinas II não musculares em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com graduação histológica, TNM e evolução.** 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é uma neoplasia maligna de prognóstico desfavorável e baixa taxa de sobrevivência. Entender os processos biológicos envolvidos na carcinogênese poderá ser de extrema importância para o desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento e melhora do prognóstico em pacientes acometidos pela doença. A maior causa de insucessos clínicos em termos de terapia e prognóstico em pacientes com câncer é a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático. A migração celular é indispensável para a progressão tumoral e as células apresentam motores moleculares desempenhados especialmente pela família da Miosina II não muscular (MNMI). Codificadas por diferentes genes, existem três isoformas conhecidas em células de mamíferos (MNMIIA, MNMIIB, MNMIIC). As MNMIIs estão envolvidas em funções celulares como migração, adesão e citocinese. Sendo o entendimento da migração, adesão celular e citocinese fatores chave na progressão tumoral, e que a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático são essenciais na definição do prognóstico dos pacientes, o objetivo deste estudo foi descrever o perfil e exposição à fatores de risco como álcool e fumo dos pacientes diagnosticados com CEC de cabeça e pescoço, graduação histológica, parâmetros clínicos tumorais (TNM), padrão de expressão das isoformas de MNMI (MNMIIA, MNMIIB, MNMIIC) no centro do tumor, zona de invasão e tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor, relacionando a expressão e localização dessas proteínas com os dados descritos bem como evolução dos pacientes após 5 anos de acompanhamento. De acordo com os resultados sugere-se que a MNMIIB expressa no EA possa indicar o potencial de metástase regional do CEC e a MNMIIC presente na zona de invasão tumoral (ZI) seja um fator predictor de prognóstico ruim da doença. Sendo assim, é possível propor que a

avaliação de imunorreatividade da MNMIIB no EA e MNMIIC na ZI seja utilizada na análise das peças operatórias, como complemento à análise morfológica de rotina.

Palavras-Chave: Neoplasia Maligna Bucal. Migração Celular. Miosina II Não Muscular

ABSTRACT

DIAS, Kelly. **Evaluation of Nonmuscle Myosin II in different areas in oral squamous cell carcinoma and its relationship with histological grading, TNM and evolution.** 2015 42 f. Dissertation (Masters`s Degree) – Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck is a malignant neoplasm of poor prognosis and low survival rate. Understand the biological processes involved in carcinogenesis can be extremely important for the development of new treatment technologies and improved prognosis in patients affected by the disease. The major cause of clinical failure in terms of therapy and prognosis in cancer patients is the development of tissue invasion and metastatic potential. Cell migration is essential for tumor progression and the cells have molecular motors especially formed from non-muscular myosin II family (NMMII). Encoded by different genes, there are three known isoforms in mammalian cells (NMMIIA, NMMIIB, NMMIIC). The NMMIIs are involved in cellular functions such as migration, adhesion, and cytokinesis. As the understanding of migration, cell adhesion and cytokinesis key factors in tumor progression, and that the tissue invasion and metastatic potential for development are essential in defining the prognosis of patients, the objective of this study was to describe the profile and exposure to risk factors such as alcohol and tobacco of patients diagnosed with head and neck SCC, histological grading, tumor clinical parameters (TNM), pattern of expression of isoforms NMMII (NMMIIA, NMMIIB, NMMIIC) in the center of the tumor (CT), tumor invasion zone area and not neoplastic adjacent to the tumor (AE), relating the expression and localization of these proteins with the data described and outcome of patients after 5 years of follow-up. According to the results it is suggested that the NMMIIB expressed in AE may indicate the potential regional metastasis of SCC and NMMIIC present in the tumor invasion zone (IZ) is a predictor factor of poor prognosis of the disease. Therefore, it is possible to propose that immunoreactivity assessment of NMMIIB in EA and NMMIIC in IZ could be used in the analysis of operative parts, as a complement to routine morphological analysis.

Key-words: Malignant Mouth Neoplasms, Cell Migration, Nonmuscle Myosin II

SUMÁRIO

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	08
1. Carcinoma Espinocelular.....	08
2. Carcinogênese.....	08
3. Graduação Histológica e Parâmetros Clínicos Tumorais.....	09
4. Sobrevida e Carcinoma Espinocelular.....	10
5. Migração, Adesão e Citocinese Celular.....	10
6. Miosinas II Não Musculares e Câncer.....	12
Referências Bibliográficas.....	15
OBJETIVOS.....	16
ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
Referências Bibliográficas.....	42

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1. Carcinoma Espinocelular

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda causa de morte mais frequente nos países desenvolvidos e há uma tendência de que esse dado venha a se repetir também nos países em desenvolvimento. As mortes por câncer no mundo estão previstas para continuar crescendo, significando uma estimativa de 13,1 milhões de mortes pela doença até o ano de 2030(1).

O carcinoma espinocelular (2) é a décima neoplasia maligna mais prevalente em homens no mundo (3) e representa aproximadamente 95% dos cânceres diagnosticados em boca (4). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou a ocorrência de 25.570 novos casos em 2014, sendo a quinta neoplasia mais incidente em homens (5). Diversos estudos relatam incidência maior de homens acometidos pelo CEC de cabeça e pescoço frente às mulheres (6-8). A Globocan estima a ocorrência de novos casos de CEC de cabeça e pescoço no Brasil ao final do ano de 2015 em média duas vezes maior para homens com idade inferior a 65 anos comparado às mulheres(1).

As características epidemiológicas dos pacientes acometidos pelo CEC de cabeça e pescoço vêm sendo modificadas de acordo com o passar dos anos, uma vez que tradicionalmente 80-90% desses CECs eram relacionados à exposição ao álcool e fumo e, atualmente, tem-se observado um decréscimo na taxa de pacientes expostos (9). Essa diminuição pode ser atribuída às novas condutas de saúde pública que visam, além da prevenção do CEC, outras doenças relacionadas (6).

2. Carcinogênese

A população celular do CEC é heterogênea e há a presença de células mais agressivas, ou altamente tumorigênicas, responsáveis pela formação, invasão de tecidos adjacentes e ocorrência de metástases regionais e à distância (10-12). As células neoplásicas que apresentam estas características representam uma pequena subpopulação dentro do total de células de um

tumor, que, para invadir o tecido conjuntivo adjacente, necessitam alterar o seu perfil molecular. Os mecanismos biológicos que regulam este fenômeno permanecem não completamente compreendidos (11, 12), embora já existam evidências sugerindo que as mesmas vias críticas para o desenvolvimento fisiológico podem desempenhar um papel importante na tumorigênese, em seus estágios iniciais (13). A quebra da homeostase das células epiteliais levando ao desenvolvimento das condições malignas está correlacionada com a perda da característica celular e aquisição de fenótipo migratório, fenômeno conhecido como transição epitélio-mesenquimal(14).

De acordo com a evolução da doença, os tumores apresentam aspectos comportamentais distintos. A progressão do tumor se evidencia com uma sequência de traços ou fenótipos que as células precisam adquirir, sendo eles: 1- potencial ilimitado de proliferação; 2- independência ambiental para crescimento; 3- resistência à apoptose; 4- angiogênese; 5- invasão e; 6- metástase (15).

3. Graduação Histológica e Parâmetros Clínicos Tumoriais

Segundo Bryme et al., a graduação histológica do CEC é definida conforme o conjunto de suas características morfológicas, definindo os tumores como de prognóstico bom, moderado e ruim (16). Considerando a literatura, o grau de malignidade obtido através da histologia pode ser determinante para o prognóstico do paciente, uma vez que os tumores mais indiferenciados apresentam taxas maiores de recidiva e metástase (16). Entretanto, outros estudos questionam o valor da graduação histológica como único fator predictivo para prognóstico, como Taghavi & Yazdi (17).

O sistema TNM, segundo os parâmetros estabelecidos pela *American Joint Committee on Cancer*, que utilizam o tamanho (T), presença de metástase regional (N) e presença de metástase à distância (M), fornece o estadiamento clínico da doença (18). O TNM pode ser determinado clinicamente (cTNM) e durante o exame da peça cirúrgica (pTNM)(19). Embora muitos autores acreditem que o estadiamento é o fator que mais pode influenciar no prognóstico dos pacientes, somente este sistema não pode ser

definido como fator predictor, mas sim um conjunto de outras características deve ser utilizado para estabelecer melhores estratégias de tratamento (17).

A literatura oferece diversos métodos e técnicas para projeção de evolução do curso do CEC de cabeça e pescoço como graduação histológica e sistema TNM. Entretanto, uma vez que é frequente a sobrevida dos pacientes não corresponder à graduação histológica e o sistema TNM, se discute a respeito de diversas causas que poderiam influenciar na evolução negativa desses pacientes frente à doença.

4. Sobrevida e Carcinoma Espinocelular

Embora tenham ocorrido avanços no tratamento e melhora da qualidade de vida, a taxa de sobrevida para pacientes com CEC avançado é na faixa de 30-50% (3, 20). Obviamente que, para uma melhora da sobrevivência desses pacientes frente à doença, se torna necessário um melhor entendimento dos mecanismos relacionados às etapas iniciais do processo tumorigênico, bem como das estratégias utilizadas pelas células cancerígenas de disseminação tumoral, através dos linfonodos e órgãos distantes (13).

A maior causa de insucessos clínicos, em termos de terapia e prognóstico, em pacientes com câncer é a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático. A invasão pode ocorrer individualmente, onde as células migram para formar uma interface tumoral difusa, ou coletivamente, onde grupos de células invadem os tecidos e mantêm contatos celulares firmes e modelos particulares de invasão. Estas formas de invasão têm como característica alterações moleculares importantes como modificação da adesão entre as células e a da adesão entre as células e a matriz extracelular como facilitadores do processo (21).

5. Migração, Adesão e Citocinese Celular

A migração celular é um processo indispensável para a progressão tumoral. As células apresentam um variado repertório de motores moleculares para mudanças de forma e locomoção. Esses processos são desempenhados especialmente pela família das miosinas II não musculares (MNMII), as quais participam do controle da dinâmica do citoesqueleto de actina (22, 23).

As MNMII foram a primeira classe de miosinas a serem descritas. Possuem uma longa cauda do tipo alfa hélice espiralada que através de sua dimerização formam filamentos que projetam domínios motores (22). A MNMII tem várias funções celulares, as quais são atribuídas às suas propriedades biofísicas e regulatórias. Três isoformas de MNMII, codificadas por diferentes genes, são expressas em células de mamíferos: miosina não muscular IIA (MNMIIA), miosina não muscular IIB (MNMIIB) e miosina não muscular IIC (MNMIIC). Apesar de considerável homologia, elas exibem diferenças em suas propriedades enzimáticas, localização celular e modelos de expressão tecidual. A distinção entre as três moléculas de MNMII é baseada em suas cadeias pesadas, uma vez que cada isoforma realiza a mesma função molecular básica, que é a ligação e a contração de F-actina de forma ATP-dependente (24).

A contratilidade dos filamentos de actinmiosina desempenha um papel central nas células durante a sua locomoção. Para a formação do lamelopódio é necessária a organização de filamentos de actina com a produção de forças móveis na porção anterior da célula. Isto direciona a formação inicial da frente da célula e continuada protrusão na extremidade anterior (Figura 1). A MNMII associa-se com filamentos existentes de actina e usa sua atividade ATPase para gerar força motora dentro do corpo celular e na parte traseira da célula. Em algumas células, a MNMIIA se concentra no córtex, enquanto a MNMIIB encontra-se distribuída pelo citoplasma (22). Em ambos os casos a força gerada por MNMII é necessária para a retração da parte posterior da célula possibilitando a translocação do corpo celular, e a separação das adesões (25, 26). Sugere-se que é necessário um conjunto de MNMIIA para que haja a ativação e polarização de MNMIIB. Durante a migração celular, existe uma cooperação entre a MNMIIA e MNMIIB uma vez que para que ocorra a protusão do corpo celular deve haver uma sinalização das adesões entre a célula e o meio extracelular. A MNMIIA é responsável pelo desenvolvimento dessas adesões enquanto a MNMIIB realiza a estabilização das mesmas (20).

Durante a citocinese, as MNMIIs regulam a formação de um anel contráctil por baixo da membrana plasmática e alterações na sua atividade resultam em mitose anormal, formação de aneuploidia e instabilidade do

genoma, observados na tumorigênese. A MNMIIC é uma das proteínas responsáveis pela quebra da ponte intercelular presente no final da divisão celular e, sua má localização resulta em células binucleadas (33).

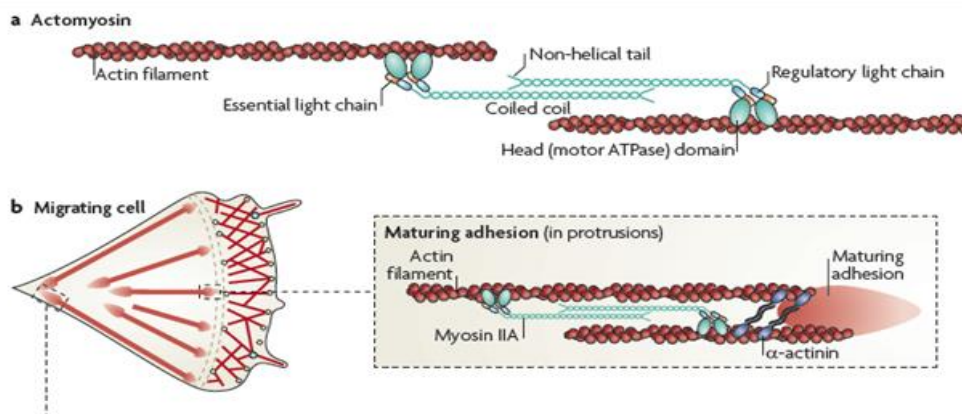


Figura 1: A) esquema representando o *crosslink* entre os feixes de actina (vermelho) e a proteína contrátil miosina (azul); B) a tensão gerada na porção anterior permite o amadurecimento das adesões celulares e a manutenção do formato e a retração do corpo celular (27).

6. Miosinas II Não Musculares e Câncer

O aumento de contratilidade é necessário para que as células tumorais consigam transpor barreiras de matriz extracelular, principalmente quando são mais espessas (28). Já foi demonstrado que, durante a invasão transcelular, as células invasivas do tumor desencadeiam a ativação de MLCK (cinase de cadeia leve de miosina), enzima responsável pela fosforilação da cadeia leve e contração das células da barreira endotelial (zona limite de invasão para ocorrer a metástase), onde, através da contração das células da barreira endotelial haja a formação de espaços, que facilitarão a passagem das células tumorais através da parede do vaso (29).

Em análise imunistoquímica de adenocarcinoma pulmonar, observou-se que, em todas as amostras tumorais que apresentaram superexpressão de MNMIIA, os pacientes correspondentes sofreram recidiva da doença através de metástase à distância. Independentemente de receber quimioterapia adjuvante pós-operatória, a taxa de pacientes livres de recidiva para um período de cinco anos é de 100% entre os que não apresentaram imunoreatividade à MNMIIA,

concluindo-se que a não expressão da mesma seja um fator predictor de bom prognóstico na evolução desta doença (30).

A MNMIIA foi significativamente correlacionada com metástase ganglionar, estágio avançado da doença e período de sobrevida menor em pacientes com CEC de esôfago e estômago. Nesses tumores sugere-se que a MNMIIA possa ser um marcador molecular potencial para previsão da evolução dos pacientes frente à doença (31, 32). A inibição de MNMIIA diminui a migração em cultura de células de câncer epidermóide de esôfago. Estes resultados indicam que a superexpressão da MNMIIA pode contribuir para a progressão e prognóstico pobre deste tipo de tumor (32). Em carcinoma espinocelular de estômago foi observado um aumento da expressão de MNMIIA nos tecidos tumorais, sendo que todas as células cancerígenas presentes nos linfonodos com metástase mostraram forte expressão da mesma. A expressão elevada nos níveis de MNMIIA correlacionada com profundidade de invasão tecidual, linfonodos metastáticos, metástase à distância e estágio TNM demonstra que a MNMIIA pode promover invasão e metástase do carcinoma espinocelular de estômago (31).

Em linhagem de células tumorais invasivas de melanoma, que é um tumor com alto potencial de invasão tecidual e metástase foram relatados altos níveis de MNMIIB. Na avaliação do comportamento migratório e invasivo dessas células, observou-se que a neutralização de MNMIIB resultava em diminuição da migração e invasão celular (33).

Segundo a literatura, é sugerida a relação da MNMIIC com atividade mitótica atípica. Em cultura de células de câncer de mama, alterações na expressão e/ ou atividade da MNMIIC pode gerar anomalias genéticas, como aneuploidia (34). Em linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar, a expressão dessa proteína está associada com citocinese anormal. Uma vez que a MNMIIC é uma das proteínas responsáveis pela quebra da ponte intercelular presente no final da divisão celular, sua má localização pode resultar em células binucleadas (35).

Tendo em vista que a literatura sugere o envolvimento das MNMIIs na progressão de diversas neoplasias de diferentes órgãos do organismo, e que

os fenômenos e alterações moleculares que levam à progressão do CEC de cabeça e pescoço ainda não são totalmente compreendidos, observa-se a necessidade de estudos que objetivem relacionar o envolvimento dessas proteínas com o câncer de cabeça e pescoço e a evolução dos pacientes frente à doença.

Referências Bibliográficas

1. W.H.O. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012.
2. Galvan A, Frullanti E, Anderlini M, Manenti G, Noci S, Dugo M, et al. Gene expression signature of non-involved lung tissue associated with survival in lung adenocarcinoma patients. *Carcinogenesis*. 2013;34(12):2767-73.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
4. Dedivitis RA ea. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2004;70(1):35-40
5. INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014 2014 [cited 2013]. Available from: www.inca.gov.br.
6. Kim L, King T, Agulnik M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology (Williston Park)*. 2010;24(10):915-9, 24.
7. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surgical oncology clinics of North America*. 2015;24(3):491-508.
8. Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *Journal of oncology*. 2012;2012:649498.
9. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
10. Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral oncology*. 2011;47(8):686-7.
11. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1989;18(8):432-7.
12. Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology*. 2011;47(9):855-60.
13. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
14. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(9):744-9.
15. Frieboes HB, Jin F, Chuang YL, Wise SM, Lowengrub JS, Cristini V. Three-dimensional multispecies nonlinear tumor growth-II: Tumor invasion and angiogenesis. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(4):1254-78.
16. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*. 1992;166(4):375-81.
17. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(5):314-9.
18. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.

19. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Piccirillo JF, Haigentz M, Jr., Suarez C, et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head & neck*. 2010;32(12):1693-711.
20. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):309-16.
21. Painter KJ, Armstrong NJ, Sherratt JA. The impact of adhesion on cellular invasion processes in cancer and development. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(3):1057-67.
22. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(11):778-90.
23. Heissler SM, Manstein DJ. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(1):1-21.
24. Sandquist JC, Swenson KI, Demali KA, BurrIDGE K, Means AR. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(47):35873-83.
25. Clow PA, McNally JG. In vivo observations of myosin II dynamics support a role in rear retraction. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(5):1309-23.
26. Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends in cell biology*. 2005;15(12):651-8.
27. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(9):633-43.
28. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Current biology : CB*. 2006;16(15):1515-23.
29. Khuon S, Liang L, Dettman RW, Sporn PH, Wysolmerski RB, Chew TL. Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 3):431-40.
30. Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *British journal of cancer*. 2008;98(3):596-603.
31. Liu D, Zhang L, Shen Z, Tan F, Hu Y, Yu J, et al. Clinicopathological significance of NMIIA Overexpression in Human Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(11):15291-304.
32. Xia ZK, Yuan YC, Yin N, Yin BL, Tan ZP, Hu YR. Nonmuscle myosin IIA is associated with poor prognosis of esophageal squamous cancer. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*. 2012;25(5):427-36.
33. Jacobs K, Van Gele M, Forsyth R, Brochez L, Vanhoecke B, De Wever O, et al. P-cadherin counteracts myosin II-B function: implications in melanoma progression. *Molecular cancer*. 2010;9:255.
34. Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*. 2004;306(5697):876-9.
35. Jana SS, Kawamoto S, Adelstein RS. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(34):24662-70.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi descrever o padrão de expressão das isoformas de MNMII (MNMIIA, MNMIIB, MNMIIC) em amostras de CEC de cabeça e pescoço e tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor.

Objetivos Específicos

- Descrever o perfil dos pacientes diagnosticados com CEC de cabeça e pescoço bem como exposição dos mesmos aos fatores de risco como álcool e fumo.
- Descrever a graduação histológica e parâmetros clínicos tumorais (pTNM) dos CECs de cabeça e pescoço.
- Descrever o padrão de expressão das isoformas da MNMII no centro do tumor, zona de invasão e tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor.
- Relacionar a expressão e localização das isoformas de MNMII com graduação histológica, parâmetros clínicos tumorais (pTNM) e evolução dos pacientes após 05 anos de acompanhamento.
- Relacionar a expressão e localização das isoformas de MNMII com exposição aos fatores de risco.

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Cancer Research (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2013, Fator de impacto 9284).

Avaliação das Miosinas II Não Musculares em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com graduação histológica, TNM e evolução

Abstract

Squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck is a malignant neoplasm of poor prognosis and low survival rate. Understand the biological processes involved in carcinogenesis can be extremely important for the development of new treatment technologies and improved prognosis in patients affected by the disease. The major cause of clinical failure in terms of therapy and prognosis in cancer patients is the development of tissue invasion and metastatic potential. Cell migration is essential for tumor progression and cells molecular motors have played particularly the family of non-muscle Myosins II (NMMII). Encoded by different genes, there are three known isoforms in mammalian cells (NMMIIA, NMMIIB, NMMIIC). The NMMIIs are involved in cellular functions such as migration, cell adhesion and cytokinesis. As the understanding of migration, cell adhesion and cytokinesis key factors in tumor progression, and that the tissue invasion and metastatic potential for development are essential in defining the prognosis of patients, the objective of this study was to describe the profile and exposure to risk factors such as alcohol and tobacco of patients diagnosed with head and neck SCC, histological grading, tumor clinical parameters (TNM), pattern of expression of isoforms NMMII (NMMIIA, NMMIIB, NMMIIC) in the center of the tumor (CT), tumor invasion zone area and not neoplastic adjacent to the tumor (AE), relating the expression and localization of these proteins with the data described and outcome of patients after 5 years of follow-up. For this SCC samples were collected from head and neck, these samples were classified according to the histological grading and patients were clinically staged according to the TNM system. Immunohistochemistry was performed for the three isoforms NMMII and correlated the immunoreactivity of these proteins in the CT, IZ and AE with histological grading, TNM staging seconds and exposure to alcohol and tobacco. According to the results it is suggested that the NMMIIB expressed in AE may indicate the potential regional metastasis of SCC and NMMIIC present in the tumor invasion zone (IZ) is a predictor of poor prognosis factor of the disease. Therefore, it is possible to

propose that immunoreactivity assessment NMMIIB in AE and NMMIIC IZ is used in the analysis of operative parts, as a complement to routine morphological analysis.

Key-words: Malignant Mouth Neoplasms, Cell Migration, Nonmuscle Myosin II

Introdução

Os Carcinomas representam as neoplasias malignas mais prevalentes em seres humanos e surgem a partir de tecidos epiteliais normais, com várias etapas e vias de progressão. A quebra da homeostase das células epiteliais levando ao desenvolvimento das condições malignas está correlacionada com a perda da característica celular e aquisição de fenótipo migratório, fenômeno conhecido como transição epitélio-mesenquimal (1).

A população celular do Carcinoma Espinocelular (CEC) é heterogênea onde há a presença de células agressivas e altamente tumorigênicas responsáveis pela formação do tumor, invasão de tecidos adjacentes e ocorrência de metástases regionais e à distância, que são as células tumorais com característica de células tronco (2-4). Os mecanismos biológicos que regulam este fenômeno ainda não foram totalmente compreendidos (3, 4), embora já existam evidências sugerindo que as mesmas vias críticas para o desenvolvimento fisiológico possam desempenhar um papel importante na tumorigênese, em seus estágios iniciais(5).

O CEC é a neoplasia maligna mais frequente em boca e mesmo com os avanços no tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes, o índice de mortalidade continua o mesmo e a taxa de sobrevivência baixa, em torno de 50% (6-8). Existem ferramentas de previsão prognóstica para os pacientes acometidos por neoplasias malignas como graduação histológica e sistema TNM, entretanto, alguns estudos questionam o real valor desses métodos uma vez que tumores sólidos como o CEC apresentam uma população celular desigual, resultando em diferenças de comportamento entre as zonas tumorais, mascarando por muitas vezes a real situação da doença. A zona de invasão (ZI) do CEC representa a área mais significativa do tumor uma vez que

frequentemente apresenta características celulares semelhantes às encontradas em neoplasias metastáticas (3).

Entre as causas de insucessos clínicos, em termos de terapia e prognóstico, está a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático. A invasão tecidual é viabilizada por alterações moleculares importantes, como modificação da adesão célula-célula e entre as células e a matriz extracelular como facilitadores do processo. A migração celular é um processo indispensável para a progressão tumoral (9). Existem moléculas de adesão envolvidas nesse processo que apresentam, através da análise imunohistoquímica do CEC, comportamento semelhante entre as zonas tumorais e o tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor (EA), indicando que a avaliação molecular do EA possa fornecer informações sobre comportamento do CEC (10).

As células apresentam um variado repertório de motores moleculares para mudanças de forma e locomoção, que são desempenhados especialmente pela família das Miosinas II não musculares (MNMI) as quais participam do controle e dinâmica do citoesqueleto de actina (11, 12). As MNMI foram a primeira classe de miosinas a serem descritas e estão envolvidas com múltiplas funções celulares como migração, adesão celular e citocinese (13). Codificadas por diferentes genes, as três isoformas conhecidas (MNMIIA, MNMIIB, MNMIIC) são expressas em células de mamíferos e diferenciam-se por suas propriedades enzimáticas e localização celular (14, 15). Durante a migração celular, existe uma cooperação entre a MNMIIA e MNMIIB uma vez que para que ocorra a protusão do corpo celular deve haver uma sinalização das adesões entre a célula e o meio extracelular. A MNMIIA é responsável pelo desenvolvimento dessas adesões enquanto a MNMIIB realiza a estabilização das mesmas (20, 25). Durante a citocinese, as MNMI regulam a formação de um anel contráctil por baixo da membrana plasmática e alterações na sua atividade resultam em mitose anormal, formação de aneuploidia e instabilidade do genoma. A MNMIIC é uma das proteínas responsáveis pela quebra da ponte intercelular presente no final da divisão celular e, sua má localização pode resultar em células binucleadas (14).

Sendo o entendimento da migração, adesão celular e citocinese fatores chave na progressão tumoral, e que o a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático são essenciais na definição do prognóstico dos pacientes, o objetivo deste estudo foi descrever o perfil e exposição à fatores de risco como álcool e fumo dos pacientes diagnosticados com CEC de cabeça e pescoço, graduação histológica, parâmetros clínicos tumorais (TNM), padrão de expressão das isoformas de MNMII (MNMIIA, MNMIIB, MNMIIC) no centro do tumor, zona de invasão e tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor, relacionando a expressão e localização dessas proteínas com os dados descritos bem como evolução dos pacientes após 5 anos de acompanhamento.

Materiais e Métodos

Descrição da Amostra

Os 54 pacientes que fizeram parte deste estudo foram atendidos no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e diagnosticados com CEC de cabeça e pescoço entre os anos de 2009 e 2010. O estudo observacional transversal analítico utilizou amostra de conveniência.

Todos os indivíduos tinham mais de 18 anos no momento do diagnóstico e assinaram Termo de Consentimento Livre Esclarecido bem como responderam a um questionário para obtenção de dados demográficos.

Os blocos de parafina confeccionados através das amostras de CEC, os dados de acompanhamento clínico dos pacientes até o ano de 2012 e o estadiamento dos tumores no momento da cirurgia são oriundos de estudo prévio aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (GPPG) do HCPA sob o número 09-315(10).

Avaliação das Amostras Tumorais

Cortes histológicos de 3µm obtidos através dos blocos de parafina foram corados em hematoxilina e eosina. Para cada amostra de CEC foram identificadas as zonas tumorais como centro de tumor (CT) e zona de invasão (ZI), bem como os tecidos epiteliais não neoplásicos adjacentes (EA). Para determinação do CT, foram avaliadas as ilhas tumorais localizadas na região central da neoplasia, evitando áreas de necrose. A ZI foi identificada a partir das ilhas tumorais localizadas distantes à zona central, preferencialmente na transição entre o tecido conjuntivo e tecidos adjacentes profundos como muscular, adiposo e glandular. O EA correspondeu ao epitélio de revestimento da mucosa sem sinais morfológicos de alteração maligna.

A graduação histológica foi realizada segundo os critérios de Bryne et al. por dois patologistas (A.P.C.F e K.B.D) onde para cada característica morfológica avaliada foi atribuído um escore, os quais foram somados para determinar a qual grupo de malignidade pertencia o espécime: baixo, moderado ou alto (16).

Os dados clínicos dos tumores, tais como tamanho (T), presença de metástase regional (N) e presença de metástase à distância (M) foram tabulados e classificados segundo o sistema TNM de acordo com os parâmetros estabelecidos pela *American Joint Committee on Cancer* que pode ser determinada clinicamente (cTNM) e durante o exame da peça cirúrgica (pTNM) (17, 18). Após o tempo total de acompanhamento, os pacientes vivos e sem recidiva foram considerados como de boa evolução e os pacientes com recidiva, metástase ou óbito em decorrência do tumor foram considerados como evolução ruim.

Imunoistoquímica

Foram confeccionados cortes histológicos de 3µm em lâminas silanizadas provenientes dos blocos de parafina, submetidos à técnica de imunoistoquímica para a imunomarcagem das isoformas da MNMII (A, B e C). Inicialmente os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em gradiente de álcool e água e imersos em solução de peróxido de hidrogênio à

3% para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, foram submetidos à recuperação antigênica e incubados com os anticorpos primários Anti-MNMIIA, Anti-MNMIIB, Anti-MNMIIC (IIA - policlonal, IIB - clone D8H8 e IIC - clone D4A7, coelho, Cell Signaling 1:50). A recuperação antigênica da Anti-MNMIIA ocorreu através de panela de pressão à 120° durante 3 minutos e das Anti-MNMIIB e C através de solução enzimática de tripsina 0,25% durante 30 minutos. A incubação de todos os anticorpos foi em temperatura de 4° C, *overnight*. As reações foram acompanhadas de controle positivo (adenocarcinoma de estômago) e controle negativo o qual foi utilizado soro não imune da mesma espécie animal do desenvolvimento do anticorpo primário, de acordo com as instruções do fabricante. O sistema de detecção empregado foi do tipo polimérico (*Envision dual link*; Dako, Carpinteria, CA, USA) e a revelação das reações foi obtida através de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3,3'-Diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, USA) e contrastada com solução de hematoxilina de Mayer.

Avaliação dos Resultados

Foram consideradas positivas para isoformas de MNMIIA, MNMIIB e MNMIIC as células tumorais que apresentaram a coloração castanha em seu citoplasma. Eventuais graus de coloração de fundo causados pela incorporação e fixação durante o processamento tecidual, que em sua maioria representam tecido estromal foram excluídos durante a contagem, onde se considerou apenas as células epiteliais marcadas (19). Os cortes histológicos imunomarcados foram submetidos à análise semi-quantitativa com base na extensão da imunorreatividade, realizada por meio de escores baseados no percentual de células positivas, onde foram consideradas positivas marcações acima 30% e negativas de 0 à ≤30%.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde a cada 10 lâminas avaliadas de graduação histológica e de cada proteína, uma foi sorteada para reavaliação. O valor de Kappa aceito foi maior que 0,7. Durante a avaliação, os examinadores eram cegos para qual paciente pertencia o material.

Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SPSS, versão 21. Para avaliar a sobrevida através do tempo total de acompanhamento foi utilizada a análise de Kaplan-Meier. A associação de imunomarcação entre as proteínas foi realizada através do teste Qui-Quadrado, a distribuição de imunomarcação das proteínas nas zonas tumorais de acordo com a evolução e exposição ao álcool e fumo foi verificada pelo teste Mann-Whitney e para avaliar a distribuição de imunomarcação das proteínas nas zonas tumorais de acordo com a graduação histológica e sistema pTNM foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Foram considerados como níveis de significância valores de p menores e iguais à 0,05.

Resultados

A média de idade dos pacientes avaliados no estudo foi de 58,3 anos, sendo 85,2% do gênero masculino e 14,8% feminino (dados não mostrados). No momento do diagnóstico 38,9% dos pacientes eram expostos ao fumo e 48,1% ao álcool. Dos pacientes expostos ao álcool, 83,3% mantinham o hábito por um período maior de dez anos (dados não mostrados).

Antes do diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço, 55,5% dos pacientes deixaram de estar expostos ao fumo e 46,3% ao álcool, numa média de 4,7 e 6,3 anos respectivamente. Os dados relativos à exposição e histórico de uso de fumo e álcool estão representados na tabela 1.

De acordo com a graduação histológica, 48,1% do total das amostras de CEC eram de grau moderado. Segundo o sistema pTNM, 62,9% apresentaram tamanho entre T1 e T2, 64,8% não apresentaram metástase regional (N0) e não houve metástase à distância (MX, M0, M1) (tabela 2).

		N	%
Fumo			
Histórico			
Expostos		51	94,4
Não-Expostos		3	5,6
Expostos ao fumo no diagnóstico			
Expostos		21	38,9
Não-expostos	Anteriormente expostos	30	55,55
	Nunca expostos	3	5,6
Álcool			
Histórico			
Exposto		51	94,4
Não-exposto		3	5,6
Expostos ao álcool no diagnóstico			
Exposto		26	48,1
Não-exposto	Anteriormente expostos	25	46,3
	Nunca expostos	3	5,6
Total		54	100

Tabela 1: dados relativos à exposição e histórico de uso de fumo e álcool.

	N	%
Gradação Histológica		
Baixo	25	46,3
Moderado	26	48,1
Alto	3	5,6
Parâmetros Clínicos Tumorais		
Tamanho		
T1/T2	34	62,9
T3/T4	20	37
Total	54	100
Nódulo		
0	35	64,8
1,2 e 3	19	35,2
Total	54	100
Metástase		
MX, M0, M1	0	0
Total	54	100

Tabela 2: Distribuição da amostra de acordo com a gradação histológica e parâmetros clínicos tumorais.

No EA e nas ilhas tumorais, observa-se uma expressão generalizada de MNMIIA e MNMIIB enquanto que, na camada basal do EA bem como das ilhas tumorais não se observa expressão da MNMIIC (figura 1). A frequência de expressão das proteínas está representada na tabela 3.

Nas ilhas tumorais, o aumento de expressão da MNMIIA está associado ao aumento de expressão da MNMIIB ($p=0,016$) e no EA há associação de aumento de expressão entre as três isoformas (MNMIIA-MNMIIB $p=0,001$, MNMIIA-MNMIIC $p=0,012$ e MNMIIB-MNMIIC $p=0,006$).

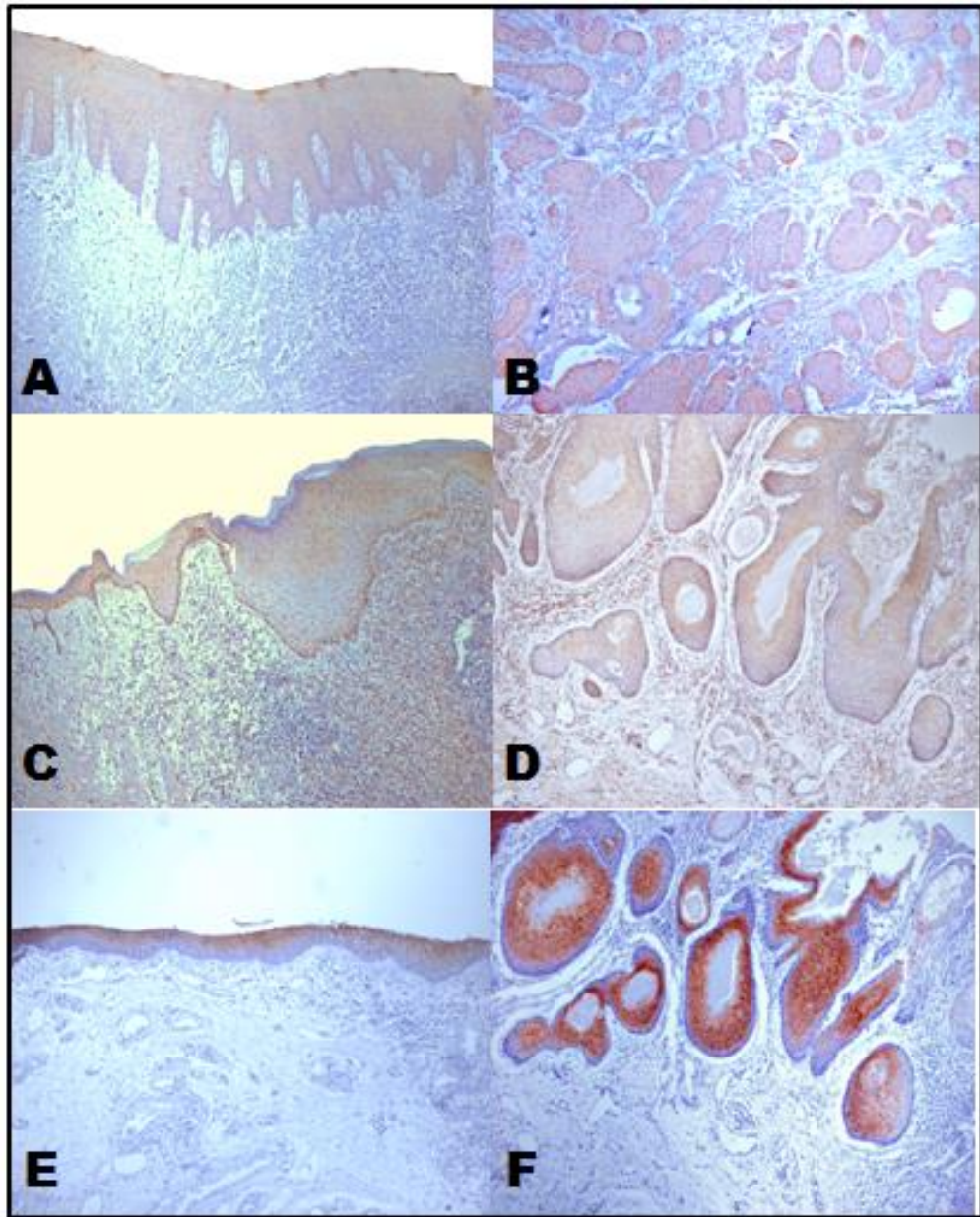


Figura 1: diferença do padrão de expressão no EA entre as MNMIIA (A) e MNMIIB (C) frente à MNMIIC (E). Em relação à MNMIIC não se observa imunorreatividade na camada basal enquanto nas outras isoformas o padrão de marcação ocorre de maneira generalizada. Nas ilhas tumorais o padrão de imunorreatividade se mantém o mesmo do EA nas três isoformas (B, D, F). Aumento original de 100x. FONTE: Patologia bucal FO-UFRGS

	MNMIIA	MNMIIB	MNMIIC
Epitélio Adjacente	70,4% (38)	64,8% (35)	75,9% (41)
Ausente	29,7% (16)	35,2% (19)	24,1% (13)
Total	100% (54)	100% (54)	100% (54)
Ilhas Tumorais	81,5% (44)	77,8% (42)	70,4% (38)
Ausente	18,5%(10)	22,3%(12)	29,6% (16)
Total	100% (54)	100% (54)	100% (54)

Tabela 3: frequência de expressão das proteínas no EA e nas ilhas tumorais

A relação de expressão das isoformas de MNMIIA com graduação histológica, estadiamento clínico e evolução após tempo de acompanhamento está representada na tabela 4 onde, o aumento do grau de malignidade não está correlacionado com o aumento de expressão das proteínas no EA e nas ilhas tumorais.

	MNMIIA	MNMIIB	MNMIIIC
Graduação Histológica			
EA	p=0,253	p=0,359	p=0,379
CT	p=0,346	p=0,220	p=0,078
ZI	p=0,141	p=0,139	p=0,274
pTNM			
EA	p=0,347	p=0,057	p=0,426
CT	p=0,696	p=0,268	p=0,926
ZI	p=0,976	p=0,210	p=0,324
Evolução			
EA	p=0,625	p=0,806	p=0,952
CT	p=0,954	p=0,574	p=0,247
ZI	p=0,178	p=0,507	p=0,017

*Valores de p relativos ao teste de Kruskal-Wallis; * $p < 0,05$

Tabela 4: relação de imunomarcção dos anticorpos nas zonas tumorais e EA com graduação histológica, estadiamento clínico e evolução dos pacientes após tempo total de acompanhamento.

Nos pacientes que sofreram metástase regional observa-se uma expressão maior de MNMIIA com marcação positiva no EA do que MNMIIB e, não há expressão de MNMIIC (figura 2). Há uma tendência de que, em estágios pTNM avançados exista aumento de expressão MNMIIB no EA ($p=0,057$) (tabela 4).

Os pacientes que apresentaram evolução ruim estão diretamente relacionados ao aumento de expressão de MNMIIC na ZI dos tumores ($p=0,017$) (tabela 4).

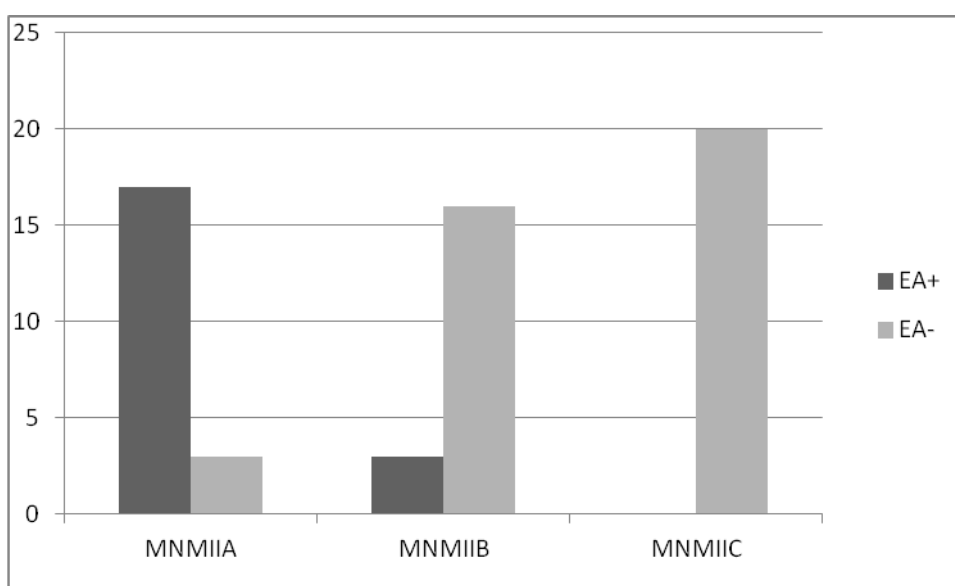


Figura 2: relação de imunomarcagem das proteínas no EA em pacientes com metástase regional.

O tempo máximo de acompanhamento foi de 5,9 anos onde, do total de 54 pacientes iniciais obteve-se o *status* final de 46, sendo 58,1% de boa evolução e 41,9% evolução ruim. A média em anos para que os pacientes apresentassem evolução ruim foi de 5,01 (figura3).

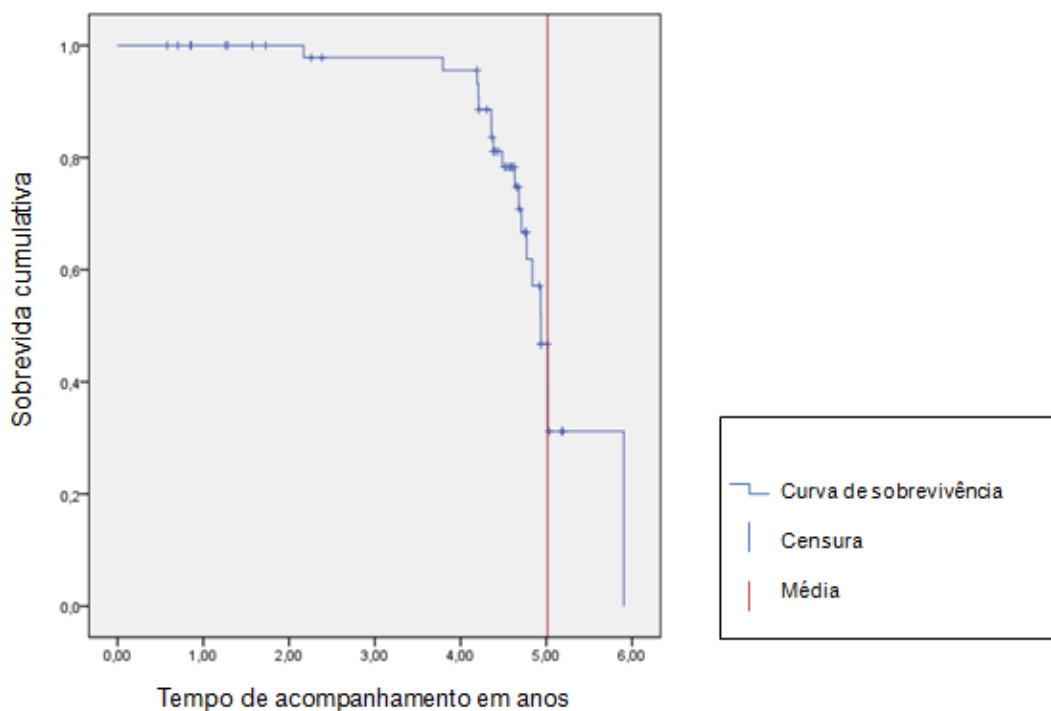


Figura 3: curva de Kaplan-Meier demonstrando, de acordo com o tempo de acompanhamento, a evolução dos pacientes (desvio padrão 0,146, intervalo de confiança 95%).

Na relação de exposição ao álcool e fumo com expressão das proteínas, não houve significância estatística nos pacientes expostos ao fumo, porém, foi constatada correlação de imunomarcção de MNMIIA ($p=0,048$) e MNMIIB ($p=0,010$) no EA em pacientes que foram expostos ao álcool por período superior à 10 anos.

Discussão

A média de idade dos pacientes avaliados no estudo foi de 58,3 anos, sendo 85,2% do sexo masculino, indo de acordo como estudo de Brown et, al (20) onde é relatada incidência 2 à 4 vezes maior de homens acometidos pelo CEC de cabeça e pescoço frente às mulheres. Outros autores também descrevem uma média de idade próxima da sexta década de vida e uma incidência maior em homens (21, 22). A Globocan (23) estima a ocorrência de novos casos de CEC de cabeça e pescoço no Brasil ao final do ano de 2015 em média duas vezes maior para homens com idade inferior a 65 anos comparado às mulheres.

O perfil dos pacientes acometidos pelo CEC de cabeça e pescoço vem sendo modificado de acordo com o passar dos anos uma vez que tradicionalmente 80-90% desses CECs eram relacionados à exposição ao álcool e fumo (24). Embora não possa ser negado o fato de que estes fatores são promotores e potencializadores da doença, observa-se nesta amostra uma tendência de mudança dessas características, uma vez que existe um número de pacientes expostos ao fumo e álcool no momento do diagnóstico, que cessou o hábito antes do desenvolvimento da doença, sendo em média 4,7 anos para fumantes e 6,3 anos para usuários de álcool. De acordo com o histórico de exposição à estes fatores, houve uma diminuição de pacientes expostos, visto o número de ex-fumantes (55,55%) e ex-usuários de álcool (46,3%) observado na tabela 1. Essa diminuição de pacientes expostos aos fatores de risco à doença pode ser atribuída às novas condutas de saúde pública que visam prevenir não somente o CEC, mas outras doenças relacionadas (21).

De acordo com a graduação histológica, 48,1% do total das amostras de CEC analisadas eram de grau moderado e 46,3% baixo. Considerando a literatura, o grau de malignidade obtido através da histologia (bom, moderado ou ruim), pode ser determinante para o prognóstico do paciente uma vez que os tumores mais indiferenciados apresentam taxas maiores de recidiva e metástase (16). Apenas 5,6% das amostras de CEC desta pesquisa

apresentaram graduação histológica alta, o que, com base nos dados obtidos na literatura, poderia refletir num número muito grande de pacientes com boa evolução ao final do estudo. No entanto, a proporção de pacientes com boa evolução (58,1%) não está de acordo com esta afirmação, mas corrobora com outros estudos que relatam o valor da graduação histológica como fator preditivo para prognóstico como controverso, como Taghavi & Yazdi (8). Considerando-se ainda que este tipo de análise é dependente da subjetividade do examinador, não seria ideal utilizar apenas a graduação histológica mas sim, outros recursos que proporcionem previsões prognósticas mais confiáveis.

Em relação ao estadiamento clínico, 62,9% dos tumores apresentaram tamanho entre T1 e T2 e 64,8% não apresentaram metástase regional. Segundo a literatura, a ocorrência de metástase regional em CEC de cabeça e pescoço é mais frequente que metástase à distância (22, 25), o que está de acordo com a amostra de CEC analisada uma vez que o índice de metástase regional foi de 35,2% e não houve metástase à distância. Tendo em vista que a sobrevida cai em média 50% na presença de metástase regional (22), o índice de pacientes com recidiva, metástase ou óbito em decorrência do tumor ao final do período de acompanhamento, somando um total de 41,9% da amostra, está dentro do padrão já relatado por outros autores (6, 7). Entretanto, considerando-se que a maioria dos pacientes deste estudo encontrava-se em estágios iniciais da doença no momento da cirurgia (T1-T2=62,9% N0= 64,8%) e o índice de evolução ruim observado ao final do tempo de acompanhamento é alto (41,9%), sugere-se o sistema TNM como boa ferramenta para decisão terapêutica, mas, como relatado na literatura, existe a necessidade de que se obtenham ferramentas de prognósticas mais confiáveis(8).

No EA e nas ilhas tumorais, observa-se uma expressão generalizada de MNMIIA e MNMIIB enquanto que, na camada basal do EA e das ilhas tumorais não se observa expressão de MNMIIC. Sugere-se na literatura que é necessário um conjunto de MNMIIA para que haja a ativação e polarização de MNMIIB (26), ou seja, é esperado que essas duas isoformas apresentem o mesmo padrão de expressão uma vez que funcionem de forma conjugada. No presente estudo, observamos uma diferença qualitativa do padrão de expressão da MNMIIC no EA e nas zonas tumorais em relação às outras isoformas. A

razão de o padrão de expressão ser diferente e se refletir tanto no EA quanto nas ilhas tumorais pode ser devido ao fato descrito por Sterz et al, onde o mesmo afirma que as células da camada basal do epitélio não tumoral adjacente compartilham semelhanças fenotípicas com as células da camada basal do fronte de invasão tumoral, exibindo o mesmo padrão de imunomarcação (27).

Durante a migração celular, existe uma cooperação entre a MNMIIA e MNMIIB uma vez que para que ocorra a protusão do corpo celular devendo haver uma sinalização das adesões entre a célula e o meio extracelular. A MNMIIA é responsável pelo desenvolvimento dessas adesões enquanto a MNMIIB realiza a estabilização das mesmas. Esse sinergismo pode, por sua vez, justificar o fato de que neste estudo, tanto no EA quanto nas ilhas tumorais, o aumento de expressão da MNMIIA esteja associado ao aumento de expressão da MNMIIB. Embora haja associação de imunomarcação de MNMIIC no EA com as duas isoformas, não está especificada de acordo com a literatura, a participação da MNMIIC nos eventos que propiciam a locomoção da célula (26, 28).

De acordo com a graduação histológica, conforme o aumento do grau de malignidade, não há aumento de expressão de MNMIIA, MNMIIB, e MNMIIC no EA e nas ilhas tumorais. Em análise imunoistoquímica de adenocarcinoma pulmonar observou-se que a taxa de pacientes livres de recidiva para um período de cinco anos é de 100% entre os que não apresentaram imunoreatividade à MNMIIA, concluindo-se que a não expressão da mesma seja um fator predictor de bom prognóstico na evolução desta doença. (19, 29, 30). Em carcinomas de esôfago e estômago, sugere-se que a MNMIIA pode ser um marcador molecular potencial para previsão da evolução dos pacientes frente à doença(19, 30), entretanto, no presente trabalho não observamos aumento de expressão da MNMIIA de acordo com a piora da graduação histológica. Até o momento, não há na literatura estudos de acompanhamento referindo as MNMIIB e MNMIIC.

Nos pacientes que sofreram metástase regional observa-se uma expressão maior de MNMIIA com marcação positiva no EA do que MNMIIB.

Embora exista uma associação de atividade entre as duas proteínas, a literatura sugere que a MNMIIA esteja mais relacionada à formação do lamelipódio na porção anterior da célula, mobilizando a mesma nesta região durante a migração e que, a MNMIIB relacione-se mais à porção posterior celular, viabilizando a quebra das adesões locais permitindo que a célula faça o movimento de protusão. Para a célula efetivamente protuir existe a necessidade da quebra das adesões posteriores justificando que apenas a MNMIIB expressa no EA relacione-se com estágios pTNM mais avançados embora exista uma alta imunorreatividade de MNMIIA. Apenas os epitélios com imunorreatividade à MNMIIB tem a real capacidade de migração celular, evento indispensável para a invasão e progressão tumoral (11, 12, 14).

Segundo a literatura, há uma queda de 50% da sobrevida, na presença de metástase regional (22). A maior causa de insucessos em CEC é a invasão tecidual e o desenvolvimento de metástase (9). Em linhagem de células tumorais invasivas de melanoma, que é um tumor com alto potencial de invasão tecidual e metástase, foram relatados altos níveis de MNMIIB (31). Neste trabalho observa-se que estágios pTNM mais avançados tendem a apresentar imunorreatividade maior de MNMIIB no EA. Sendo as características fenotípicas semelhantes entre EA e células da camada basal tumoral (27), pode-se sugerir que o aumento de expressão de MNMIIB no EA seja um sinal potencial de metástase regional do CEC de cabeça e pescoço. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar tal hipótese.

Os pacientes que apresentaram evolução ruim estão diretamente relacionados ao aumento de expressão de MNMIIC na ZI dos tumores avaliados nesta pesquisa. Em cultura de células de câncer de mama, alterações na expressão e/ ou atividade dessa proteína podem gerar anomalias genéticas, como aneuploidia (13). Em linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar, a expressão de MNMIIC está associada com citocinese anormal. Uma vez que a MNMIIC é uma das proteínas responsáveis pela quebra da ponte intercelular presente no final da divisão celular, sua má localização pode resultar em células binucleadas(15). O fato de o aumento da MNMIIC estar associada à zona de invasão tumoral dos CECs avaliados neste estudo, aliado ao fato de que na zona de invasão espera-se um número maior de mitoses,

uma vez que nesta região está havendo a progressão tumoral, e tendo-se o conhecimento de que as forças físicas geradas pelas MNMIIs são necessárias para a divisão celular, sugere que a expressão de MNMIIC na ZI é um fator predictor de evolução ruim em pacientes acometidos pela doença, uma vez que entre as maiores causas de insucessos clínicos em termos de terapia e prognóstico, está a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático (9).

A média de tempo que 41,9% dos pacientes levou para atingir o *status* evolução ruim foi de 5,01 anos corroborando com os trabalhos que afirmam que, mesmo com os avanços no tratamento e melhora da qualidade de vida, a taxa de sobrevida para pacientes com CEC é na faixa de 30-50% (6, 7, 22). Montero & Pattel relatam uma taxa de sobrevida global após 5 anos de 63%.

De acordo com estudos que relacionam álcool a CEC, observa-se que o consumo crônico de álcool pode causar uma diminuição da espessura epitelial e conseqüente aumento da descamação celular(32, 33). Esse aumento da descamação nas camadas mais superficiais causaria uma resposta adaptativa do epitélio, através do aumento de proliferação da camada basal, objetivando a manutenção da homeostase epitelial (33). Um aumento na proliferação tecidual pode ser o primeiro passo da carcinogênese uma vez que existe maior possibilidade de erros durante a duplicação do DNA(34). No presente estudo observou-se correlação de imunomarcagem de MNMIIA ($p=0,048$) e MNMIIB ($p=0,010$) no EA em pacientes que foram expostos ao álcool por período superior à 10 anos sendo que danos causados pelo álcool estão relacionados ao tempo de exposição ao hábito e são cumulativos e progressivos (33, 35). Uma vez que a célula apresente danos ao DNA e adquira características tumorais, existe a possibilidade de a mesma assumir um fenótipo migratório com a finalidade de invadir os tecidos adjacentes, necessitando de moléculas que atuem na migração celular como as MNMIIA e MNMIIB (1).

A literatura oferece vários estudos sobre eventos genéticos e epigenéticos que implicam na progressão do CEC, que é um evento complexo, relativo à instabilidade genética, envolvido na expressão anormal de agentes regulatórios da angiogênese, migração, adesão, apoptose, e ciclo celular, (36).

Embora o papel das MNMIIs ainda não esteja claro neste processo, o presente trabalho sugere que a MNMIIB expressa no EA indique o potencial de metástase regional do CEC e que a MNMIIC presente na ZI tumoral seja um fator predictor de evolução ruim da doença. Com base nos resultados obtidos é possível propor que a avaliação de imunorreatividade da MNMIIB no EA e MNMIIC na ZI seja utilizada na análise das peças operatórias, como complemento à análise morfológica de rotina.

Referências Bibliográficas

1. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(9):744-9.
2. Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral oncology*. 2011;47(8):686-7.
3. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1989;18(8):432-7.
4. Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology*. 2011;47(9):855-60.
5. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
6. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
7. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):309-16.
8. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(5):314-9.
9. Painter KJ, Armstrong NJ, Sherratt JA. The impact of adhesion on cellular invasion processes in cancer and development. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(3):1057-67.
10. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(11):778-90.
11. Heissler SM, Manstein DJ. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(1):1-21.
12. Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*. 2004;306(5697):876-9.
13. Sandquist JC, Swenson KI, Demali KA, Burridge K, Means AR. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(47):35873-83.

14. Jana SS, Kawamoto S, Adelstein RS. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(34):24662-70.
15. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*. 1992;166(4):375-81.
16. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
17. Xia ZK, Yuan YC, Yin N, Yin BL, Tan ZP, Hu YR. Nonmuscle myosin IIA is associated with poor prognosis of esophageal squamous cancer. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*. 2012;25(5):427-36.
18. Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *Journal of oncology*. 2012;2012:649498.
19. Kim L, King T, Agulnik M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology (Williston Park)*. 2010;24(10):915-9, 24.
20. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surgical oncology clinic North America*. 2015;24(3):491-508.
21. W.H.O. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012.
22. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
23. Tshering Vogel DW, Zbaeren P, Thoeny HC. Cancer of the oral cavity and oropharynx. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*. 2010;10:62-72.
24. Lombardo EM, da Cunha AR, Carrard VC, Bavaresco CS. [Delayed referrals of oral cancer patients: the perception of dental surgeons]. *Ciencia & saude coletiva*. 2014;19(4):1223-32.
25. Vicente-Manzanares M. Cell migration: cooperation between myosin II isoforms in durotaxis. *Current biology : CB*. 2013;23(1):R28-9.
26. Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Bottcher MC, Bette M, et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral oncology*. 2010;46(2):116-22.
27. Vicente-Manzanares M, Newell-Litwa K, Bachir AI, Whitmore LA, Horwitz AR. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *The Journal of cell biology*. 2011;193(2):381-96.
28. Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *British journal of cancer*. 2008;98(3):596-603.
29. Liu D, Zhang L, Shen Z, Tan F, Hu Y, Yu J, et al. Clinicopathological significance of NMIIA Overexpression in Human Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(11):15291-304.
30. Jacobs K, Van Gele M, Forsyth R, Brochez L, Vanhoecke B, De Wever O, et al. P-cadherin counteracts myosin II-B function: implications in melanoma progression. *Molecular cancer*. 2010;9:255.
31. Koo K, Barrowman R, McCullough M, Iseli T, Wiesenfeld D. Non-smoking non-drinking elderly females: a clinically distinct subgroup of oral squamous cell carcinoma patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2013;42(8):929-33.
32. Durr ML, Li D, Wang SJ. Oral cavity squamous cell carcinoma in never smokers: analysis of clinicopathologic characteristics and survival. *American journal of otolaryngology*. 2013;34(5):388-93.

33. Al-Swiahb JN, Chen CH, Chuang HC, Fang FM, Tasi HT, Chien CY. Clinical, pathological and molecular determinants in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Future oncology*. 2010;6(5):837-50.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular (CEC) é uma neoplasia maligna de prognóstico desfavorável e baixa taxa de sobrevida (1, 2), portanto existe a necessidade de compreensão de parâmetros que determinem melhores alternativas de tratamento para esse tipo de doença.

A literatura oferece diversos métodos e técnicas para projeção de evolução do curso do CEC de cabeça e pescoço como graduação histológica e sistema TNM. Entretanto, uma vez que a sobrevida dos pacientes não necessariamente tem correspondido à graduação histológica e o sistema TNM, como exemplo, observamos os pacientes da amostra pesquisada, se discute a respeito de que somente este tipo de classificação não seria um fator predictor adequado para definir prognóstico e estratégias de tratamento mais específicas(3).

Os eventos de migração, adesão celular e citocinese são elementares para a progressão tumoral (4), e seus mecanismos de ação devem ser estudados como alvo de estratégias terapêuticas. O entendimento de eventos celulares relacionados à expressão das isoformas de MNMII pode ser utilizado no desenvolvimento de terapias para o tratamento e previsão de prognóstico para os pacientes com CEC de cabeça e pescoço.

Este estudo visava compreender as propriedades infiltrativas do CEC de cabeça e pescoço por meio dos mecanismos moleculares que permitem às células neoplásicas alterar sua morfologia e biologia para deixar o compartimento do tecido epitelial e invadir o tecido conjuntivo. A literatura oferece alguns estudos a respeito da relação da MNMIIA (5, 6) com a progressão e piora de em câncer de diversos órgãos do organismo, entretanto, em relação às MNMII B e C, muitos estudos disponíveis (7-9) são baseados apenas em culturas de células tumorais e não relacionam a evolução dos pacientes com as proteínas estudadas.

O presente trabalho observou uma tendência de relação da MNMII B presente no tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor com estágios pTNM mais avançados, ou seja, aumentando as chances de metástase

regional. Com base nesta informação, e de acordo com a literatura onde as características fenotípicas do epitélio adjacente se repetem nas ilhas tumorais (10), pode-se sugerir que a expressão de MNMIIB presente neste tecido epitelial possa ser um sinal potencial de metástase regional.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho em relação à MNMIIC, e os achados apresentados na literatura relacionando alterações na sua expressão com anomalias genéticas, como aneuploidia em linhagem de células de carcinoma de mama (11) e citocinese anormal, resultando em células binucleadas em linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar (7), propõem-se que, com a MNMIIC expressa na zona de invasão tumoral dos CECs analisados, há chances maiores de evolução ruim (12, 13).

Existem diversos estudos sobre eventos relacionados à progressão do CEC, que é um episódio complexo, relativo à instabilidade genética, envolvido na expressão anormal de agentes regulatórios da angiogênese, migração, adesão, apoptose, e ciclo celular (14). Com base nos resultados é possível propor que a avaliação de imunorreatividade da MNMIIB no EA e MNMIIC na ZI seja utilizada na análise das peças operatórias, como complemento à análise morfológica de rotina.

Referências Bibliográficas

1. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
3. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(5):314-9.
4. Painter KJ, Armstrong NJ, Sherratt JA. The impact of adhesion on cellular invasion processes in cancer and development. *Journal of theoretical biology*. 2010;264(3):1057-67.
5. Xia ZK, Yuan YC, Yin N, Yin BL, Tan ZP, Hu YR. Nonmuscle myosin IIA is associated with poor prognosis of esophageal squamous cancer. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*. 2012;25(5):427-36.
6. Liu D, Zhang L, Shen Z, Tan F, Hu Y, Yu J, et al. Clinicopathological significance of NMIIA Overexpression in Human Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(11):15291-304.
7. Jana SS, Kawamoto S, Adelstein RS. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(34):24662-70.
8. Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *British journal of cancer*. 2008;98(3):596-603.
9. Jacobs K, Van Gele M, Forsyth R, Brochez L, Vanhoecke B, De Wever O, et al. P-cadherin counteracts myosin II-B function: implications in melanoma progression. *Molecular cancer*. 2010;9:255.
10. Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Bottcher MC, Bette M, et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral oncology*. 2010;46(2):116-22.
11. Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*. 2004;306(5697):876-9.
12. Koo K, Barrowman R, McCullough M, Iseli T, Wiesenfeld D. Non-smoking non-drinking elderly females: a clinically distinct subgroup of oral squamous cell carcinoma patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2013;42(8):929-33.
13. Durr ML, Li D, Wang SJ. Oral cavity squamous cell carcinoma in never smokers: analysis of clinicopathologic characteristics and survival. *American journal of otolaryngology*. 2013;34(5):388-93.
14. Al-Swiahb JN, Chen CH, Chuang HC, Fang FM, Tasi HT, Chien CY. Clinical, pathological and molecular determinants in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Future oncology*. 2010;6(5):837-50.